



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14549 (13) U  
(51) МПК  
A61K 35/50 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) БІОЛОГІЧНО АКТИВНИЙ ПРЕПАРАТ "БІОПЛАЦ"

1

2

(21) u200511463

(22) 02.12.2005

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрій Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ"

(57) 1. Біологічно активний препарат, що містить подрібнений плацентарний матеріал, який **відрізняється** тим, що він являє собою гомогенат розмороженої плаценти, отриманої через 3-6 годин після пологів, зроблених за допомогою кесарева розтину, й подрібнений у ножовому гомогенізаторі протягом 5-7 хв., та диметилсульфоксид при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

диметилсульфоксид	2,5-5 %
гомогенат розмороженої плаценти	решта.

2. Біологічно активний препарат за п. 1, який **відрізняється** тим, що він додатково містить водорозчинну основу, диметилсульфоксид та канаміцин при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

водорозчинна основа	50-60 %
---------------------	---------

диметилсульфоксид	2,5-5 %
канаміцин	30 од/мол
гомогенат розмороженої плаценти	решта.

3. Біологічно активний препарат за п. 1, який **відрізняється** тим, що він додатково містить жиророзчинну основу, диметилсульфоксид та канаміцин при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

жиророзчинна основа	50-60 %
диметилсульфоксид	2,5-5 %
канаміцин	30 од/мол
гомогенат розмороженої плаценти	решта.

4. Біологічно активний препарат за п. 1, який **відрізняється** тим, що він додатково містить гел-активатор з заданою рН, диметилсульфоксид, канаміцин та Нерес-буфер при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

гель-активатор з заданою рН	50-60 %
диметилсульфоксид	2,5-5 %
Нерес-буфер	2,0-3,0 %
канаміцин	30 од/мол
гомогенат розмороженої плаценти	решта.

Розробка відноситься до медицини, до комбустіології та хірургії й може бути використана для лікування великих глибоких опікових ран на основі застосування препарату, приготовленого із тканини плаценти, шляхом нанесення його на підготовлену поверхню. Відома основа лікарського засобу для зовнішнього застосування на основі тканини плаценти [див. патент RU 2156131, МПК А61К 35/50, дата публікації: 20.09.2000], що містить 90% суміші із двохетапно подрібненого за допомогою м'ясорубки та гомогенізатора або дезінтегратора плацентарного матеріалу та рослинного олії й етанолу в кількості й у співвідношеннях, що надають суміші вид емульсії, та 10% диметилсульфоксиду (ДМСО). Недоліки: Проведені дослідження з вивчення біологічної дії ДМСО на клітини [Грищенко В.І., Лобинцева Г.С., Вотякова І.А., Шерешков

С.І. Гемопозитические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация, криоконсервирование), Киев. Наукова думка. - 1987. - 225с.], а також літературні дані, свідчать про те, що ДМСО в 10 % концентрації при тривалому впливі на клітинні препарати викликає конформаційні зміни білків, порушення проникності мембран, структурні перебудови ліпідних молекул, нуклеїнових кислот за рахунок утворення водневих зв'язків з полярними групами молекул і їхніх гідрофобних ділянок. Запропоноване виконання подрібнювання дозволяє забезпечити більш стабільні емульсійні властивості суміші, але при здрибнюванні тканини плаценти на м'ясорубці процес здрибнювання супроводжується різким підвищенням механічного тиску на тканину для забезпечення можливості її протискування через шнекову зону та отвори ре-

