

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано в хирургических и терапевтических клиниках при использовании лекарственных препаратов, содержащих белковые вещества.

Наиболее близким к заявляемому решению является антипротеиназное средство, разработанное фирмой Биотест Фарма, содержащее плазменные белки в физиологической концентрации 75 г/л и незначительные примеси. В качестве плазменных белков средство содержит альбумин,  $\alpha_2$ -макроглобулин, АТ-Ш. Содержание  $\alpha_2M$  в препарате составляет от 0,1 до 0,3г/л, что в 10 раз меньше его концентрации в нативной плазме (1).

Однако известное антипротеиназное средство имеет ряд недостатков, так как обладает узким спектром терапевтического действия (применяется только в качестве гемодинамического лечебного средства), не позволяет купировать избыточный протеолиз в крови и тканях из-за низкого содержания ингибиторов; трудность получения средства с применением дорогостоящего оборудования и реактивов.

Задачей изобретения является усовершенствование антипротеиназного средства, путем изменения соотношения белков и концентрации плазменных белков в растворе, что позволит усилить ингибиторную эффективность средства антипротеиназной направленности действия.

Поставленная задача решается антипротеиназным средством, включающим  $\alpha_2$ -макроглобулин, альбумин и другие белки плазмы крови человека, которое содержит указанные белки при их соотношении, % мас.:

<b><math>\alpha_2</math>-макроглобулин</b>	<b>12–15</b>
<b>альбумин</b>	<b>45–50</b>
<b>остальные плазменные белки</b>	<b>до 100</b>

в физиологическом растворе, натрия хлорида с добавлением гликокола при следующем содержании компонентов, г/л:

<b>плазменные белки</b>	<b>65,0</b>
<b>натрия хлорид</b>	<b>8,5–9,0</b>
<b>гликокол</b>	<b>6,0–7,0</b>
<b>аспирогенная вода</b>	<b>до 1 л.</b>

Антипротеиназное средство получают в результате выделения  $\alpha_2M$  из утильной фракции Ш белков донорской плазмы, стабилизации  $\alpha_2M$  естественным плазменным белком - альбумином и растворения полученного концентрата белков в физиологическом растворе с добавлением гликокола.

Полученный препарат представляет собой прозрачную жидкость с желтоватым оттенком.

Заявляемое антипротеиназное средство обладает следующими преимуществами:

- относительно простой способ получения антипротеиназного средства из отходов серийного производства препаратов крови;

- высокое содержание ингибитора протеолитических ферментов  $\alpha_2M$ , что позволяет применять это лекарственное средство при заболеваниях, сопровождающихся повышенным протеолизом в крови и тканях;

- широкий спектр терапевтического действия за счет способности  $\alpha_2M$  плазмы крови человека регулировать процессы гемокоагуляции и фибринолиза, кенниногенеза, иммунного ответа организма.

Указанный результат достигнут благодаря особым свойствам заявляемого средства, т.к. нами в качестве стабилизатора плазменного ингибитора был впервые применен альбумин, позволяющий получить лекарственное средство антипротеиназной направленности, пригодное для клинических целей.

Совокупность отличительных признаков дала возможность предложить новое антипротеиназное средство для внутривенного введения.

Полученное антипротеиназное средство аспирогенно и стерильно. Экспериментальными исследованиями установлено, что оно не обладает острой токсичностью и кумулятивным действием, сохраняет стабильность физико-химических и специфических свойств в течение 1 года. Антикомплементарная активность препарата, изученная в опытах *In vitro* и *In vivo*, практически не отличается от таковой плазмы донорской крови. Коэффициент антикомплементарности, рассчитанный по отношению титра компонента после введения опытным животным препарата к таковому до введения его, был равен  $1,25 \pm 0,12$  и достоверно не изменялся после инфузий препарата, хранившегося в течение 1 года.

Антипротеиназное средство получают следующим образом:

Из утильной фракции Ш белков донорской плазмы комбинацией методов этанолово-риванолового фракционирования выделяют белковую фракцию, обогащенную  $\alpha_2M$  более чем в 10 раз по сравнению с плазмой (9).

