



(19) KG (11) 771 (13) C1 (46) 30.04.2005

(51)<sup>7</sup> A61K 37/00

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ  
ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

---



---

(21) 20040003.1

(22) 09.02.2004

(46) 30.04.2005, Бюл. №4

(76) Рамазанов Ю.А., Акрамов Э.Х., Габитов В.Х., Бейсембаев А.А. (KG)

(56) Патент ЕР №0622071, кл. A61K 37/00, 1994

(54) Лечебное средство - гель "Фармаген"

(57) Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в медицине в качестве наружного средства для лечения ожогов, трофических язв и при проведении косметологических операций, нарушающих целостность кожного покрова или посттравматических операций, где необходимо полноценное восстановление функций и структуры кожи без образования рубцов. Задачей изобретения является разработка лечебного средства с повышенным ранозаживляющим действием за счет интенсивного стимулирования развития новых кровеносных сосудов на месте повреждения. Поставленная задача решается за счет того, что в лечебном средстве - геле «ФАРМАГЕН», включающем основу в виде водорастворимого полимерного геля и белок ангиогенина, что оно дополнительно содержит бактериостатик, при следующем соотношении компонентов:

белок ангиогенина человека	0.5-1000 мкг/мл
----------------------------	-----------------

водорастворимый	
-----------------	--

полимерный гель	до 1 мл
-----------------	---------

бактериостатик	до 0.01 мл,
----------------	-------------

где в качестве белка у ангиогенина лечебное средство содержит белок ангиогенина человека, в качестве водорастворимого полимерного геля содержит гель полиэтиленоксида, а в качестве бактериостатика лечебное средство содержит бензойную кислоту или бензоат натрия. 1 н. и 4 з. п. ф-лы, 1 табл., 3 пр.

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в медицине в качестве средства для лечения ожогов, трофических язв и при проведении

косметологических операций или посттравматических операций на мягких и костных тканях, где необходимо полноценное восстановление функций и структуры органов без образования деформирующих рубцов.

Известен лечебный препарат, содержащий очищенную жидкую 15-ю субстанцию фактора ангиогенеза человека и его индивидуальные белки (Патент ЕР, А2, 0234545, кл. A61K 37/00, 1987).

Однако данное средство может быть использовано в виде инъекций, неэффективно и неудобно для контактного применения.

Известны гибридные матричные имплантанты и эксплантаты, включающие гелеобразные пористые структуры, выполненные из коллагена, полистирола или полиакриламида и насыщенные рекомбинантным полипептидом, представляющим собой фактор ангиогенеза (патент WO, A, №15195, кл. A61K 37/00, 1997).

Однако данное средство выполнено в виде жесткой матричной 25-й структуры и не может быть использовано в лечебных целях для нанесения на поверхность кожи или послеоперационной раны.

Наиболее близким аналогом изобретения является отбеливающий косметический препарат (патент ЕР, А1, 0622071, кл. A61K 37/00, 1994), включающий основу в виде белка ангиогенина, полученный из молока млекопитающих и водорастворимый гель на основе полиэтиленгликоля и пропиленгликоля.

Однако данный препарат содержит ангиогенин из молока млекопитающих, который является ингибитором меланина кожи, что обеспечивает ее отбеливание при использовании в косметических целях, но данный белок недостаточно эффективно стимулирует развитие новых кровеносных сосудов в мягких и костных тканях.

Задачей изобретения является разработка лечебного средства с повышенным ранозаживляющим действием за счет интенсивного стимулирования развития новых кровеносных сосудов на месте повреждения.

Поставленная задача решается за счет того, что в лечебном средстве геле - «ФАРМАГЕН», включающем основу в виде водорастворимого полимерного геля и белок ангиогенина человека, что оно дополнительно содержит бактериостатик при следующем соотношении компонентов:

белок ангиогенина человека	0.5-1000 мкг/мл
водорастворимый полимерный гель	до 1 мл
бактериостатик	до 0.01 мл,

где в качестве белка ангиогенина лечебное средство содержит белок ангиогенина человека, в качестве водорастворимого полимерного геля содержит гель полиэтиленоксида, в качестве бактериостатика - бензойную кислоту или бензоат натрия.

