

Винахід відноситься до медичної і мікробіологічної промисловості, до галузі біотехнології, і може бути використаний в медицині як лікарський засіб при імунodefіцитах різного походження, в пульмонології для лікування бронхів, легень, органів черевної порожнини, статевих органів, лікуванні сезонно-хронічних захворювань, в онкології при лікуванні злоякісних пухлин молочної залози, легень, репродуктивних органів, пухлин шлунково-кишкового тракту, при гострих і хронічних променевих ураженнях, в хірургії і онкохірургії в передопераційний і післяопераційний періоди, в косметології для лікування колоїдних і гнійно-септичних ураженнях шкіри і інших захворюваннях.

Відомо, що в наш час імунна недостатність - загальний бич суспільства. Близько 70% населення України мають первинні, вторинні чи надбані імунodefіцити або недостатній імунний стан, що призводить до виникнення багатьох хвороб. Постійне порушення людиною екосистеми, застосування в лікувальній практиці антибактеріальних, хіміотерапевтичних та гормональних засобів без врахування біологічних законів поступово призводять організм до повної втрати звичного бактеріального внутрішнього середовища, симбіоз із яким існував багато тисячоліть, змінює функціонування імунологічної системи, ферментів, розхищує генетичну стабільність його внутрішнього середовища. Нарешті антропогенне забруднення довкілля (в тому числі і радіаційне) сприяло виникненню мутантних форм бактерій, вірусів та грибів. Як наслідок - виникнення алергій, аутоімунних захворювань, кандидомікозів та дисбактеріозів, що стають супутнім тлом більшості захворювань, післяопераційних та травматичних станів, лікарської та променевої терапії, зумовлює виникнення багатьох фатальних захворювань, таких як рак, СНІД та інших.

Крім того, з'явився новий тип хвороби - дегенеративний, із значною зміною структури клітин, для відновлення якої необхідні зусилля всього організму і особливо імунної системи. Тому монотерапевтичне лікування, наприклад, хіміотерапія тільки цитоксичними, протипухлинними препаратами малоефективне і не дає бажаних результатів, навіть у провідних клініках світу.

Нині не можна визнати лікування будь-якого захворювання кваліфікованим, якщо не враховано імунний статус хворого організму.

Застосування імуномодуючих препаратів сприяє повнішому та стабільнішому одужанню, скороченню терміну перебігу хвороби, запобігає хронізації та рецидивам захворювання.

Імуномодулятори - препарати хімічної або біологічної природи, які здатні модулювати (стимулювати, пригнічувати або нормалізувати) захисні реакції організму, тобто вони здатні виправляти помилки імунної системи.

Імуномодулятори виготовляють із мікробів, дріжджів, рослин, гормонів, різних тканин людського чи тваринного організму або отримують синтетичним шляхом.

Найбільш перспективними для масового використання в медицині вважаються мікробні імуномодулятори, в зв'язку з необмеженою доступністю вихідної сировини і більших можливостей, які відкриваються відбором і штучним мутагенезом продуцентів для направленої біосинтезу.

Відомі імуномодулятори, такі як:

Продігіозан - високомолекулярний ліпополісахаридний комплекс, виділений із мікроорганізму *Bacillus prodigiosus*, що є засобом, який стимулює фактори специфічної і неспецифічної резистентності організму, має інтерферонову активність, активізує Т-систему імунітету і функцію кори надниркових залоз.

Пірогенал - ліпополісахарид, що утворюється в процесі життєдіяльності мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa* і інші, за характером дії подібний до Продігіозану (М.А. Машковский, «Лекарственные средства», ч.ІІ, Москва, «Медицина», 1994г., стр.201, 202.).

Граноцит - рекомбінантний глікопротеїд, еквівалент людського гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору, виділеного із культури клітин СНО-2 людини, застосовується при нейтропенії у хворих, які одержують хіміотерапевтичні, протипухлинні засоби після трансплантації кісткового мозку.