Выделение  $\alpha_2M$  проводят в 3 этапа:

- 1 - с целью удаления иммуноглобулинов фракцию Ш белков переосаждают в ацетатглициновом растворе (рН 5,5) путем добавления этилового спирта до концентрации его в

смеси 12%.

2 - полученный осадок растворяют в цитратном растворе (рН 7,1) и удаляют из него плазминоген и некоторые белки свертывающей системы с помощью этилового спирта при конечной концентрации его в смеси 13%.

3 - проводят дополнительную очистку полученного центрифугата 0,5% раствором риванола, прибавляя его в количестве 0,3 части к объему раствора. В полученном после отделения осадка белков, образующих с риванолом нерастворимый комплекс, центрифугате доводят значение водородного показателя рН до 5,4 (изоэлектрической точки  $\alpha_2M$ ) и осаждают этиловым спиртом, устанавливая его конечную концентрацию в смеси 25%. На данной стадии в осадке содержится от 40% до 60%  $\alpha_2M$ . Выделенный осадок концентрата  $\alpha_2M$  высушивают сублимационным методом.

С целью получения терапевтического средства антипротеиназного действия мы разработали стабилизированную композицию поливалентного ингибитора  $\alpha_2M$ , отвечающую действующим требованиям к препаратам плазмы крови по безвредности, длительности хранения без изменения физико-химических свойств и биологической эффективности.

Для получения растворов концентрата  $\alpha_2M$ , пригодных для внутривенного введения, нами был предложен и изучен растворитель, содержащий естественный плазменный стабилизатор-альбумин.

Лекарственное средство  $\alpha_2M$  получали путем растворения сухого порошка концентрата  $\alpha_2M$  в растворителе следующего состава:

натрий хлорид	– 9 г
гликокол	– 10 г
апиrogenная дистилли- рованная вода	– до 1 л

до концентрации белка не менее 100 г/л.

Полученный раствор соединяли с 5% раствором альбумина человека в соотношении объемов и концентраций, позволяющих получить стабильный при хранении раствор со сниженной антикомплементарной активностью. Затем осветляли его путем пропускания через бумажное тесто и проводили стерилизующую фильтрацию с применением фильтрационной аппаратуры фирмы "Миллипор".

Полученный раствор выдерживали в течение 1 месяца для выпадения коллоидно-нестабильных компонентов. Затем подвергали осветляющей и стерилизующей фильтрации.

Пример 1.

Терапевтическая эффективность данного антипротеиназного средства изучена на экспериментальной модели ожоговой болезни. Введение обожженным животным 4 инъекций препарата (по 4мл 6% раствора/кг массы) сопровождалось снижением содержания кислых протеиназ, характеризующих тяжесть ожоговой болезни, до значений этого показателя у интактных животных. Параллельно с нормализацией концентрации кислых протеиназ отмечено возрастание ингибиторного потенциала в крови животных с ожоговой травмой после лечения препаратом  $\alpha_2M$ .

При введении обожженным животным антипротеиназного средства следующего состава белков, % мас.  $\alpha_2M$  - 12, альбумин - 45, остальные плазменные белки - остальное, в физиологическом растворе натрия хлорида с добавлением гликокола, при следующем содержании компонентов, г/л: плазменные белки - 65,0, натрия хлорид - 8,5, гликокол - 6,5, остальное - апиrogenная вода, а также других составов при соотношении плазменных белков, % мас.:  $\alpha_2M$  - 12 - 15, альбумин - 5 - 50, остальные плазменные белки - до 100, в физиологическом растворе натрия хлорида с добавлением гликокола при следующем содержании компонентов, г/л: плазменные белки - 65,0, натрия хлорид - 8,5 - 9,0, гликокол - 6,0 - 7,0, апиrogenная вода - остальное до 1л, способствовало нормализации клинического состояния животных и биологических показателей системы протеолиза уже на 5 сутки, в то время, как без лечения - лишь на 14 сутки. Не наблюдалось ни одного летального исхода, связанного с ожоговой травмой. При этом активность кислых протеиназ уже на 5 сутки после ожога стабилизировалась и не превышала величин физиологической нормы (рис.1).