(13) U

(11) 14549

(19) UA

шітки. Фізичні явища що супроводжують цей процес - різке підвищення тиску й температури руйнують клітини тканини. Додавання кріопротектора ДМСО в запропонованих обсягах, а також і застосування оцтової кислоти не може зберегти «матеріал у нативному стані». Відомо лікарський засіб для зовнішнього застосування на основі тканини плаценти [див. патент RU 2071336, МПК А61К35/50, дата публікації: 10.01.1997], що включає гомогенат свіжої або свіжозамороженої тканини плаценти, здрібненої до часток розміром до 0,1мм, промитої й звільненої від природної тканини, і диметилсульфоксид при співвідношенні компонентів, і диметилсульфоксид (ДМСО) 1мас. частина, гомогенат тканини плаценти 1-4мас. частин, при цьому суміш активних речовин засобу інкубують до 14 днів при 16-24°C. У відомому препараті рідкоподібна маса, отримана із плаценти, оброблена диметилсульфоксидом, і останній в неї виконує функції розчинника й консерванту, а також є компонентом, що забезпечує глибоке проникнення в тканині біологічно активних речовин, що містяться в плацентарному матеріалі, їхній рівномірний розподіл по матеріалу, і володіє власним антимікробним, протизапальним і анальгетичною дією, якою він не перебиває властивості плацентарного матеріалу. Препарат містить великий відсоток ДМСО, що може викликати опіки тканини при зовнішньому уживанні. Препарат такого складу має огидний сморід, який не можна перебити ніякими добавками й віддушками. При зберіганні плаценти із ДМСО протягом 14 днів (інкубують до 14 днів при 16-24°C) особливо при температурі 16-24°C запах підсилюється, тому що ДМСО при контакті з повітрям окислюється а неприємний запах спричиняють саме окисли ДМСО. При застосуванні має місце поява металевого й неприємного присмаку на язичку навіть після зовнішнього застосування мазі. ДМСО володіє дозозалежним ефектом дії на проліферацію стовбурних клітин: у малих дозах (від 2 до 7%) - активізує поділ клітин, у більших дозах (більше 10%) - пригнічує. В основу розробки поставлена задача створення нового біологічно активного препарату в якому, внаслідок застосування нового інгредієнту (склад якого характеризується новим способом його отримання) і емпіричним шляхом підбраного складу інгредієнтів забезпечується розширення можливостей впливу, розширення місць можливого впливу, підвищується. Для виконання цієї задачі біологічно активний препарат містить подрібнений плацентарний матеріал, та Диметилсульфоксид. Новим у біологічно активному препараті є те, що, він у складі містить плацентарний матеріал який являє собою гомогенат розмороженої плаценти, отриманої через 3-6 годин після пологів, зроблених за допомогою кесарева розтину й подрібнений у ножовому гомогенізаторі протягом 5-7хв. у наступному співвідношенні компонентів мас. %:

диметилсульфоксид	2,5-5%
гомогенат розмороженої плаценти	решта

Біологічно активний препарат такого складу містить всі компоненти плацентарної тканини (високо- і низькомолекулярних білків, амінокислот, гормонів, факторів росту, а також стовбурних клі-

тин), які втримуються в нативній плаценті. Диметилсульфоксид у застосованих у біологічно активному препараті дозах (від 2,5-5%) володіє ефектом дії на проліферацію стовбурних клітин: - активізує поділ клітин. В конкретних варіантах застосування біологічно активний препарат додатково містить водорозчинну основу, диметилсульфоксид та канаміцин при наступному співвідношенні компонентів:

водорозчинна основа	50-60%
диметилсульфоксид	2,5-5%
канаміцин	30ед/мол
гомогенат розмороженої плаценти	решта

В конкретних варіантах застосування біологічно активний препарат додатково містить жиророзчинну основу, диметилсульфоксид та канаміцин при наступному співвідношенні компонентів:

жиророзчинна основа	50-60%
диметилсульфоксид	2,5-5%
канаміцин	30ед/мол
гомогенат розмороженої плаценти	решта

В конкретних варіантах застосування біологічно активний препарат він додатково містить геле-активатор з заданою рН, Диметилсульфоксид, Канаміцин та Нерес-буфер при наступному співвідношенні компонентів:

гель-активатор з заданою рН	50-60%
диметилсульфоксид	2,5-5%
Нерес-буфер	2,0-3,0%
канаміцин	30ед/мол
гомогенат розмороженої плаценти	решта