Лейкомакс - рекомбінантний людський гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (РЛГМ-КСФ). Являє собою водорозчинний негліколізований білок, що містить ізолейцин в положенні 100. Виробляється штамом *Escherichia coli* з використанням генної інженерії, підсилює фагоцитоз і імунітет при лікуванні злоякісних хвороб.

Нейпоген - високоочищений негліколізований білок, що складається із амінокислот, які виробляються штамом *Escherichia coli* з використанням генної інженерії, застосовується при лікуванні онкологічних захворювань.

Рибомуніл (непрямий аналог препарату, що заявляється) - бактеріальний препарат, який має імунокорегуючий ефект, властивості пероральної вакцини і неспецифічного імуностимулятора. Частково одержаний із бактерій, які найчастіше спричиняють інфекційні захворювання ЛОР-органів і дихальних шляхів і застосовується для лікування ЛОР-органів і дихальних шляхів. (Справочник «PHRMIN-DEX», лекарственные препараты, 1998г, изд. «Морион LTD».

Вищеназвані препарати мають вузький спектр фармакологічної дії, побічні дії, складні в одержанні, мають високу токсичність.

Останнім часом велику увагу дослідники приділяють розробці імуномодуляторів на основі різних штамів молочнокислих бактерій - мікроорганізмів, які мають значні імуномодуючі, протипухлинні, протинфекційні та протирадіаційні властивості, а також знижують небажану токсичну дію лікарських препаратів та променевої терапії (Урядовий кур'єр, №239, 22.12.2001р.)

В основу даного винаходу поставлена задача в одержанні нетоксичного імуномодуючого препарату зі стабільними властивостями і складом, широким спектром фармакологічної дії при високій активності, без використання в технології шкідливих речовин і складних схем виділення і очистки.

Найбільш близьким до заявленого за способом одержання є імуностимулятор пролонгуючої дії, одержаний із клітинних стінок культури *Lactobacillus bulgaricus* (а.с. СРСР №1630830, 1991р.), оброблений трихлороцтовою кислотою з подальшою ультрафільтрацією, обробкою водним розчином сополімеру N-вінілпіролідону з акролеїном з послідовною сублімацією. Недоліками при одержанні є використання токсичних речовин, багатостадійність виділення і очистки, нестабільність препарату. Препарат не одержав широкого застосування.

Аналогів в Україні заявлений нами препарат не має.

Рішення задачі полягає в одержанні імуномодулятора Бластен на основі субстанції природного імуномодулятору Бластолен, яка одержана з біомаси молочнокислих бактерій виду *Lactobacillus bulgaricus*, також додатково містить допоміжну речовину (нейтральний носій) вуглеводної природи - частково гідролізований

декстран, полімер глюкози середньомолекулярної фракції з молекулярною вагою від 30000 дальтон до 70000 дальтон, при цьому ефективна кількість Бластолену з 30% вмістом пептидів на одну лікарську дозу складає від 0,0017г до 0,0023г, решта - допоміжна речовина.

При цьому одержують нетоксичний імуномодулятор зі стабільними властивостями і складом, широким спектром фармакологічної дії.

Основні фізико - хімічні властивості: ліофілізований порошок білого кольору, легко розчинний у воді та фізіологічному розчині натрію хлориду з утворенням безбарвного прозорого розчину, практично нерозчинний у спирті, ефірі та хлороформі.

Фармакологічні властивості (дані Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, ІЕПОР):

- імуномодуюча дія - нормалізує показники гуморального та клітинного імунітету, стимулює Т-клітинну ланку імунної системи, сприяє збереженню ендокринної функції тимусу, підвищує рівні інтерлейкінів 1 та 2, нормалізує вміст імуноглобулінів у сироватці крові хворих, стимулює неспецифічний захист організму, посилює фагоцитоз, зменшує рівень імунних комплексів;

- гепатопротекторна - захищає лейкопоез, особливо при нейтропенії, підвищує рівень лейкоцитів при вторинних лейкопеніях;

- покращує мікроциркуляцію крові, стимулює регенераторні процеси;

- радіопротекторна та антигіпоксантична дія;

- протипухлинна та антиметастатична дія.