Регистрировалось также увеличение ингибиторного потенциала сыворотки крови. Содержание плазменного ингибитора  $\alpha_1$ - антитрипсина повышалось и к 9 суткам превышало данный показатель у здоровых животных в 1,5 раза, а концентрация ингибитора  $\alpha_2M$  увеличивалась в 1,2 раза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что разработанное антипротеиназное средство обладает выраженными ингибиторными свойствами и способно в значительной степени нормализовать систему протеолиза в организме в условиях ее гиперактивации.

Результаты исследования представлены в таблице.

Пример 2.

Уменьшение содержания поливалентного ингибитора  $\alpha_2\text{-M}$  в составе антипротеиназного средства до 5 - 8 массовых % приводило к значительному снижению его ингибиторной способности. Отмечалось только некоторое его положительное влияние на гемостаз.

Таким образом, согласно изобретению:

- разработана оригинальная технологическая схема получения препарата антипротеиназного действия из экономически выгодного утильного сырья, входящая в единый цикл безотходной переработки плазмы донорской крови;

- на основе поливалентного ингибитора плазмы крови человека  $\alpha_2\text{M}$  создано лекарственное средство, способное расширить возможности современной энзимотерапии состояний с выраженной активацией системы протеолиза в организме, когда наряду с такими фармакологическими препаратами, как контрикал, трасилол, гордокс и др. будет применяться комплексный белковый препарат плазмы крови, пригодный как для местного, так и парентерального введения;

- препарат стабильно сохраняет биологическую активность и обладает антипротеиназным действием, отвечает требованиям, предъявляемым к препаратам для внутривенного введения;

- установлена терапевтическая эффективность препарата на экспериментальной модели ожоговой болезни. Он нормализует протеиназо-ингибиторный баланс, подавляя активность кислых протеиназ, восстанавливает белоксинтезирующую функцию печени, стабилизируя мембраны жизненно-важных органов, способствует интенсивному протеканию репаративных процессов и восстановлению организма в более ранние сроки;

- полученные экспериментальные исследования легли в основу разработки нормативно-технической документации производства препарата, условно названного "Альфаминал".

Таблица

Биохимические показатели, характеризующие функциональное состояние печени морских свинок после ожоговой травмы и последующего введения антипротеиназного средства  $\alpha_2\text{M}$  ( $M \pm m$ )

Сроки исследования, сутки	Группы животных	Количество животных	Общий билирубин, мкмоль/л	Тимоловая проба, ед. Н	Бета-липопротеиды, г/л	Общий белок, г/л
Исходные данные	Интактные	26	$2.47 \pm 0.48$	$0.62 \pm 0.17$	$0.50 \pm 0.09$	$55.2 \pm 2.12$
1-е сутки	до лечения	10	$7.62 \pm 0.29^*$	$1.13 \pm 0.071^*$	$0.97 \pm 0.094^*$	$41.7 \pm 2.09^*$
5-е сутки	до лечения	16	$6.01 \pm 0.62^*$	$0.52 \pm 0.24$	$1.19 \pm 0.18^*$	$47.3 \pm 1.83^*$
	после лечения	10	$3.76 \pm 1.19$	$0.50 \pm 0.02$	$1.02 \pm 0.11^{**}$	$48.3 \pm 1.98^*$
9-е сутки	до лечения	17	$3.98 \pm 0.36^*$	$0.37 \pm 0.06$	$1.23 \pm 0.18^*$	$53.8 \pm 1.32$
	после лечения	10	$1.03 \pm 0.26^*$	$0.25 \pm 0.03$	$1.15 \pm 0.13^*$	$54.5 \pm 1.57$
14-е сутки	до лечения	10	$2.17 \pm 0.24$	$0.87 \pm 0.054$	$0.87 \pm 0.071^*$	$54.6 \pm 1.41$
	после лечения	5	$3.08 \pm 1.15$	$0.60 \pm 0.06$	$0.71 \pm 0.019$	$55.4 \pm 1.63$
18-е сутки	до лечения	7	$2.48 \pm 0.11$	$0.81 \pm 0.091$	$1.25 \pm 0.16^*$	$54.6 \pm 2.12$
	после лечения	5	$4.2 \pm 0.51^*$	$0.66 \pm 0.09$	$1.11 \pm 0.49$	$56.1 \pm 1.81$

Примечание.

Результат, обозначенный звездочкой (\*), статистически достоверно ( $P < 0.05$ ) отличается от исходных данных