



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68224** (13) **U**
(51) МПК
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 07338**
(22) Дата подання заявки: **10.06.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **26.03.2012**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.03.2012, Бюл.№ 6**

(72) Винахідник(и):
Жебровська Філя Іванівна (UA),
Борщевська Марина Іллінічна (UA),
Бігуняк Володимир Васильович (UA),
Лісничук Наталія Євгенівна (UA),
Костюк Григорій Вікторович (UA)
(73) Власник(и):
Жебровська Філя Іванівна,
вул. Старицького, 6, м. Київ, 04078 (UA),
Борщевська Марина Іллінічна,
вул. Маршала Жукова, 31-а, кв. 2, м. Київ, 02166 (UA),
Бігуняк Володимир Васильович,
вул. Січових Стрільців, 8-а, м. Тернопіль, 46000 (UA),
Лісничук Наталія Євгенівна,
б-р Петлюри, 7, кв. 31, м. Тернопіль, 46023 (UA),
Костюк Григорій Вікторович,
вул. Старицького, 6, м. Київ, 04078 (UA)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ РАНОЗАГОЮЮЧОЇ ТА РЕГЕНЕРУЮЧОЇ ДІЇ НА ОСНОВІ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ПЕПТИДІВ, ЩО МАЄ СПЕЦИФІЧНУ АКТИВНІСТЬ

(57) Реферат:

Фармацевтична композиція ранозагоюючої та регенеруючої дії, в якій висока антимікробна резистентність препарату, отриманого із замороженого дермального шару шкіри свиней, здатність його до ефективної адсорбції, інактивації токсинів, зниження рівня антигенності замороженої субстанції за умов довготривалої придатності готового продукту зумовлена значним вмістом у ньому широкого спектру амінокислот, колагену, структурних пептидів, а також пептидного епідермального фактора росту, макро- і мікроелементів, причому введення в організм лабораторних тварин супроводжується їх інтенсивною резорбцією і реалізується комплексом біогенних реакцій у вигляді реактивного лейкоцитозу, фагоцитозу, стійкого підвищення резистентності клітинних мембран за участю механізмів мобілізації системи циклічних нуклеотидів клітин крові, посиленням цитобіоенергетичних процесів у лейкоцитах, встановлених методом цитолюмінесцентного аналізу.

UA 68224 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології, а саме до препаратів на основі низькомолекулярних пептидів, виділених із кріоконсервованої 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 ступеня 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 індують проліферацію певних клітинних ліній, включаючи епітеліальні клітини.

Процес нормального загоєння рани включає 3 фази.

1 фаза - фаза запалення (або т.з. "фаза відставання");

2 фаза - фаза формування тканини (або т.з. "фаза проліферації");

3 фаза - фаза ремоделювання тканини.

Запальна фаза починається безпосередньо після утворення рани. Її пусковими моментами є ранові продукти, у першу чергу гістамін (та інші біогенні аміни), еритроцити і тромбоцити. Це спричинює посилений кровоплин і надходження лейкоцитів, фібробластів та сигнальних агентів у рану. До сигнальних агентів належать численні сполуки, у т.ч. фактори росту (що можуть застосовуватися у клінічній практиці), цитокіни, система комплементу, інтерлейкіни і хемокіни. Запальна фаза йде на стихання після 3-4 дня. Репаративна фаза, яка розвивається у наступні 2-3 тижні, характеризується синтезом колагену і скороченням (контракцією) рани.

Надалі настає проліферація клітин, яка веде до неоваскуляризації, утворення фібробластних містків у рані, епітелізації і закриття рани. В цей час відбувається заповнення тканинного дефекту новоутвореною тканиною (включаючи утворення грануляційної тканини і початок крайової епітелізації).

Під час фінальної фази загоєння рани, яка може тривати тижні і навіть місяці, відбувається ремоделювання і нормалізація тканин у ділянці рани.

Всі три фази взаємопов'язані між собою і можуть одночасно перебігати у різних ділянках пошкодження. На кінцевому етапі процесу загоєння рани відбувається відновлення позаклітинного матриксу (з або без формування рубця) і епітеліального покриву.

Патоморфологічно у стінках ранового каналу розрізняють такі зони:

1) первинного некрозу - внутрішня зона, яка характеризується різним ступенем механічних руйнувань;

2) вторинного некрозу - результат прямого руйнування артеріальних судин в момент поранення або їх тромбозу. Зони первинного і вторинного некрозу складають разом зону контузії. Некротичні ділянки можуть розсмоктуватися і виділятися з гноем, розсмоктуватися і організовуватися, тобто замінюватися рубцевою сполучною тканиною. Організація некрозу більш характерна для загоєння рани первинним натягом; відторгнення некротичних тканин характеризує вторинний натяг. За зоною контузії йде зона комоції. У цій зоні механічних руйнувань немає, а порушення в тканинах відбувається на молекулярному рівні;

3) третя зона - це зона місцевого ступору. Патологічні процеси тут проявляються розладами іннервації, кровообігу, порушенням обміну речовин.