Препарат не має місцевоподразнювальної, ембріотоксичної, мутагенної та тератогенної дії.

Спільними з прототипом ознаками є:

- використання для одержання препарату біомаси культури *Lactobacillus bulgaricus*;

- одержання субстанції обробкою клітин біодеградуючими агентами.

Відмінними ознаками є:

- використання удосконалених варіантів штаму *Lactobacillus bulgaricus*;

- більш досконалий спосіб одержання субстанції, без застосування токсичних речовин;

- стабільний препарат зі стабільними властивостями і широким спектром фармакологічної дії.

Субстанцію Бластолен одержують шляхом культивування молочнокислих бактерій *Lactobacillus bulgaricus*, а одержану біомасу клітин піддають біодеградації лужним гідролізом з використанням концентрованого розчину натрію гідроксиду при температурі (40-58)°C і далі ферментативним гідролізом з використанням розчину лізоциму концентрацією (0,2-0,6)%.

Готову лікарську форму препарату для ін'єкцій - Бластен одержують розчиненням субстанції у воді для ін'єкцій з додаванням наповнювача (допоміжної речовини) декстрана, стерильним розливом розчину препарату у флакони і сублімаційною сушкою при температурі мінус (30-40)°C на протязі 35-40 годин. Можливо також приготування інших лікарських форм препарату.

Для одержання субстанції препарату використовуються удосконалені варіанти штаму *Lactobacillus bulgaricus*, які виділені із асоціативної культури при дослідно-промисловому напрацюванні біомаси молочнокислих бактерій. Штами депоновані в колекції Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології НАН України і в колекції ВПКМ (ВНДІГенетика, Росія).

Культивування штаму здійснюють в анаеробних умовах при температурі (39±1)°C на збалансованому поживному середовищі, що містить цукор, гідролізати або ферментолізати казеїну, соєвого борошна, кукурудзяний, дріжджовий екстракти, мінеральні солі.

По закінченню культивування проводять відокремлення біомаси клітин сепаруванням, потім одержують продукт за наступною схемою:

- приготування суспензії біомаси;

- проведення гідролізу 20% розчином натрію гідроксиду при вихідному значенні pH(7,0±1,0) до гідролізу клітинних стінок;

- нейтралізація осаду клітинного матеріалу 14% розчином соляної кислоти до pH(6,0±0,1);

- промивка і відокремлення клітинного матеріалу;

- лізис клітинного матеріалу розчином лізоциму концентрацією (0,2-0,6)%;

- відокремлення твердої фази центрифугуванням суспензії при 2000хв⁻¹;

- кислотна денатурація білків в концентраті лізату;

- спиртове осадження субстанції Бластолен;

- сублімаційна сушка.

Операції розділення фаз і концентрування можна проводити і іншими відомими способами.

Одержаний препарат (субстанція Бластолен) являє собою порошок кремового кольору, помірно розчинний у воді, масова частка води не більше 5%. Має стабільний склад: глюкозамін не менше 15%, пептиди не менше 30%, нуклеїнові кислоти не більше 1,0% і біологічну активність по посиленню фагоцитозу *in vivo* не менше 25%.

Саме такий біохімічний склад забезпечує спектр фармакологічної дії, одержаної в результаті реалізації описаних властивостей препарату, що підтверджується даними експериментів. Заданими інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького (ІЕПОР) НАН України, препарат, одержаний по вище описаній технології, малотоксичний, має імуномодуючі властивості (малі дози стимулюють клітинний і особливо гуморальний імунітет, великі дози можуть його пригнічувати), а також проявляє протипроменеву дію.

