

Изобретение относится к медицинской промышленности, в частности к способам получения иммуноактивных веществ из околоплодных тканей человека,

Наиболее близким к заявляемому является способ получения экстракта плаценты, в соответствии с которым охлажденную плаценту из холодильного шкафа переносят в бокс, отделяют от нее пупочные канатики, околоплодные пузыри, ополаскивают двухкратным погружением в дистиллированную воду, очищают от серозной оболочки и измельчают на мясорубке (крупная сетка). В емкость с паровой рубашкой подают воду для инъекций (60л), а затем измельченную плаценту в марлевом мешке (15кг) при соотношении массы плаценты к массе воды 1 : 4. Содержимое емкости доводят до кипения и кипятят в течение  $5 \pm 3$  мин при постоянном перемешивании до получения прозрачного раствора. Затем прекращают подачу пара и в течение одного часа холодной водой охлаждают емкость с концентратом плаценты, который затем передают под давлением в реактор через фильтр с перфорированной катушкой. Отфильтрованный концентрат плаценты смешивают с натрия хлоридом из расчета 10г на 1л концентрата (1 : 100), полученную смесь тщательно перемешивают в течение  $40 \pm 3$  мин, после чего вторично фильтруют. Отфильтрованный концентрат плаценты под вакуумом разливают в десятилитровые стеклянные емкости и стерилизуют в реакторе в течение 30 мин при температуре  $(113 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Затем концентрат под вакуумом переливают из емкости в реактор, где охлаждают посредством подачи в рубашку реактора оборотной воды. После охлаждения проверяют соответствие экстракта плаценты требованиям ФС 42 - 1491 - 87, фильтруют его под вакуумом при охлаждении до  $(10 \pm 3)^\circ\text{C}$  в полиэтиленовую емкость через фильтр с перфорированной катушкой, после чего передают на розлив и ампулирование.

К причинам, препятствующим получению технического результата, достигаемого в заявляемом способе, следует отнести следующие: глубокая термическая обработка продукта (экстракция кипячением, стерилизация), громоздкость и длительность процесса (многократная фильтрация под вакуумом и при охлаждении почти на  $100^\circ\text{C}$  с неоднократной передачей продукта в различные емкости), затруднения при стандартизации целевого продукта, относительно низкий выход целевого продукта.

В основу изобретения поставлена задача создания такого способа получения иммуноактивных веществ из околоплодных тканей человека, который за счет совокупности и последовательности стадий, режимов и параметров позволил бы достичь более высокого выхода целевого продукта с одновременным упрощением технологии, а также получить препарат, обладающий широким спектром действия, лишенный токсичности и аллергизирующих свойств.

Поставленная задача решается тем, что в способе получения иммуноактивных веществ из околоплодных тканей человека, включающем подготовку и измельчение сырья, экстракцию его водой очищенной, фильтрацию экстракта,

стерилизацию, розлив и ампулирование полученного продукта, в соответствии с изобретением в качестве сырья используют амниотические оболочки плода человека, подготовку сырья проводят путем обезжиривания его ацетоном при соотношении 1 : 3 - 1 : 5, измельчение осуществляют до величины частиц 0,1мм - 0,1мм, экстракцию проводят при соотношении сырья : экстрагент 1 : 2 - 1 : 2,5 при температуре  $4 - 10^\circ\text{C}$  и pH 3,5 - 4,5, фильтрацию осуществляют на ультрафильтрационной установке, после чего проводят лиофильную сушку полученного продукта с последующим его разведением в изотоническом растворе при соотношении 1 : 6 - 1 : 10 и лиофильной сушкой после ампулирования, причем в экстрагируемую смесь для установления pH 3,5 - 4,5 добавляют хлористоводородную или уксусную кислоту.

Технический результат, достигаемый в результате осуществления изобретения, заключается в уменьшении количества и снижении трудоемкости стадий, сокращении времени выполнения процесса, в полном и экономичном использовании сырья, повышении выхода целевого продукта.

Способ осуществляется следующим образом.

Размороженную и отмытую от крови амниотическую оболочку с целью обезжиривания заливают охлажденным ацетоном при соотношении 1 : 3 - 1 : 5, выдерживают при температуре  $0 - 10^\circ\text{C}$  в течение 3 - 4ч.

Затем ацетон удаляют, оболочки промывают проточной, а затем очищенной водой до исчезновения запаха ацетона. Отмытые и обезжиренные оболочки подвергают грубому измельчению на мясорубке, затем смешивают с охлажденной ( $4 - 10^\circ\text{C}$ ) очищенной водой при соотношении 1 : 2 - 1 : 2,5 и получаемую массу гомогенизируют на дезинтеграторе до величины частиц 0,1мм - 0,1мм. Тонкоизмельченную суспензию загружают в экстрактор, добавляют концентрированную хлористоводородную или уксусную кислоту до pH 3,5 - 4,5 и экстрагируют при периодическом перемешивании в течение 3 - 4ч при температуре  $4 - 10^\circ\text{C}$ , после чего на центрифуге отделяют жидкую фазу. Полученный экстракт разделяют на ультрафильтрационной установке с целью получения низкомолекулярной фракции, которую подвергают лиофильной сушке во флаконах и укупоривают.