Будь-які обставини або чинники, що перешкоджають нормальному перебігові запального процесу, є підставами для утворення проблемної рани.

Найчастіше неадекватна васкуляризація призводить до недостатнього надходження індукторів, субстратних речовин і кисню, які необхідні для загоєння рани. На біохімічному рівні кортикостероїди, антиметаболіти і такі токсичні сполуки, як хімікати й отрути (наприклад отруйних павуків), пригнічують загоєння рани. У багатьох пацієнтів утворенню проблемних ран сприяє комбінація різних чинників.

Важливою проблемою сучасної медицини є розвиток тривало незагоєваних ран. Такі рани найчастіше виникають у хворих з порушеннями трофіки та іннервації шкіри, обумовленими різними 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 холодкових 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/або поява у позаклітинному матриксі компонентів, які в нормі відсутні. Це перешкоджає формуванню базальної мембрани і реепітелізації ранової поверхні.

Місцева терапія залежить від того, в якій стадії знаходиться виразка чи рана. Для лікування виразок чи ран, що погано заживають, використовують препарати, що є тканино специфічними 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 (Полівінокс, 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 (ерозіях, виразках, опіках та ін.). Більш глибокі ураження шкіри гояться з формуванням сполучнотканинного рубця.

Регенеративну дію мають також нейрометаболічні стимулятори, такі як Церебrolізін, Вінпоцетин. Препарат Актовегін - очищений від білка екстракт з крові телят, містить низькомолекулярні пептиди і похідні нуклеїнових кислот. Застосовують Актовегін 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 даний час є декілька повідомлень та результатів рандомізованих контрольованих випробувань, в яких показано ефективність застосування факторів росту. Серед них - PDGF (тромбоцитарний фактор росту) як допоміжний засіб терапії у лікуванні діабетичних виразок ніг. Епідермальний фактор росту (ЕФР) належить до сімейства факторів росту, які регулюють проліферацію, міграцію і диференціювання через зв'язування з рецепторами кіназ в клітинах-мішенях. Було показано, що ЕФР виступає як мітогенний чинник, а також є фактором диференціації для багатьох видів клітин. Препарат ЕБЕРМІН компанії Eber Biotek, що містить ЕФР, показаний до застосування при поверхневих і глибоких опіках різного ступеня тяжкості (I-IV); трофічних виразках (у тому числі при хронічній венозній недостатності, облітеруючому ендартеріїті, цукровому діабеті, бешиховому запаленні), пролежнях тощо.

Ліпосоми - мікроскопічні фосфоліпідні везикули, утворені однією або кількома шаровими мембранами, викликають великий інтерес як транспортний засіб для доставки необхідних речовин до місця призначення. Приєднання до поверхні ліпосом лігандів, здатних специфічно зв'язуватися з антигенами або рецепторами на поверхні клітини, забезпечує спрямований транспорт ліпосом до клітини-мішені. Пегіліровані ліпосоми були запропоновані для орального застосування рекомбінантного епідермального фактора росту людини.

Використання кріоконсервованих матеріалів - один із методів закриття поверхонь ран та стимуляції їх загоювання. Доведено, що екстракт кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней прискорює загоєння ран, нормалізує показники крові та знижує рівень пероксидації ліпідів. Також було встановлено, що екстракт кріоконсервованих фрагментів селезінки нормалізує імунний статус організму, зокрема систему Т-лімфоцитів, які приймають активну участь в регуляції регенерації.

В останні роки все частіше з метою лікування опікових ран застосовують кріоконсервовані ксенотрансплантанти шкіри свині. В результаті впровадження високотехнологічної переробки сировинного субстрату кріоконсервованого ксенотрансплантату було отримано біопродукт з унікальними властивостями. Висока антимікробна резистентність препарату кріоліфікованої ксеногенної шкіри, здатність його до ефективної адсорбції, інактивації токсинів, знижений рівень антигенності кріоліфізованих субстанцій за умов довготривалої придатності готового продукту - все це стало підґрунтям для подальших досліджень. На експериментальних моделях було встановлено, що імплантація клаптів ксеношкіри в організм лабораторних тварин супроводжувалася їх інтенсивною резорбцією і реалізувалася комплексом біогенних реакцій у вигляді реактивного лейкоцитозу, фагоцитозу, стійким підвищенням резистентності клітинних мембран за участю механізмів мобілізації системи циклічних нуклеотидів клітин крові, посиленням цитобіоенергетичних процесів у лейкоцитах, встановлених методом цитолоюмінесцентного аналізу, активним імуномодуляторним ефектом тощо. Висока біологічна активність ксеношкіри зумовлена значним вмістом у ній широкого спектру амінокислот, колагену, структурних білків, а також інших біологічно активних речовин, зокрема поліпептидного епідермального фактора росту, макро- і мікроелементів.

