

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в фармакологии и медицине.

Дифференциация клетки происходит при различных физиологических процессах в организме и, в первую очередь, при нарушениях функции иммунной системы и соответствующих последствий этого нарушения, в частности - образовании злокачественных опухолей, нарушении кроветворения и т.п.

Наиболее близким к заявляемому решению является способ получения лечебного средства, регулирующего дифференциацию клетки и предназначенного для лечения и профилактики рака (Патент Франции №2451193, 1979).

Известный способ состоит в измельчении эмбрионов животных, их гомогенизации в физиологическом растворе, получении экстракта эмбрионального комплекса веществ и отделении образовавшегося осадка посредством фильтрования, после чего к фильтрату добавляют антибиотик. В результате осуществления указанной последовательности действий получают лечебный препарат полного эмбрионального комплекса. Лечение полученным препаратом состоит в необходимом курсе инъекций.

Способ-прототип достаточно просто выполнить, однако он не может обеспечить получение высокоэффективного препарата, поскольку не предусматривает расщепления высокомолекулярных предшественников и активизацию регуляторных пептидов. Полученный препарат содержит форменные элементы и высокомолекулярные белки, что в значительной мере определяет его побочное действие, проявляющееся в аллергии и в ее грозном осложнении - анафилактическом шоке.

Задачей настоящего изобретения является создание способа получения лечебного средства, регулирующего дифференциацию клетки, который посредством совокупности предусматриваемых в нем действий и режимов, направленных на активизацию одних белково-пептидных компонентов и нейтрализацию других, обеспечивает высокую эффективность получаемого препарата и исключает его побочное действие.

Поставленная задача решается тем, что в способе получения лечебного средства, регулирующего дифференциацию клетки, заключающемся в измельчении эмбриональных тканей животного, их гомогенизации и экстракции в физиологическом растворе, отделении осадка от раствора, согласно изобретению, в качестве эмбриональных тканей берут мышечные ткани животного, гомогенат выдерживают в течение 10 - 20ч, а после экстракции выдерживание раствора осуществляют в течение $24 \pm 0,5$ ч, затем после отделения образовавшегося осадка, полученный раствор дополнительно разбавляют физиологическим раствором до достижения концентрации белка в нем 15 - 25мг/мл и добавляют к нему консервант в количестве не менее 0,05%, после отделения образовавшейся взвеси раствор выдерживают в течение 48ч, стерилизуют и термостатируют его в течение не менее 3 - х сут при температуре 36°C, после чего раствор выдерживают 30 - 40сут при температуре, не превышающей 15°C, и удаляют образовавшуюся взвесь, а раствор подвергают взаимодействию с иммобилизованным протеолитическим ферментом, причем режим указанного взаимодействия устанавливают исходя из контрольной пробы получаемого средства.

Авторами предложенного способа предусмотрены особенности получения белково-пептидного комплекса (ВПК), представляющего собой средство, обладающее определенной специфичностью и необходимым качеством.

Использование в качестве сырья эмбриональных мышечных мягких тканей животного отвечает специфичности получаемого средства. Выдерживание гомогената указанных тканей в течение 10 - 20ч обусловлено биосинтезом экстремальных белков, от природы которых зависит качество получаемого лечебного средства. При времени больше указанного происходит ухудшение качества препарата, т.к. образуются некротические белки, вызывающие токсикоз. При меньшем времени выдержки также получают препарат низкого качества.

После экстракции ВПК в физрастворе предложено выдерживать раствор в течение 24ч - при таких условиях достигается максимальная полнота экстракции, при выдержке раствора за пределами указанного времени резко изменяется качество получаемого препарата. В процессе выдержки формируются предшественники активных белков, которые и определяют специфичность препарата.

На этой стадии биосинтеза образуется осадок нерастворимых белков (тканевых, плазматических и др.), их отделяют, а полученный раствор дополнительно разбавляют физраствором до достижения концентрации белков 15 - 20мг/мл, таким образом задают оптимальные условия для последующего проведения протеолиза.

Добавление к полученному раствору консерванта в количестве не менее 0,05% предназначено для противомикробного, противогрибкового и т.п. обеззараживания получаемого препарата.

Образовавшуюся взвесь, представляющую собой белки, мембраны, структурные белки, липидные частицы и др. отделяют, поскольку последующий процесс аутолиза будет распространяться и на них, что неблагоприятно отражается на качестве лечебного средства.

Оставшийся раствор выдерживают в течение 48ч. Экспериментально доказано, что этого времени достаточно для завершения процессов агрегации частиц. Полученный раствор стерилизуют для удаления вирусов, бактерий, хламид, грибов и т.п. Стерилизацию можно выполнить любым, из принятых в данной области, методом в соответствии с требованиями ВОЗ.

Следующие действия над полученным раствором БНК относятся к аутолизу. Термостатирование раствора осуществляют в течение не менее 3 - х суток при температуре $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Выбор времени термостатирования при данной температуре обусловлен достижением максимальной специфичности получаемого средства.

Процессы, происходящие на этой стадии, могут быть определены как инактивация ростового фактора и, кроме того, при этом большие белки расщепляются на куски, что делает получаемый препарат неиммуногенным.

