



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010141934/15, 14.10.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.10.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.10.2010

(45) Опубликовано: 20.11.2011 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2249462 C1, 10.08.2003. RU 2188206 C2,
27.08.2002. EP 0069260 A, 12.01.1983.

Адрес для переписки:

117461, Москва, ул. Каховка, 18-1, кв.13, Н.В.
Перовой

(72) Автор(ы):

Севастьянов Виктор Иванович (RU),
Перова Надежда Викторовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество "БИОМИР
сервис" (RU)

(54) ИНЪЕКЦИОННЫЙ ГЕТЕРОГЕННЫЙ БИОПОЛИМЕРНЫЙ ГИДРОГЕЛЬ ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ХИРУРГИИ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к инъекционному гидрогелю для заместительной и регенеративной хирургии. Инъекционный гетерогенный упруго-эластичный биodeградируемый биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии, который получают из гидролизата эмбриональных или постнатальных коллагенсодержащих тканей животного происхождения, исключая человека, причем он состоит из двух составляющих: твердой - микрочастиц из сшитого гидролизата и жидкой - из исходного гидролизата, взятые в определенном соотношении, с размером микрочастиц не превышает 100 мкм. Способ получения инъекционного гидрогеля, включает измельчение исходного сырья, замораживание полученной массы при определенных условиях, затем

размораживание, обработку раствором ледяной уксусной кислоты, отделение надосадочной жидкости, промывку водой, обработку раствором гидроксида натрия, центрифугирование полученного гидролизата тканей животных в виде гидрогелевой массы с последующим ее фильтрованием, часть полученного гидролизата обрабатывают γ -облучением в дозе 1.0 кГр в газовой среде и гомогенизируют до получения микрочастиц размером не более 100 мкм, отмывают фосфатным буферным раствором и смешивают с оставшимся объемом исходного гидролизата тканей животных, получают инъекционный гетерогенный упругоэластичный биodeградируемый биополимерный гидрогель. Вышеописанный гидрогель обладает иммуногенностью, длительным эффектом биостимулирующих свойств. 2 н. и 3 з.п. ф-лы, 4 ил., 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010141934/15, 14.10.2010**

(24) Effective date for property rights:
14.10.2010

Priority:

(22) Date of filing: **14.10.2010**

(45) Date of publication: **20.11.2011 Bull. 32**

Mail address:

**117461, Moskva, ul. Kakhovka, 18-1, kv.13, N.V.
Perovoj**

(72) Inventor(s):

**Sevast'janov Viktor Ivanovich (RU),
Perova Nadezhda Viktorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "BIOMIR
servis" (RU)**

(54) INJECTION HETEROGENIC BIOPOLYMER HYDROGEL FOR SUBSTITUTIONAL AND REGENERATIVE SURGERY AND METHOD OF ITS OBTAINING

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: injection heterogeneous elastically-resilient biodegradable biopolymer hydrogel for substitutional and regenerative surgery, obtained from hydrolysate of embryonic or postnatal collagen-containing tissues of animal origin, excluding human, which consists of two constituents: hard - microparticles from linked hydrolysate and liquid - from initial hydrolysate, taken in specified ratio, with particle size not exceeding 100 μm . Method of obtaining injection hydrogel includes crush of initial raw material, freezing obtained mass under definite conditions, following defrosting, processing with solution of icy acetic acid,

separation of supernatant liquid, washing with water, processing with sodium hydroxide solution, centrifuging obtained hydrolysate of animal tissues in form of hydrogel mass with its further filtration, part of obtained hydrolysate is processed by γ -irradiation in dose 1.0 kGy in gaseous medium and homogenised until particles with size not larger than 100 μm are obtained, washed with phosphate buffer solution and mixed with remaining volume of initial hydrolysate of animal tissues, obtaining injection heterogeneous elastically-resilient biodegradable biopolymer hydrogel.

EFFECT: hydrogel possesses immunogenicity, prolonged effect of biostimulating properties.

5 cl, 4 dwg, 3 tbl, 6 ex

Изобретение относится к области медицины, в частности к новому биodeградируемому биополимерному гидрогелю для заместительной и регенеративной хирургии мягких тканей и способу его получения.

5 Для восстановления функций поврежденных тканей и органов при ряде тяжелых заболеваний и для пластической хирургии активно разрабатываются новые материалы, причем основной акцент исследований сделан на биополимерных материалах, как наиболее биологически безопасных и функционально эффективных [Advances in replacement organs and tissue engineering. Technical Insights, 10 Frost & Sullivan, 2008].

В связи с этим одной из ключевых проблем является разработка биodeградируемых двухмерных и трехмерных материалов с заданными медико-техническими свойствами как для восстановления дефектов мягких и твердых тканей, так и для трансплантации клеток органов и тканей.

