



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 019 190** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁵ **A 61 K 39/395**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 5040865/14, 22.04.1992
(46) Дата публикации: 15.09.1994
(56) Ссылки: Авторское свидетельство СССР N 1079246, кл. A 61K 39/50, 1977.

(71) Заявитель:
Фирма "Ассоль-XXI"
(72) Изобретатель: Гончар В.А.,
Воробьев К.В.
(73) Патентообладатель:
Гончар Владимир Александрович,
Жумашев Амангельды Муратович

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИСЫВОРОТКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биологии и может быть использовано для стимуляции жизнедеятельности клеток органов и тканей человека и животных. Сущность изобретения состоит в выполнении содержащихся в противотканевой сыворотке иммунных α , β и γ - глобулинов в виде антител моноспецифической направленности действия на надпочечники человека. При этом в способе получения противотканевой сыворотки, включающем получение антигенного материала из органа-мишени,

иммунизацию животного-донора этим антигенным материалом с последующей эксфузией крови иммунизированного животного и отделение сыворотки, после эксфузии производят отделение жидкой фракции крови, а затем проводят абсорбцию этой отделенной фракции крови белками плазмы крови и форменными элементами крови видовой принадлежности источника антигенного материала, после отделения сыворотки проводят очищение ее от абсорбента, а затем определяют активность очищенной сыворотки. 1 табл.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 019 190** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁵ **A 61 K 39/395**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5040865/14, 22.04.1992

(46) Date of publication: 15.09.1994

(71) Applicant:
Firma "Assol'-XXI"

(72) Inventor: Gonchar V.A.,
Vorob'ev K.V.

(73) Proprietor:
Gonchar Vladimir Aleksandrovich,
Zhumashev Amangel'dy Muratovich

(54) **METHOD OF MONOSPECIFIC ANTISERUM PREPARING**

(57) Abstract:

FIELD: biology. SUBSTANCE: method involves the preparing of α -, b- and g-globulins containing in antitissue serum showing immune properties in the form of antibodies with monospecific directivity on adrenal glands. Method of antitissue serum involves preparing of antigenic material from target-organ, immunization of animal-donor with this antigenic material

following by blood exfusion of immunized animal and serum separation. After exfusion liquid blood fractions are separated following by absorption of separated blood fraction with blood plasma proteins and blood formed elements with species specificity of antigen source material. After serum separation the serum is purified from adsorbent following by assay of serum purified. EFFECT: improved method of antiserum preparing. 1 tbl

Изобретение относится к биологии и может быть использовано для стимуляции жизнедеятельности клеток органов и тканей человека и животных.

Известна сыворотка серотрансфузин, содержащая водно-солевой раствор, включающий, г: NaCl 7,5; KCl 0,4; MCl 0,4; NaH_2PO_4 0,0518; Na_2HPO_4 0,467 и глюкозу 10,0 на 1000 мл воды, причем к солевому раствору добавлена сыворотка крови человека в 20%-ной концентрации.

Недостатком этой сыворотки является вызываемая ею опасность развития аллергических осложнений.

Известен способ получения сыворотки, включающий приготовление водно-солевого раствора заданной концентрации и добавление к нему сыворотки человеческой крови.

Недостатком данного способа является невозможность обеспечения с его помощью сложных технологий, требуемых для изготовления сывороток с заданной видовой специфичностью.

Прототипом изобретения является способ получения сыворотки, включающий изготовление однородного в смысле последующего применения антигенного материала, иммунизацию животного-донора этим однородным антигенным материалом с последующей эксфузией крови у этого донора, отделение полученной иммунной сыворотки и последующую ее сублимацию.

Недостатком прототипа является невозможность получения с его помощью моноспецифической антисыворотки с антисупраренальной направленностью.

Сущность изобретения состоит в том, что в противотканевой сыворотке, включающей иммунные α , β и γ глобулины, альбумины и прочие белки, α , β и γ глобулины выполнены в виде антител моноспецифической направленности действия на надпочечники человека и животных при следующем соотношении компонентов, мас. %: α глобулин 6,0-10,0; β глобулин 20,0-25,0; γ глобулин 60,0-70,0; альбумин и прочие белки - 0,0-3,5.

Сущность изобретения состоит также в том, что в способе получения противотканевой сыворотки, включающем получение однородного антигенного материала из органа-мишени, иммунизацию животного-донора этим антигенным материалом с последующей эксфузией крови иммунизированного животного и отделение сыворотки, после эксфузии крови иммунизированного животного производства отделение жидкой фракции крови, а затем проводят абсорбцию этой отделенной фракции крови белками плазмы крови и форменными элементами крови видовой принадлежности источника антигенного материала.