Препарат получают путем растворения при перемешивании лиофилизированного порошка в изотоническом растворе при соотношении 1 : 6 - 1 : 10 при температуре  $4 - 10^\circ\text{C}$ . Полученный раствор обрабатывают методом стерильной фильтрации (диаметр пор фильтра 0,22мм), затем разливают в ампулы, подвергают лиофильной сушке и запаивают. Выход целевого продукта составляет 3,2 - 3,6г в пересчете на 1кг исходного продукта.

Пример 1. 1кг размороженных, отмытых от крови амниотических оболочек заливают 3л охлажденного ацетона (1 : 3), выдерживают при температуре  $0^\circ\text{C}$  в течение 3ч. Затем ацетон удаляют, оболочки промывают проточной, а затем очищенной водой до исчезновения запаха ацетона. Отмытые и обезжиренные оболочки подвергают грубому измельчению на мясорубке, затем смешивают с охлажденной очищенной водой при соотношении 1 : 2, и полученную массу гомогенизируют на дезинтеграторе до величины

частиц 0,1мкм - 0,1мм.

Полученную тонкоизмельченную суспензию загружают в экстрактор, добавляют концентрированную хлористоводородную кислоту до pH 3,5 и экстрагируют при периодическом перемешивании в течение 3ч при температуре 4°C, после чего на центрифуге отделяют жидкую фазу. Полученный экстракт разделяют на ультрафильтрационной установке с целью получения низкомолекулярной фракции, которую подвергают лиофильной сушке во флаконах и укупоривают.

Препарат получают путем растворения при перемешивании лиофилизированного порошка в изотоническом растворе при соотношении 1 : 6 при температуре 4°C. Полученный раствор обрабатывают методом стерильной фильтрации (диаметр пор фильтра 0,22мкм), затем разливают в ампулы, подвергают лиофильной сушке и запаивают. Выход целевого продукта составляет 3,2г в пересчете на 1кг исходного продукта.

Пример 2. 1кг размороженных, отмытых от крови амниотических оболочек заливают 4л охлажденного ацетона (1 : 4), выдерживают при температуре 6°C в течение 3,5ч. Затем ацетон удаляют, оболочки промывают проточной, а затем очищенной водой до исчезновения запаха ацетона. Отмытые и обезжиренные оболочки подвергают грубому измельчению на мясорубке, затем смешивают с охлажденной очищенной водой при соотношении 1 : 2, и полученную массу гомогенизируют на дезинтеграторе до величины частиц 0,1мкм - 0,1мм.

Полученную тонкоизмельченную суспензию загружают в экстрактор, добавляют концентрированную уксусную кислоту до pH 4,0 и экстрагируют при периодическом перемешивании в течение 3,5ч при температуре 6°C, после чего на центрифуге отделяют жидкую фазу. Полученный экстракт разделяют на ультрафильтрационной установке с целью получения низкомолекулярной фракции, которую подвергают лиофильной сушке во флаконах и укупоривают.

Препарат получают путем растворения при перемешивании лиофилизированного порошка в изотоническом растворе при соотношении 1 : 8 при температуре 6°C. Полученный раствор обрабатывают методом стерильной фильтрации (диаметр пор фильтра 0,22мкм), затем разливают в ампулы, подвергают лиофильной сушке и запаивают. Выход целевого продукта составляет 3,4г в пересчете на 1кг исходного продукта.

Пример 3. 1кг размороженных, отмытых от крови амниотических оболочек заливают 5л охлажденного ацетона (1 : 5), выдерживают при температуре 10°C в течение 4ч. Затем ацетон удаляют, оболочки промывают проточной, а затем очищенной водой до исчезновения запаха ацетона. Отмытые и обезжиренные оболочки подвергают грубому измельчению на мясорубке, затем смешивают с охлажденной очищенной водой при соотношении 1 : 2,5 и полученную массу гомогенизируют на дезинтеграторе до величины частиц 0,1мкм - 0,1мм.

Полученную тонкоизмельченную суспензию загружают в экстрактор, добавляют концентрированную хлористоводородную кислоту до pH 4,5 и экстрагируют при периодическом перемешивании в течение 4ч при температуре 10°C, после чего на центрифуге отделяют жидкую

фазу. Полученный экстракт разделяют на ультрафильтрационной установке с целью получения низкомолекулярной фракции, которую подвергают лиофильной сушке во флаконах и укупоривают.

Препарат получают путем растворения при перемешивании лиофилизированного порошка в изотоническом растворе при соотношении 1 : 10 при температуре 10°C. Полученный раствор обрабатывают методом стерильной фильтрации (диаметр пор фильтра 0,22мкм), затем разливают в ампулы, подвергают лиофильной сушке и запаивают. Выход целевого продукта составляет 3,6г в пересчете на 1кг исходного продукта.

Использование в качестве исходного сырья амниотических оболочек плода человека, а не всей плаценты, как в прототипе и аналогах, является наиболее рациональным, так как в результате экспериментальных и теоретических исследований установлено, что именно в этих тканях содержится наибольшее количество веществ и их компонентов, необходимых для получения препарата с заданными свойствами.