Препарат "Солкосерил" належить до фармакологічної групи стимуляторів регенерації. Препарат містить широкий спектр природних низькомолекулярних речовин - гліколіпіди, нуклеозиди, нуклеотиди, амінокислоти, олігопептиди, незамінні мікроелементи, електроліти, проміжні продукти вуглеводного і жирового обміну. "Солкосерил" покращує споживання кисню клітинами тканин, особливо в умовах гіпоксії, нормалізує процеси метаболізму, транспорт глюкози, стимулює синтез АТФ, прискорює зворотню регенерацію пошкоджених клітин і тканин. Стимулює ангиогенез, сприяє ревазуляції ішемізованих тканин і створенню умов, сприятливих для синтезу колагену і зростання свіжої грануляційної тканини, прискорює реепітелізацію і закриття рани. Він також має мембраностабілізуючий та цитопротекторний ефект. Показаннями до застосування препарату є трофічні порушення (трофічні виразки, передгангрена) на тлі захворювань периферичних судин (облітеруючий ендартеріт, діабетична ангиопатія, варикозне розширення вен); незаживаючі рани, пролежні; хімічні та термічні опіки, відмороження, механічні травми (рани); променевий дерматит, виразки шкіри, опіки.

Тому препарат "Солкосерил" був вибраний як референтний (прототип) при скринінговому дослідженні ефективності препарату, до складу якого входять низькомолекулярні пептиди кріоконсервованої шкіри свиней, що інкорпоровані в ліпосоми.

Технічна задача - дослідження специфічної активності та впровадження в медичну практику нового лікарського засобу із регенеруючим та ранозагоюючим механізмом дії та високою біодоступністю.

Поставлена задача вирішується за рахунок виявленої специфічної активності фармацевтичної композиції на основі низькомолекулярних пептидів, яка полягає у підвищенні регенеративної активності епідермісу, колагенізації дерми та помірній запальній інфільтрації, причому висока антимікробна резистентність препарату, отриманого із попередньо замороженого термального шару шкіри свиней, здатність його до ефективно адсорбції, інактивації токсинів, зниження рівня антигенності замороженої субстанції за умов довготривалої придатності готового продукту, зумовлена значним вмістом у ній широкого спектру амінокислот, колагену, структурних пептидів, а також пептидного епідермального фактора росту, макро- і мікроелементів, причому введення в організм лабораторних тварин супроводжується їх інтенсивною резорбцією і реалізується комплексом біогенних реакцій у вигляді реактивного лейкоцитозу, фагоцитозу, стійкого підвищення резистентності клітинних мембран за участю механізмів мобілізації системи циклічних нуклеотидів клітин крові, посиленням цитобіоенергетичних процесів у лейкоцитах, встановлених методом цитолюмінесцентного аналізу.

Слід зазначити, що при порівнянні стану ранових поверхонь двох дослідних груп тварин, яким застосовували коригуючі чинники, авторами встановлено, що при застосуванні референтного препарату "Солкосерил" в цей термін спостереження розлади кровообігу були більш вираженими, ніж у групі тварин, де корекція здійснювалася препаратом за корисною моделлю у вигляді спрею.

При гістологічному дослідженні ранової поверхні шкіри тварини на 7 добу експерименту авторами спостерігалися наступні зміни. Ділянка дефекту тканини була прикритою кірочкою, яка складалась переважно із еритроцитів та фібрину (рис.). Лейкоцитарна інфільтрація була незначною. Базальна мембрана була слабосформованою, проте в її проекції переважали явища лімфогістіоцитарної інфільтрації.

На рисунку зображено гістологічну структуру шкіри тварини в ділянці ранової поверхні на 7 добу експерименту. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Х 180. Наведені результати експериментальних досліджень дають змогу оцінити динаміку показників ендогенної інтоксикації в крові піддослідних щурів із змодельованим пошкодженням шкіри.

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

Таблиця

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

Групи тварин	Доби	ЕІІ, %	K_{MCM}
1	2	3	4
Інтактні	0	$58,25 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,03$

Продовження таблиці

1	2	3	4
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 раню. Аналогічна динаміка спостерігалася і при застосуванні референтного препарату "Солкосерил". У групі тварин із пошкодженням шкіри, які як коригуючий чинник отримували цей препарат, ЕІІ була на 19,9 % нижчим ніж у групі нелікованих тварин.