Далее в способе получения противотканевой сыворотки после отделения сыворотки проводят очищение ее от абсорбента, а затем определяют активность очищенной сыворотки.

При этом абсорбцию проводят 3-5 раз, а антигенный материал изготавливают в виде водно-солевого экстракта из разрушенных до уронеи оргanelл клеток тканей надпочечников организма видовой принадлежности соответственно последующему применению и 0,9-0,95%-ного

раствора NaCl, причем экстракт выполняют с содержанием белка 1,5-2,5 г/л, а конечное содержание белка в сыворотке получают в концентрации 6,0-10,0 г/л, причем иммунизацию животного-донора принимают завершено после 5-7 введений ему антигенного материала, второе введение антигенного материала осуществляют через 10-15 дней после первого введения, а третье и каждое следующее введение антигенного материала проводят через 3-5 дней предыдущего.

Далее в способе получения противотканевой сыворотки перед разрушением клеток тканей донорского органа (надпочечника) проводят его механическую очистку от жировых тканей, соединительных тяжей и кровеносных сосудов и последующую их фильтрацию, в качестве форменных элементов при абсорбции используют лейкоциты крови, а активность очищенной сыворотки определяют в реакции пассивной гемагглютинации.

При этом разрушение клеток тканей надпочечников производят путем трех- и более кратной процедуры в виде механической гомогенизации, последующего замораживания, выдерживания в замороженном состоянии и оттаивания, причем после выполнения последней процедуры гомогенизацию повторяют еще раз, а полученный материал центрифугируют. Кроме того, замораживание разрушаемых клеток тканей осуществляют в интервале температур (-15) - (-20)°C, выдерживание в замороженном состоянии проводят в течении 10-24 ч, оттаивание производят при температуре 25-35°С, а центрифугирование проводят в течение 40-60 мин.

Предложенный состав противотканевой сыворотки обеспечивает локализацию действия препарата на взаимодействие с надпочечниками организма человека и животных и регуляцию функций надпочечниковых клеток.

Предлагаемый способ получения противотканевой сыворотки обеспечивает возможность создания моноспецифической антисыворотки с антисупраренальной направленностью и приводит к требуемой очистке антисупраренальной антисыворотки от остальных противоорганных антител, кроме моноспецифических антител к тканям надпочечников.

Пример. Антигенный материал готовят из ткани надпочечника трупа человека, погибшего от механической травмы без повреждения внутренних органов тела. Надпочечники очищают от жировой ткани, соединительных тканых тяжей и крупных сосудов. Очищенные таким образом ткани надпочечников промывают 0,9-0,95%-ным раствором хлорида натрия, измельчают ножницами, заливают равным объемом того же раствора хлорида натрия и гомогенизируют в ротационном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при 1500 об/мин в течение 5-10 мин порциями объемом 5 мл. После этого гомогенат сливают в общую емкость, фильтруют через марлевый (8-10 слоев марли) фильтр и замораживают при температуре (-15)-(-20)°C. После замерзания гомогената его выдерживают при той же температуре в течение 10-24 ч, а затем размораживают, помещая под струю теплой

воды (температура 25-35°C). Оттаявший гомогенат снова гомогенизируют в том же режиме и снова замораживают. Процедуру повторяют от трех до семи раз, после чего снова гомогенизируют гомогенат, а затем материал центрифугируют при 6000 об/мин в течение 40-60 мин. После этого осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость используют в качестве антигенного материала, предварительно доведя содержание в ней белка до 1,5-2,5 г/л.

Иммунизируют здоровых беспородных кроликов массой тела не менее 2,5 кг. Цикл иммунизации состоит из 5-47 инъекций, причем первая состоит из введения животным части антигенного материала вместе с полным адьювантом Фрейнда в подушечки всех четырех лап, а остальную часть антигена при первой инъекции проводят внутривенно, в краевую вену уха. Инъекцию в лапы готовят из расчета 0,4 мл/кг антигена, 0,2 г/кг ланолина, 0,4 г/кг вазелина, 0,02 г/кг туберкулина, а в краевую вену уха вводят 0,6 мл/кг антигена.

Спустя 14 дней после первой иммунизации животных реиммунизируют внутривенным введением антигенного материала из расчета 1 мл/кг массы тела. Последующие инъекции осуществляют с интервалом 3-5 дней внутривенно. Через 14 дней после заключительного введения антигенного материала проводят тотальную эксфузию крови.