Количество ацетона, меньше заявляемых значений, недостаточно для необходимой степени обезжиривания сырья: использование количества ацетона больше заявляемых значений нецелесообразно при условии рационального использования дефицитного растворителя.

Измельчение сырья до величины частиц заявляемых значений является оптимальным для достижения максимального выхода, целевого продукта: при больших размерах частиц не полностью экстрагируется и идет в отходы ценное сырье; при измельчении сырья до частиц меньше заявляемых значений наблюдается нарушение структуры основных действующих веществ, а значит, и снижение специфической активности.

Заявляемые соотношения сырья и экстрагента определены экспериментально: при количестве экстрагента меньше заявляемых значений (1 : 2) наблюдается снижение скорости экстракции; при количестве экстрагента больше заявляемых значений (1 : 2,5) наблюдается разбавление раствора по основному веществу, что отрицательно влияет на осуществление последующих стадий и в конечном счете, значительно снижает выход целевого продукта.

При температуре экстракции ниже заявляемых значений (4°C) снижается скорость экстракции, а при температуре выше 10°C возможно осуществление ферментативных реакций, продукты которых отрицательно влияют на качество и физико-химические характеристики целевого продукта.

При pH экстрагируемой смеси ниже 3,5 происходит экстракция физиологически активных веществ, присутствие которых отрицательно воздействует на уровень и характер специфической активности целевого продукта, "засоряет" его. При pH экстрагируемой смеси выше 4,5 наблюдается значительное снижение выхода экстрактивных веществ с заданными характеристиками.

Содержание растворяемого в изотоническом растворе целевого продукта (соотношение 1 : 6 - 1 : 10) обусловлено содержанием физиологически активных веществ - дозой препарата.

Физико-химические характеристики продукта, получаемого по заявляемому способу. Леофильно

высушенный порошок белого цвета, растворим в воде, спирте; pH 4,0 - 5,0; зола - около 5%; пептиды - 3 - 5мг/мл; белок - 0,59 - 1мг/мл; углеводы - 1 - 1,5мг/мл; фосфор - не менее 45мкг/мл; нуклеиновые кислоты - 12 - 16мкг/мл.

Таким образом, заявляемый способ по сравнению с прототипом и аналогами более краток по времени выполнения, имеет меньшее количество трудоемких стадий, более экономичен за счет снижения энергозатрат и полного использования сырья (см. таблицу).

Заявляемый способ позволяет получить растворимый физиологически активный комплекс веществ с молекулярной массой 1 - 10 тыс. дальтон. Изучение полученного препарата позволило выявить его полуфункциональность и дозозависимые фармакологические эффекты, связанные с основными действующими веществами - регуляторными пептидами. Установлено иммуномодулирующее действие препарата, выраженное во влиянии на гуморальные и клеточные звенья иммунитета; коллагенолитическое и токолитическое действия; ярко выраженное седативное и антистрессорное действие с одновременным отсутствием токсичности и аллергенных свойств.

7	Кипячение полученной смеси в течение 40 ±3 мин	7	Получения ли
8	Фильтрация продукта под вакуумом и розлив в десятилитровые емкости	8	Стери.
9	Стерилизация фильтрата в автоклаве в течение 30 мин при температуре 113±1°C	9	Лиоф
10	Охлаждение концентрата плаценты		
11	Проверка продукта на соответствие ФС 42-1491-87		
12	Фильтрация концентрата под вакуумом с охлаждением до 10±3°C		
13	Розлив и ампулирование целевого продукта, стерилизация ампул		

Таблица

Сравнительный анализ заявляемого способа и способа-прототипа

Прототип		Заявляемый способ	
1	Подготовка сырья (выдерживание в холодильном шкафу при T = 4°C в течение 6-7 суток с последующей очисткой и отмыванием плаценты)	1	Подготовка сырья (размораживание, отмывание, обезжиривание оболочек ацетоном при соотношении сырье : ацетон 1 : (3-5), удаление ацетона), 6 ч
2	Измельчение плаценты (грубое на мясорубке) с последующим смешиванием с дистиллированной водой при соотношении 1 : 4	2	Измельчение амниотических оболочек (грубое - на мясорубке, тонкое - гомогенное) с последующим смешиванием с охлажденной дистиллированной водой при соотношении 1 : (2-2,5)
3	Экстракция кипящей дистиллированной водой в течение 2-8 мин до получения прозрачного раствора - концентрата плаценты	3	Экстракция суспензии с добавлением концентрированной хлористоводородной или уксусной кислоты (до pH 3,5-4,5) при периодическом перемешивании при T = 4-10°C
4	Охлаждение концентрата плаценты (1 ч)	4	Отделение жидкой фазы на центрифуге
5	Фильтрация концентрата плаценты под вакуумом	5	Фильтрация на ультрафильтрационной установке до отделения низкомолекулярной фракции пептидов
6	Смешивание концентрата плаценты с натрия хлоридом (1 : 100) в течение 10 ±3 мин	6	Лиофильная сушка продукта во флаконах с последующей его укупоркой.