Дальнейшее выдерживание раствора в течение 30 - 40сут при температуре не выше 15°C определено следующими факторами - при этих условиях мягко заканчивается процесс аутолиза с одновременной агрегацией образовавшихся частиц, которые отделяют.

Оставшийся раствор БНК подвергают протеолизу на иммобилизованном протеолитическом ферменте, например на заполненной им колонке.

Изобретение поясняется примером конкретного выполнения.

Пример. Для получения лечебного средства, регулирующего дифференциацию клетки, берут эмбриональные мышечные ткани крупного рогатого скота. Отобранное сырье измельчают, гомогенизируют при температуре, не превышающей 8°C, гомогенат выдерживают в течение 16ч, разбавляют охлажденным физиологическим раствором, затем после экстракции раствор дополнительно выдерживают при температуре 4 - 8°C в течение 24ч.

В процессе выдерживания образуется осадок, который отделяют центрифугированием при скорости 3000g в течение 1ч при температуре 2 - 4°C.

Полученный раствор разбавляют физиологическим раствором до достижения концентрации белка в нем 21мг/мл, добавляют по каплям консервант, например хиназол, до достижения его концентрации в растворе ВПК 0,05%. Затем отделяют образовавшуюся взвесь посредством пропускания раствора через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45мкм и выдерживают фильтрат в течение 48ч.

После этого производят стерилизацию раствора, например посредством пропускания его в асептических условиях через мембранный фильтр с размером пор 0,22мкм. Полученный таким образом стерильный раствор герметически закрывают и термостатируют в течение 3 - 4сут при температуре 36°C. После термостатирования раствор выдерживают 35сут при температуре, не превышающей 15°C, образовавшуюся взвесь отделяют центрифугированием, а фильтрат дополнительно пропускают через фильтр с размером пор 0,45мкм.

Полученный раствор ВПК пропускают через колонку (при температуре 25 - 30°C), заполненную агарозой 4В, иммобилизованной ферментом, например трипсином.

Скорость элюции раствора ВПК устанавливают, исходя из соответствия электрофореграммы элюата с контрольной электрофореграммой ВПК.

Полученную жидкость в асептических условиях стерилизуют путем пропускания ее через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22мкм, после чего заливают в ампулы и запаивают.

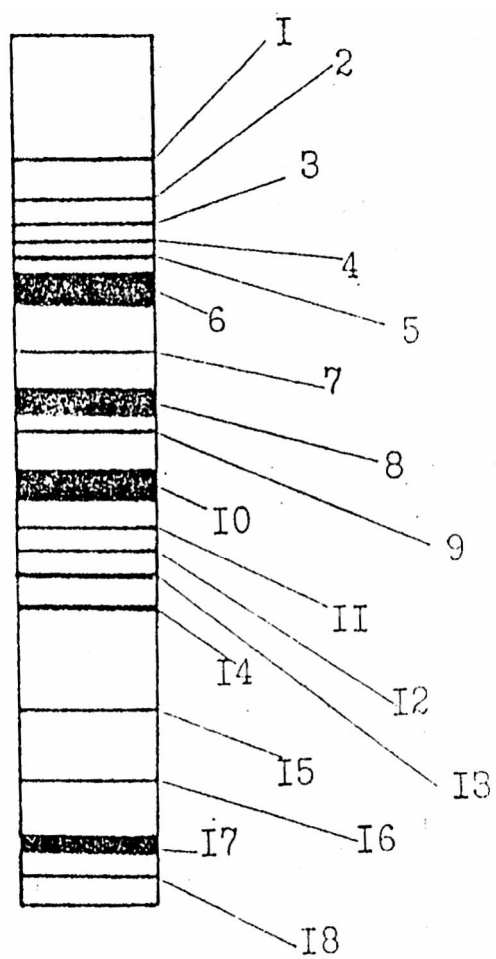
Полученное средство представляет собой прозрачную жидкость с легким желтым оттенком без запаха, которая может смешиваться с водой или физиологическим раствором в любых соотношениях. При температуре $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ жидкость имеет плотность 1,0106г/см, показатель преломления при температуре $20 \pm 0,3^\circ\text{C}$ - $1,3410 \pm 0,0004$, водородный показатель рН 6,5 - 7,0.

На чертеже (фиг.) представлена контрольная электрофореграмма полученного препарата, где электрофорез в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Объем нанесенного раствора белка - 0,03мл, сила тока - 80мА, напряжение - 220V, продолжительность электрофореза - 2 часа.

Электрофоретическая подвижность компонентов ВПК (см):

1 - 1,6; 2 - 2,1; 3 - 2,4; 4 - 2,6; 5 - 2,8; 6 - 3,0; 7 - 4,0; 8 - 4,5; 9 - 5,0; 10 - 5,5; 11 - 6,2; 12 - 6,5; 13 - 6,8; 14 - 7,2; 15 - 8,5; 16 - 9,4; 17-10,1; 18-10,6.

Таким образом, в результате заявленного способа получено лечебное средство, регулирующее дифференциацию клетки ("Пропес"), на которое имеется фармстатья и которое широко испытано на больных. Средство признано как высокоэффективное при лечении заболеваний, сопровождающихся нарушением дифференциации клетки.



Контрольная электрофореграмма.

Фиг.