Пропонована композиція сформована таким чином, що препарат утворює єдину масу з компонентами, що зберігають початковий стан компонентів плацентарного матеріалу, бактерицидність, кислотне значення рН, а також сприятливе проникнення біологічно активних речовин, що втримуються в плаценті, у клітини ушкодженої шкіри й прилягаючих до неї тканин. Крім того, біологічно активний препарат, містить велику кількість біологічно активних речовин, таких як високо- і низькомолекулярні білки, інтерлейкіни МУЛ-1, МУЛ-2, МУЛ-6, МУЛ-8., фактори росту, ліпіди загальні, жирні кислоти, тригліцериди, холестерин і амінокислоти (аланін, аргінін, аспаргін, аспаргінова кислота, валін, гистидин, гліцин, глютамінова кислота, İzoleйцин, лейцин, лізин, метіонін, пролін, серин, тирозин, треонін, фенілаланін, цистеїн), Мінеральні речовини: Mg, Al, Si, P, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb. Біологічно активний препарат ілюструється прикладами. В прикладах, наведених у Таблиці 1 застосовували такі інгредієнти: диметилсульфоксид (синоніми: димексид, DMSO) - рідина із властивостями розчинника, використовується як кріоконсервант, крім того, у широкій клінічній практиці його застосовують як лікарський засіб для зовнішнього вживання при лікуванні забитих місць, розтягань зв'язок, запальних набряків, гнійних ран, тому що він володіє антимікробною, протизапальною і анальгетичною дією. [Машковский М.Д., "Лікарські засоби", допомога з фармакотерапії для лікарів, видання 10, М.: Медицина, 1985 р., том 1, с.202. Машковский М.Д., Лікарські засоби. Допомога з фармакотерапії для лікарів. Частина 2. Вільнюс, 1993р., видавництво ЗАТ "Га-

мта", с.224]; канамицин - антибіотик широкого спектра дії, придушує ріст патогенної мікрофлори, але не знижує проліфераційну активність CD 34<sup>+</sup> клітин; Нерес-Буфер - стандартний склад буферу, що підтримує рівень значень рН у заданій області величин (рН 6,8-7,0). В проведених дослідках також застосовувалися стандартні водорозчинна основа, жиророзчинна основа та гель-активатор з заданою рН. В Таблиці наведено склад застосованого у прикладах препарату. Препарат у наведених прикладах виготовляли зі застосуванням здрібненої тканини плаценти, яку отримують за згодою породілля через 3-6 годин після пологів, зроблених за допомогою кесарева розтину. Сироватка крові породілей повинна мати негативний результат при тестуванні на гепатити В, З, Д, вірус імунодефіциту, токсоплазмоз, цитомегаловірус, хламідії, уреоплазмоз, краснуху, вірус простого герпеса, Епштейн-Барр вірусу. Одержання препарату - багатоетапний процес, що включає: - Відділення плаценти в родильному залі й доставку її в стерильній судині в термостатированих умовах (+20-+25°C) у лабораторію кріобанка протягом 3-5 годин з моменту пологів. - Трикратне промивання плаценти фізіологічним розчином з антибіотиком (60ед/мол) у стерильних ємностях (3-5л) в умовах стерильного боксу. - Відділення від плаценти тканини хоріона, амніотичної оболонки й великих судин. - Здрібнювання тканини плаценти в ножовому гомогенезаторі MPW-324 протягом (5-7хв) і одержання гомогената. - Додавання кріопротектора 5-10%-ний концентрації до отриманого гомогенату в співвідношенні 1:1. - Розфасовці гомогената в стерильні кріопробирки по 3,6мол. - Заморожуванні гомогената в програмному заморожувачі зі швидкістю 1-2° в 1хв до - 80°C. - Зберігання гомогената при температурі - 80 - -130°C. - Тестування отриманого гомогената на стерильність і відсутність гепатитів В, З, Д, вірусу імунодефіциту, токсоплазмозу, цитомегаловірусу, хламідії, уреоплазмоза, краснухи, вірусу простого герпеса, Епштейн-Барр вірусу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЦР). - Розморожування гомогената у водяній лазні +37-40°C до 0°C. Приготовлений описаним вище способом гомогенат плаценти використовують як напівфабрикат, з якого після розморожування готують, залежно від специфіки захворювання, кінцевий продукт шляхом: - Додавання до отриманого гомогенату водорозчинної основи. - Додавання до отриманого гомогенату жиророзчинної основи в співвідношенні 1:1. - Додавання до отриманого гомогенату гель-активатора із заданою рН. Порівняльне дослідження ефективності пропонованих препаратів вивчали на лабораторних тваринах, зокрема пацюках лінії Вистар, у кількості 28, одного віку й ваги, які були розділені на п'ять експериментальних груп. Експерименти робили відповідно до "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальній і іншій дослідницькій цілях" (Страсбург, 1985). Після моделювання опіку, на стадії розвитку у тварин опікової хвороби, всією твариною робили терапію. Приклад використання: Перша контрольна група (4 тварин) піддавалася лікуванню звичайними для даного захворюван-