В наступні дні експерименту (7 та 14 доба) 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.

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 $(0,82 \pm 0,03)$ до $(1,94 \pm 0,10)$, що на 136,6 % перевищує аналогічний параметр у щурів інтактної групи. На 7 та 14 добу 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 інтактної групи. Аналогічна динаміка спостерігалася і при застосуванні референтного препарату.

Таким чином, при застосуванні як досліджуваного, так і референтного препаратів авторами відмічено їх позитивний вплив, що призвело до зниження рівня токсемії за рахунок зменшення проникності еритроцитарних мембран та зниження вмісту середньомолекулярних пептидів.

Технічний результат:

1. Досліджуваний препарат за корисною моделлю у вигляді спрею та препарат порівняння "Солкосерил" желе проявляють регенеративну ранозагоючу дію, на що вказує ефективне зменшення площі ранової поверхні у всі терміни спостереження при місцевому застосуванні обох засобів.

2. На 3 добу експерименту гістологічно встановлено більш виражені порушення кровообігу в рановому каналі у групі тварин, котрим наносили препарат "Солкосерил", у порівнянні з тими, де корекція здійснювалася препаратом за корисною моделлю у вигляді спрею.

3. При застосуванні препарату за корисною моделлю у вигляді спрею процес загоєння рани характеризувався відсутністю інфікування, правильною стадійністю, поступовою регенерацією епідермісу, колагенізацією дерми, появою придатків шкіри та гіперплазією капілярної сітки.

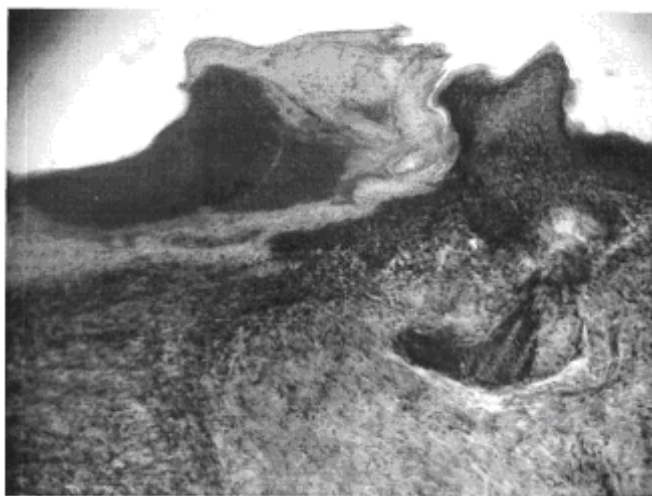
4. При застосуванні препарату "Солкосерил" желе процес загоєння рани характеризувався відсутністю інфікування, вираженою проліферацією судин базальної мембрани та структурних елементів епідермісу, підвищеною макрофагальною інфільтрацією дерми, гіперплазією та каналізацією судин дерми із повнокров'ям та стазами, підвищеною колагенізацією волокон дерми, що може спровокувати розвиток келоїдного рубця.

5. Використання як досліджуваного препарату за корисною моделлю у вигляді спрею, так і референтного препарату "Солкосерил" желе призвело до зниження рівня токсемії, на що вказувало зменшення проникності еритроцитарних мембран та зниження вмісту середньомолекулярних пептидів у сироватці крові.

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 та Інституту екології та токсикології ім. Л.І. Медведя. Готується промислове впровадження.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Фармацевтична композиція ранозагоючої та регенеруючої дії на основі низькомолекулярних пептидів, що має специфічну активність, яка полягає у підвищенні регенеративної активності епідермісу, колагенізації дерми та помірній запальній інфільтрації, яка **відрізняється** тим, що висока антимікробна резистентність препарату, отриманого із замороженого дермального шару шкіри свиней, здатність його до ефективної адсорбції, інактивації токсинів, зниження рівня антигенності замороженої субстанції за умов довготривалої придатності готового продукту зумовлена значним вмістом у ньому широкого спектру амінокислот, колагену, структурних пептидів, а також пептидного епідермального фактора росту, макро- і мікроелементів, причому введення в організм лабораторних тварин супроводжується їх інтенсивною резорбцією і реалізується комплексом біогенних реакцій у вигляді реактивного лейкоцитозу, фагоцитозу, стійкого підвищення резистентності клітинних мембран за участю механізмів мобілізації системи циклічних нуклеотидів клітин крові, посиленням цитобіоенергетичних процесів у лейкоцитах, встановлених методом цитолюмінесцентного аналізу.



Комп'ютерна верстка А. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601