Кровь собирают в стеклянные емкости, оставляют на сутки при 12-15 °С, а затем сыворотку крови переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин. Сгустки, оставшиеся после снятия сыворотки, разрезают стеклянными палочками и центрифугируют в том же режиме. Осадок отбрасывают, отснятую сыворотку хранят в замороженном виде при (-20°C) до абсорбции не более 3 месяцев. Абсорбцию иммунной сыворотки форменными элементами и белками плазмы крови человека производят в стеклянных емкостях достаточного объема. Размороженную при 18 °С сыворотку смешивают с плазмой крови доноров всех групп крови в соотношении: 50 мл смешанной плазмы на 1000 мл иммунной сыворотки. После пятнадцати минутной экспозиции при комнатной температуре смесь разливают в центрифужные стаканы и центрифугируют при 2500 об/мин в течение 15-25 мин. Надосадочную часть переносят в чистую емкость, куда добавляют отмытые от консерванта форменные элементы крови человека каждой из четырех групп крови поровну, таким образом, чтобы суммарный объем форменных элементов крови равнялся объему абсорбируемой сыворотки. Сразу после перемешивания смесь разливают в центрифужные стаканы и центрифугируют на рефрижераторной центрифуге типа К-70 при 10-15°C в течение 15-25 мин при 2500 об/мин.

Описанную процедуру абсорбции форменными элементами крови человека повторяют еще 3-4 раза. После последнего центрифугирования сыворотку подвергают абсорбции заранее приготовленными лейкоцитами из плазмы крови доноров всех четырех групп крови.

После проведения реакции пассивной гемагглютинации сыворотку подвергают

риванольному фракционированию. В стерильную емкость достаточного объема помещают все количество абсорбированной сыворотки и по каплям добавляют 3,4% -ный риванол в объеме, составляющим половину объема сыворотки. Фракционирование происходит при pH=8,3-8,5, что обеспечивается добавлением 10% -ного гидрокарбоната натрия. Ингредиенты тщательно перемешивают. Процесс фракционирования происходит при комнатной температуре. После добавления последней порции риванола смесь продолжают перемешивать еще 25-30 мин, после чего дают отстояться в течение 30-40 мин до образования плотного слоя альбуминов над раствором глобулинов. Раствор глобулинов переносят в отдельную емкость и, с целью удаления излишков риванола, смешивают с активированным углем ОУ марки А, добавляя последний из расчета 160 г/л раствора глобулинов при тщательном перемешивании. Затем смеси дают отстояться при комнатной температуре в течение часа, жидкую часть переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют при 2500 об/мин в течение 25-30 мин. Осветленный раствор полученной противотканевой сыворотки проверяют на отсутствие риванола, а после отрицательной пробы подвергают стерилизационной фильтрации через миллипоровские фильтры с диаметром пор 0,25 мкм на установке "Millipor" (США).

Для определения концентрации белка применяли биуретовый метод. Результаты исследований свидетельствовали о том, что концентрация белка в растворах после фракционирования составляла от 6,9 до 8,5 г/л. Для более удобного использования препарата концентрацию белка повышали до 10-30 г/л. Для этого после выделения глобулиновых фракций из противонадпочечниковых сывороток препарат лиофилизировали и растворяли в дистиллированной воде в меньшем объеме, чем тот, из которого они были лиофилизированы. Препараты для контрольного исследования, полученные из неиммунных кроличьих сывороток, концентрировали до соответствующей величины глобулинов.

Анализ глобулинов производили методом электрофореза в полиакридном геле (ПАГ-200) по показателю pH. Объемы препаратов для разгонки составляли $(0,01-0,02) \cdot 10^{-3}$ л. Образцы окрашивали амидочерным -В (5 г/л в спиртовом растворе ледяной уксусной кислоты) и после остывания - денситометрировали.

Результаты денситометрии показали, что в исследуемом составе альбумины либо полностью отсутствовали, либо сохранялись лишь в количествах, обозначаемых как "следы".

При этом в противонадпочечниковых сыворотках в результате риванольного фракционирования указанным способом относительное содержание α -глобулинов составляло 6-10%, β - глобулинов для 20-25%, γ -глобулинов - 40-70%.

Таким образом, полученные противонадпочечниковые сыворотки представляют собой смесь глобулиновых фракций с преобладающим

содержанием β и γ фракций, имеют рН в пределах 7,8-8,2 при конечной концентрации белка в разных сериях от 7,5 до 30,0 г/л.