Белок ангиогенина человека представляет собой катионный полипептид, состоящий из 123 аминокислот с молекулярной массой 14 кД и являющийся белковым фактором ангиогенеза. Он стимулирует функции эндотелиальных клеток, важных для развития кровеносных сосудов. Этим объясняется интерес к белку ангиогенина человека как к перспективному средству для лечения ран, ожогов, язв, переломов костей и сердечнососудистой патологии.

При более низком количественном содержании белка ангиогенина человека в препарате не достигается заметного лечебного действия, а при более высоком содержании этого белка в препарате проявляется его токсическое действие на организм пациента.

Бактериостатика отрицательно влияет на клеточное деление, поэтому его применение позволяет регулировать ранозаживляющее действие препарата.

Водорастворимый гель полиэтиленоксида с pH 5.0-7.0 и динамической вязкостью 3.0-5.0 Па·с при 30°C получают в соответствии с ВФС 42-3017-97 путем облучения 1% водного раствора полиэтиленоксида-1500 ускоренными электронами. Продукт разрешен

для использования в медицине и косметике. Срок хранения при +20°C 6 месяцев, а при температуре не выше +10°C в течение 2 лет. Гель полиэтиленоксида (ПЭО) придает средству желеобразное состояние, оказывает на белок ангиогенина некоторое стабилизирующее действие и повышает удобство пользования указанным средством.

Методика получения белка ангиогенина человека.

Культуру рекомбинантного штамма *E. coli* B1 21 (DE3) pZZSA (депонирован в Коллекции микроорганизмов Межрегионального центра коррекции микроценоза человека (г. Новосибирск) под номером № МЦКМ В-127) разводят в 50 раз в среде LB с добавлением ампциллина до концентрации 0.1 мг/мл и культивируют в суспензии при 37°C до завершения логарифмической фазы роста, т.е. до достижения оптической плотности в 1 о.е, при длине волны 600 нм. Далее в суспензию добавляют IPTG до концентрации 1 mM и инкубируют для экспрессии белка агиогенина в течение 3.5 часов. По окончании инкубации клетки бактерий осаждают центрифугированием при 5000 об/мин. Далее клетки суспензируют в буфере "A" (0.1 M трис-HCl; pH 7.2; 0.1 M NaCl; 10 mM бета-меркаптоэтанол, 10% сахарозы), озвучивают в генераторе ультразвука УЗДН2Т и центрифугируют 15 мин при 5000 об/мин. Осадок 5 раз отмывают буфером "A" с добавлением 1% тритона X-100, 2 M мочевины с обязательной гомогенизацией и последующим центрифугированием в течение 15 мин. После удаления супернатанта осадок растворяют в 50 мл 7M гуанидин хлорида.

Для выделения белка ангиогенина человека к 50 мл солюбилизированного белка добавляют 2.5 мл 1M трис-HCl, pH 8.0; 0.5 г тетратионата Na, 1 г сульфита Na и выдерживают 20 часов при 22°C. После диализа в 1 л фосфатного буфера, pH 8.0 раствор разбавляют в 10 раз тем же буфером с добавлением 1 mM глутатиона восстановленного и 0.1 mM глутатиона окисленного и инкубируют 17 часов при +4°C. Далее проводят хроматографию на целлюлозе DE-52, выполняя ступенчатую элюцию белка раствором NaCl. Концентрация элюента при выходе белка с колонки составляла 0.5 M NaCl. Выход белка составляет 40 мг на 5 г биомассы.

Электрофоретический анализ белков и анализ специфической активности белка ангиогенина человека проводят в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в буферной системе Лэммли. О степени чистоты препарата белка ангиогенина человека после очистки судят на основе анализа электрофорограммы (денситометрии).