ня препаратами. Як показали результати спостереження, загоєння раневої поверхні у тварин даної групи відбувалося дуже нерівномірно: поверхня рани тривалий час залишалася збудженою, з нагноєннями, пов'язки доводилося міняти щодня, і тільки через 25 діб відзначали загоєння рани. Приклад використання: Друга група (6 тварин) одержувала терапію пропонованим препаратом, що містить склад за прикладом 1-3. Було відзначено, що загоєння раневої поверхні проходило активно, без ускладнень, однак у всіх випадках спостерігали сухість рани й повільний ріст гранулези в області рани. Істотних розходжень на протязі процесу загоєння рани від кількості плаценти й значень ДМСО, показаних у прикладі 1-3 не виявлено. Приклад використання: Третя група (6 тварин) одержувала препарати за прикладом 4-6, коли до складу препарату входила плацента (42-46%), димексид, канамицин і водорозчинна основа. Було встановлено, що така композиція препарату сприяє активному загоєнню рани, утворенню гранулези в області рани, однак через 7 днів рана залишалася вологою. Істотних розходжень на протязі процесу загоєння рани від кількості плаценти й значень ДМСО показаних у прикладі 4-6 не виявлено. Приклад використання: Четвертій групі (6 тварин) робили терапію на першому етапі (1-5 доба) відповідно до прикладу 4-6, а потім - пропонованим препаратом, що містить склад за прикладом 7-9. Це було викликано тим, що препарат, що містить жиророзчинну основу, буде сприяти підсиханню рани без різкого її висихування. Як показали результати, загоєння рани відбулося на 15 добу без яких-небудь ускладнень. Істотних розходжень на протязі процесу загоєння рани від кількості плаценти й значень ДМСО показаних у прикладі 4-6 не виявлено. Приклад використання: П'ятій групі (6 тварин) лікування опікової рани робили пропонованим препаратом, що містить склад за прикладом 9-12, до складу якого були включені додатково гель-активатор і Нерес-Буфер, які сприяли підтримці кислого значення рН середовища й активізації процесу репарації ушкодження тканини. Загоєння рани відбулося на 14-15 добу. Істотних розходжень на протязі процесу загоєння рани від кількості плаценти й значень ДМСО, кількості гель-активатора й Нерес-Буфера показаних у прикладі 9-12 не виявлено. Таким чином, проведена терапія за допомогою пропонованих препаратів показала, що для лікування опікової рани не обходжене застосування препаратів у наступному складі: на першому етапі раневого процесу доцільно застосовувати склад відповідно до прикладів 4-6, на другому, у момент регенерації, склад 7-9. На цьому ж етапі можна використовувати склад 9-12, що також сприяє росту гранулези й регенерації раневої поверхні. Приклад використання: Хворому А. (45 років) у фазі запалення раневого процесу щодня до очищення від гнійно-некротичних мас рану покривали стерильними марлевими серветками, просоченими пропонованим препаратом, що містить склад за прикладом 4-6. У фазі регенерації на раневу поверхню шкірного покриву наносили один раз в 2-3 дні рівним шаром під пов'язку склад за прикладом 7-9, роблячи перев'язки в міру роз-

мокування біоматеріалу. Застосування розроблених препаратів забезпечило підготовку раневої поверхні до трансплантації шкіри через 7 днів. Без застосування препаратів підготовка раневої пове-

рхні до трансплантації шкіри завершується тільки на 15 добу, причому не виключаються ускладнення у вигляді відторгнення аутологічної шкіри через імунізацію поверхні рани.

Таблиця

Приклади	Склад біологічно активного препарату						
	гомогенат розмороженої плаценти.	ДМСО	водорозчинна основа	Канаміцин	жиророзчинна основа	гель-активатор з заданою рН	Нерес-буфер
	%	%	%	ед/мол	%	%	%
1.	97,5	2,5	-	30	-	-	-
2.	95	5,0	-	30	-	-	-
3.	96	4,0	-	30	-	-	-
4.	46,5	3,5	50	30	-	-	-
5.	42,5	2,5	55	30	-	-	-
6.	35	5,0	60	30	-	-	-
7.	45	5,0	-	30	50	-	-
8.	42	3,0	-	30	55	-	-
9.	37,5	2,5	-	30	60	-	-
10.	43	5,0	-	30	-	50	2,0
11.	38,5	4,0	-	30	-	55	2,5
12.	34,5	2,5	-	30	-	60	3