В таблице приведены данные, показывающие влияние абсорбции иммунных сывороток белками плазмы и форменными элементами крови на титры специфических и неспецифических тел в них, характеризующие активность и избирательность действия полученной противотканевой сыворотки. Токсичность полученной противотканевой сыворотки определяли в соответствии с утвержденным МЗ СССР приказом N 31 от 13.01.83 г. "Об унификации методов контроля медицинских иммуно-биологических препаратов" методическими рекомендациями "Требования к доклиническому применению общетоксического действия новых фармакологических средств" М.: 1985.

Испытания проводили на двух видах животных.

Белые мыши. Выбирали 5 здоровых животных массой 17-22 г при регламентированном рационе, ранее не использованных ни в каких исследованиях. Противотканевую сыворотку вводили внутривенно в объеме не более 0,5 мл со скоростью не более 0,1 мл/с.

Морские свинки. Выбирали 3 здоровых животных массой 250-350 г, находящихся на регламентированном рационе и не использованных ранее ни в одном эксперименте. Противотканевую сыворотку вводили внутривенно в объеме не превышающем 5 мл.

Наблюдения проводили в течение семи дней после инъекции.

Поскольку все животные остались живы, ни у одного из них не наблюдалось появления признаков какого-либо заболевания, масса тела ни у одного животного за период наблюдения не снизилась, и отсутствовали воспалительные изменения в месте инъекции, было сделано заключение о нетоксичности полученной противотканевой сыворотки.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что противотканевая сыворотка и способ ее получения дают возможность выделения лекарственного препарата, обеспечивающего моноспецифическое воздействие на надпочечники человека и животных и

позволяющего менять функционирование этой железы внутренней секреции в требуемом направлении, а, поскольку участие иммунной системы в защитно-приспособительных реакциях организма путем перераспределения иммунокомпетентных клеток зависит от деятельности коры надпочечников, предполагаемое изобретение предоставляет возможность оказывать в терапевтических целях регуляторное воздействие на иммунную реактивность организма.

Формула изобретения:

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ

МОНОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИСЫВОРОТКИ направленного действия, включающий многократную иммунизацию животных антигенным материалом с последующим забором крови и отделения антисыворотки, отличающийся тем, что антигенный материал готовят из ткани надпочечников, которые промывают, измельчают, гомогенизируют в физиологическом растворе, фильтруют, фильтрат замораживают, выдерживают при температуре (-15) - (-20)°C в течение 10 - 24 ч, размораживают, процедуру замораживания с последующим размораживанием повторяют от 3 до 7 раз, после чего фильтрат снова гомогенизируют и центрифугируют, а затем антигенный материал собирают и иммунизацию проводят с адъювантом Фрейнда с интервалом между инъекциями 3 - 5 дней, а антисыворотку замораживают, смешивают с плазмой крови доноров всех групп, выдерживают при комнатной температуре, центрифугируют, к надосадной жидкости добавляют форменные элементы крови в соотношении 1 : 1, перемешивают, вновь центрифугируют, надосадочную жидкость собирают, причем процедуру абсорбции повторяют 3 - 4 раза, поэтапно добавляют раствор 3,4%-ного риванола до половины объема сыворотки, перемешивают, инкубируют при рН 8,3 - 8,5 30 - 40 мин, раствор собирают, смешивают с активированным углем при перемешивании, смесь выдерживают при комнатной температуре, центрифугируют, а надосадочную жидкость, содержащую целевой продукт, подвергают стерилизующей фильтрации.

50

55

60

1 2 0 6 1 6 1 0 2 R R

Специфичность сывороток	Надпочечников		Титры антител к антигенам:									
	корков. вещ-ва	мозгов. вещ-ва	Эритро- цитов	Лимфо- цитов	Тромбо- цитов	Белков плазмы крови	Печени	Почек	желез		Миокар- Да	
									щито- видной	поджелу- дочной		
К корковому веществу надпочечников собак												
До абсорбции	1:512- 1:4096	1:16- 1:128	1:16- 1:64	1:8- 1:32	1:8- 1:16	1:16- 1:32	1:8- 1:32	1:8- 1:32	1:4- 1:16	1:4- 1:16	1:8- 1:16	
После абсорбции	1:256- 1:2048	1:8 1:32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
К мозговому веществу надпочечников собак												
До абсорбции	1:16 1:64	1:512 1:2048	1:32 1:64	1:16 1:32	1:8 1:16	1:8 1:16	1:8 1:16	1:8 1:16	1:8 1:16	1:8 1:16	1:8 1:16	
После абсорбции	1:8 1:16	1:512 1:1024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	