Препарат має протипухлинний і антиметастатичний вплив. Покращує мікроциркуляцію, стимулює ендотеліальну систему, сприяє прискоренню регенеративних процесів. Препарат вводили внутрішньочеревне, підшкірне і перорально в широкому діапазоні концентрацій (від 1/10 до 1/75000 від ЛД₅₀) при ЛД₅₀ 7000мг/кг. Як стимулятор антилітогенезу у мишей високореагуючої лінії СВА, має здатність активізувати синтез антитіл, не порушуючи механізмів регуляції зворотної реакції організму на гетерогени, а за силою імуностимулюючого ефекту не поступається загальному призначеному комерційному препарату - повному ад'юванту Фрейнда.

В великих дозах (1/10 і 1/100 від ЛД₅₀) має протипухлинний і антиметастатичний ефект, але не пригнічує росту лейкозних клітин. При комбінованому лікуванні на (20-30)% підсилюється протипухлинна дія циклостатинів (циклофосфан і ін.), при підшкірних способах введення ефективність препарату збільшується порівняно з

внутрішньом'язовим і вже введення дози (1/1000-1/75000 від ЛД₅₀) дозволяє одержувати відчутні імуностимулюючі ефекти. Субстанція ефективна як в опроміненому, так і в інтактному організмі. За впливом на клітинну імунну відповідь пероральне застосування препарату не поступається парентеральному.

В експериментах на тваринах використовували як субстанцію Бластолен, так і її лікарські форми (ін'єкційний препарат Бластен і таблетована форма). Знайдені при дослідженні субстанції закономірності підтвердились і при використанні готової лікарської форми препарату.

При розробці ефективних доз і схем введення був вибраний оптимальний варіант, що дозволило провести клінічне вивчення Бластолену. Одночасно з врахуванням ефективних доз і схеми введення проведений комплекс досліджень по хронічній токсичності і показана нешкідливість субстанції і її лікарських форм (ін'єкційної і таблетованої в об'ємі вимог ФК України) Українським науково-дослідним інститутом фармакології і токсикології (УНДІФТ).

Включення Бластену до комплексного лікування онкологічних та багатьох інфекційних захворювань (обтураційних бронхітів, запалення легень, післяопераційних ускладнень, вторинних імунodefіцитів), як препарату підтримки, суттєво підвищує ефективність традиційних методів лікування.

За своєю імуноотропною дією на систему імунітету та показники крові Бластен є високоефективним лікарським засобом і має низку переваг переваг перед відомими закордонними імуномодуляторами: Рибомуніл, Нейпоген, Граноцит, Лейкомакс, Полідан - зручніші схеми, режим та способи введення, майже відсутня побічна дія, стабільна імуномодулююча дія. Причому Властен значно дешевший, ніж вищеназвані аналоги.

За результатами досліджень Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького (ІЕГОР, Київ) при застосуванні Бластену в лікуванні раку молочної залози встановлено підвищення загального безрецидивного виживання, порівняно з даними в контрольній групі хворих, на 13% і 10% відповідно. Найбільш виражене підвищення показника загального виживання (24%) відмічено у хворих, яким проводили неoad'ювантне комплексне лікування з використанням Бластену (Український хіміотерапевтичний журнал, №2(10), 2001р., стор.51-56).

Одержання препарату показано на прикладах:

Приклад 1. Вирощування культури *Lactobacillus bulgaricus* проводили в дослідно-промислових умовах в ферментаторі ємністю 10м³ з інокулятором ємністю 1,2м³ на поживному середовищі оптимального складу, культивування проводили в анаеробних умовах при температурі (39±1)°С протягом 16 годин. Потім проводили сепарування одержаної біомаси на сепараторі Westfalia (швидкість подачі 250-300л/год). По закінченні сепарації біомасу клітин (20кг) вигружали із сепаратора і порціями направляли на стадію лужного гідролізу. Переробляли порціями по 2кг (W=75%) за слідуючою схемою:

- приготування суспензії біомаси з очищеною водою;
- гідроліз біомаси 20% розчином натрію гідроксиду при рН7,0 і температурі від 40°С до 60°С;
- охолодження суспензії до 20°С, відокремлення осаду центрифугуванням;
- нейтралізація осаду клітинного матеріалу 14% розчином соляної кислоти до рН6,0;
- промивка очищеною водою і центрифугування клітинного матеріалу для його відділення;
- лізис клітинного матеріалу розчином лізоциму (150мл 1% розчину лізоциму) при температурі 38°С протягом 10 годин;

- відділення твердої фази центрифугуванням при 20000 хв⁻¹;
- кислотна денатурація білків 14% розчином соляної кислоти при рН3,0;
- центрифугування при 10000хв⁻¹;
- нейтралізація супернатанту до рН7,0;
- спиртоосадження субстанції етиловим спиртом протягом 12 годин при кімнатній температурі;
- сублимаційна сушка одержаного осаду при температурі мінус 35°С протягом 38 годин.

Висушену субстанцію препарату розфасували по 10г в подвійні пакети із поліетиленової плівки. Вихід субстанції складав 20г із 2кг біомаси. Таким чином, вихід субстанції відповідно став в одному технологічному циклі приблизно 20г БАР або приблизно 7500 ін'єкційних доз готової лікарської форми препарату. В перерахунку на одну дослідно-промислову (5,0м³ поживного середовища) ферментацію, вихід БАР складав 180г, що дозволить виготовити до 60000 лікарських доз препарату, який має імуномодулюючу, протипроменеву і регенеративну дію.

Одержана субстанція - порошок кремового кольору, помірно розчинний у воді; масова частка вологи 4,8%, вміст пептидів 31%, глюкозаміну 17%, нуклеїнових кислот 0,05%; біологічна активність по посиленню фагоцитозу 30%. Субстанція зберігає активність до 5 років.

Для одержання готової лікарської форми 10г субстанції розчинили в 5л води для ін'єкцій, добавили 90г декстрану 70, стерильно розлили по 2мл в стерильні флакони і висушили на сублимаційній сушарці при температурі мінус 35°С протягом 35 годин.

Готовий препарат повинен відповідати вимогам фармстатті: зовнішній вигляд - аморфна маса білого кольору; ідентифікація - відповідає; прозорість розчину - прозорий; кольоровість розчину - безбарвний; втрата в масі при висушуванні - 4%; стерильність - стерильний; токсичність - нетоксичний; механічні вклучення - в нормі (20 частинок розміром до 10мкм в 25мл); час розчинення - 24с; середня маса вмісту флакону - 0,020г; біологічна активність - посилення фагоцитозу на мишах масою від 18г до 20г - 30%.

З одного циклу (10г субстанції) одержано 4700 флаконів з разовою лікувальною дозою.

Приклад 2. Субстанцію препарату одержували так само, як в прикладі 1, а для одержання готової лікарської форми 10г субстанції розчинили в 5л води для ін'єкцій, добавили 90г декстрану 30, стерильно розлили по 2мл в стерильні флакони і висушили на сублимаційній сушарці при температурі мінус 36°С протягом 34 годин. Готовий препарат також відповідав вимогам фармстатті: зовнішній вигляд - аморфна маса білого кольору; ідентифікація - відповідає; прозорість розчину - прозорий; кольоровість розчину - безбарвний; втрата в масі при висушуванні - 4%; стерильність - стерильний; токсичність - нетоксичний; механічні вклучення - в нормі (20 частинок розміром до 10мкм в 25мл); час розчинення - 25с; середня маса вмісту флакону - 0,021г; біологічна активність - посилення фагоцитозу на мишах масою від 18г до 20г - 35%.

З одного циклу одержано 4800 флаконів з разовою лікувальною дозою.