Динамику индуцированного IPTG синтеза, белка ангиогенина человека слитого с IgG-связывающим доменом белка А стафилококка определяют электрофоретическим методом. По данным денситометрии полос белка ангиогенина человека выход составляет 20-30%, электрофоретическая чистота белка - около 95%.

Анализ специфической активности проводят на хориоаллантоисной оболочки (ХАО) куриного эмбриона [Klasburn M., Knihton D., Folkman J. // Cancer Research. -1976. - V. 36. - p. 110-114] по нижеследующей методике с использованием 7-9 суточных куриных эмбрионов с нормальным развитием плода.

Для проведения опыта берут не менее 7 куриных эмбрионов на точку. Исследуют параллельно не менее при двукратном разведении препарата белка ангиогенина человека два контроля. В условиях соблюдения стерильности, исследуемые образцы по 10 мл наносят на фильтры Миллипор (диаметр диска 10 мм). Диски подсушивают под лампой в ламинаре. В стерильных условиях фильтры с импрегнированными образцами исследуемых препаратов апплицируют на ХАО. Все яйца, используемые в опыте, подписывают и помещают в термостат с температурой 37°C для дальнейшего инкубирования.

Результаты учитывают через 72-80 часов после имплантации фильтра с нанесенным образцом препарата белка ангиогенина человека на ХАО. Предварительно яйца с куриными эмбрионами анализируют в овоскопе, отбраковывая погибшие. Яйца с живыми куриными эмбрионами вскрывают и производят визуальное исследование сосудистой сети хориоаллантоисной оболочки как к прилежащей к имплантированному

диску фильтра, так и пристеночной (прилегающей к скорлупе). Затем извлекают участок хориоаллантоисной оболочки из-под диска фильтра и помещают для фиксации в раствор формалина на 5-7 минут. Фиксированные участки ХАО помещают под лупу (или микроскоп) и производят подсчет сосудов. Берут среднюю величину от результатов измерения плотности сосудов на 7 эмбрионах для каждого образца и сравнивают со степенью васкуляризации хориоаллантоисной оболочки в контрольных образцах. Положительным считают результат, при котором средняя величина плотности сосудов в опыте превышает таковую в контроле в 2 и более раза.

В таблице 1 приведены результаты анализа ангиогенной активности химерного белка на ХАО развивающегося куриного эмбриона.

Анализ таблицы 1 показывает, что специфическая активность исследуемых образцов положительна, поскольку средняя величина плотности сосудов в опыте превышает таковую в контроле в 2 и более раза (Fett J.W., Strudom D.J., Lobb R.R., Alderman E. M. Biochemistry. - 1985, V. 24, p. 5480-5486). Химерный белок ангиогенина, полученный из клеточной биомассы *E. coli* BL 21 (DE3) pZZSA в соответствии с примером 1, используют, например, в мазевой форме на основе геля полиэтиленоксида.

Способ получения лечебного средства «ФАРМАГЕН».

Лечебное средство «ФАРМАГЕН» приготавливают следующим образом. В реактор с мешалкой при комнатной температуре загружают в указанных концентрациях (примеры 1-3) гель полиэтиленоксида и рекомбинантный белок ангиогенин. Смесь гомогенизируют 20-30 минут при комнатной температуре.

Далее готовое лечебно-профилактическое средство расфасовывают в тару и, хранят при температуре +7°C. Холодный способ приготовления препарата позволяет максимально сохранить активность входящего в него белка ангиогенина человека.

Ниже приведены примеры лечебного средства «ФАРМАГЕН».

Пример 1. Лечебное средство «ФАРМАГЕН» с минимальным содержанием биологически активного компонента:

белок ангиогенина человека	0.5 мкг/мл
бензойная кислота	0.005 мл
гель полиэтиленоксида	до 1 мл.

Полученное средство необходимо применять для лечения не больших по объему ран.

Пример 2. Лечебное средство «ФАРМАГЕН» со средним содержанием биологически активного компонента: белок ангиогенина:

человека	20 мкг/мл
бензойная кислота	0.005 мл
гель полиэтиленоксида	до 1 мл.

Пример 3.

Лечебное средство «ФАРМАГЕН» с максимальным содержанием биологически активного компонента:

белок ангиогенина человека	1000 мкг/мл
бензоат натрия	0.01 мл
гель полиэтиленоксида	до 1 мл.

Выявленные показания к применению заболеваний и повреждений кожи различной этиологии:

- при ожогах (отморожениях) различной степени тяжести (гель «Фармаген» эффективен как средство первой помощи, а также в процессе лечения и реабилитации);
- травматических повреждениях кожного покрова в виде порезов, ссадин, трещин, пролежней;

- заболеваниях, связанных с нарушением кровообращения, трофических язвах;
- варикозном расширении вен, облитерирующем эндартериите сосудов нижних конечностей;
- повреждениях спинного мозга для стимуляции компенсаторных возможностей кровеносной системы;
- переломах костей для ускорения регенерации;
- повреждении мягких тканей в виде острой язвы желудка, травм печени, селезенки, легкого, почек и других органов.
- кожных болезнях (склеродермия, псориаз, неинфекционные дерматиты, алопеция).

Причины возникновения заболеваний могут быть разными - ожоги, пролежни, диабет или ишемическое поражение сосудов, но в любом случае «ФАРМАГЕН» действует сходным образом: стимулирует развитие новых кровеносных сосудов в месте повреждения, от чего дефект успешно зарастает, причем без образования рубцов.

Изобретение используют следующим образом. Гель с использованием аппликатора наносят тонким слоем на поврежденную поверхность через 6-12 часов и далее по мере заживления раны раз в сутки до полного восстановления дефекта кожи.

Длительные экспериментальные исследования показывают, что мазь обладает специфическим заживляющим действием, способствующим быстрому восстановлению эпителиального покрова без образования рубцов, улучшает кровообращение в области повреждения тканей за счет восстановления капиллярной сети и стимулирует местный иммунитет. Гель образует защитную пленку на ожоговой либо раневой поверхности, что значительно снижает вероятность инфекционных осложнений, отечность и болевые ощущения.

Таблица 1

Данные ангиогенной активности химерного белка на ХАО развивающегося куриного эмбриона

№ пп	Препарат	Число сосудов на единице поверхности (см) при прямом подсчете под лупой
1	0.9% NaCl (контроль)	38.*12.3
2	Экстракт белков E. coli	36.7*9.7
3	Химерный ангиогенин (0.1 мг/мл)	111.8*85.2
4	Химерный ангиогенин (0.2 мг/мл)	72.6*21.4

**Формула изобретения**

1. Лечебное средство - гель "ФАРМАГЕН", включающее основу в виде водорастворимого полимерного геля и белок ангиогенина, отличающееся тем, что оно дополнительно содержит бактериостатик, при следующем соотношении компонентов: белок ангиогенина человека 0.5-1000 мкг/мл, водорастворимый полимерный гель до 1 мл, бактериостатик до 0.01 мл.

2. Лечебное средство - гель "ФАРМАГЕН" по п. 1, отличающееся тем, что в качестве белка ангиогенина оно содержит генно-инженерный продукт, полученный культивированием бактерии Escherichia coli штамм BL21(DE3) pZZSA и выделенный из культуральной жидкости с использованием методов хроматографии.

3. Лечебное средство - гель "ФАРМАГЕН" по пп. 1, 2, отличающееся тем, что в качестве водорастворимого полимерного геля оно содержит гель полиэтиленоксида.

4. Лечебное средство - гель "ФАРМАГЕН" по пп. 1, 2, 3, отличающееся тем, что в качестве бактериостатика оно содержит бензойную кислоту.

5. Лечебное средство - гель "ФАРМАГЕН" по пп. 1, 2, 3 и 4, отличающееся

тем, что в качестве бактериостатика оно содержит бензоат натрия.

Составитель описания  
Ответственный за выпуск

Усубакунова З.К.  
Арипов С.К.

---

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03