15 В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биodeградируемым природным (биологическим) полимерам или биополимерам (альгинаты, коллаген, желатин, хитозан, фиброины шелка, полиэфиры бактериального происхождения - полиоксibuтираты и их сополимеры). Природные полимеры, помимо высокой степени биосовместимости с организмом, являются высокоэффективными биостимуляторами [Atala A., Lanza R., Thompson J., Nerem R. Principles of regenerative medicine. Academic Press is an imprint of Elsevier, First edition, 2008, 1473 p.; Шумаков В.И., Севастьянов В.И. Биополимерные матрицы для искусственных органов и тканей. Здравоохранение и медицинская техника. 2003, №4, с.30-33; Kim B.-S., Baez C.E., 20 Atala A., Biomaterials for tissue engineering. World J. UroL, 2000, v.18(4), p.2-9].

Промежуточными продуктами биодеструкции таких материалов могут быть вещества, включаемые в метаболизм клеток, например моносахара, молочная, гликолевая и β -оксимасляная кислоты, либо вещества, не метаболизируемые клетками и тканями. Продуктами полной деградации биополимеров являются углекислый газ и вода.

Из перечисленных биополимеров к наиболее распространенным материалам для изготовления медицинских изделий, в том числе и имплантатов, относится коллаген, представляющий собой трехспиральный белок с молекулярной массой 300 000 Да.

35 Коллаген - белок, являющийся основным фибриллярным компонентом внеклеточного матрикса, а также важнейшей составной частью соединительной ткани [Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Истранов Л.П., Леманев В.Л. Коллаген и его применение в медицине, Москва, «Медицина», 1976, 210 с.]. Он составляет около 30% 40 общей массы белков у млекопитающих и присутствует почти в каждой ткани, обеспечивая прочность и структурную стабильность. Хотя коллаген является превалирующим гликопротеионом внеклеточного матрикса, в состав внеклеточного матрикса входит множество других белков: фибрин, эластин, фибронектины, ламинины и нидогены.

45 Разнообразные механические и физиологические свойства различных рыхлых и плотных типов соединительной ткани (дермы, сухожилий, хрящей, роговицы, стромы органов, синовиальной оболочки и т.д.) определяются количественными и качественными вариациями во взаимоотношениях между клетками, волокнами и 50 основным веществом.

Все типы растворимого коллагена можно разделить на две категории. Первая категория охватывает растворимые фракции коллагена, получаемые прямой экстракцией из соединительной ткани (нативные растворы), вторая - растворимый

коллаген, получаемый после предварительной ферментативной, химической или механической обработки нерастворимого, зрелого коллагена (принудительно растворенный или солюбилизированный коллаген). Экстрагированный кислыми буферами (растворимый) коллаген получил название проколлагена. Различаются между собой они только метаболической активностью, содержанием в тканях и степенью внутримолекулярного скрепления пептидных цепей.

Коллаген обладает исключительно слабыми антигенными свойствами, также обладает чрезвычайно слабыми анафилактическими и токсическими свойствами. При введении коллагена в организм подвергается быстрой резорбции, расщепляясь, он стимулирует репаративные процессы, в частности образование собственного коллагена организма, обладает гемостатическими свойствами. В связи с этим коллаген и изделия на основе коллагена широко используются в косметологии и медицине.

Наибольшее значение в формировании коллагеновых структур имеют мукополисахариды, или гликозаминогликаны, входящие в состав внеклеточного матрикса. В соединительной ткани они существуют в виде комплексов с белками (протеогликанов) и связаны с последними не только электростатическими (ионными, водородными и т.д.) связями, но и более прочными ковалентными. Коллаген - единственный белок животного происхождения, содержащий большое количество таких аминокислот, как оксипролин, глицин и пролин. Уровень оксипролина характеризует количество и степень чистоты коллагена. В состав коллагена входят простые сахара: глюкоза, галактоза, манноза, что обеспечивает питание клетки.

Важнейшим качеством коллагена как биополимера является его биосовместимость, что обусловлено структурой его молекулы и физико-химическими свойствами. Коллаген способен резорбироваться (рассасываться) и утилизироваться организмом, расщепляясь на более простые соединения, которые выводятся из организма или принимают участие в биосинтезе, происходящем на клеточном уровне.

Практические исследования по механизму биостимулирующих и лечебных свойств коллагена показали его активное воздействие на осуществление многих функций соединительной ткани, особенно морфогенетической и репаративной. Он активно участвует во взаимодействии с клетками, организующими репаративный (восстанавливающий) процесс, что значительно снижает сроки заживления. Однако наряду с перечисленными преимуществами, серьезным недостатком коллагеновых матриксов является нерегулируемое время биодegradации и ограниченный срок функционирования коллагеновых изделий (до 1 месяца) в условиях живого организма, что недостаточно для полного восстановления и приводит к формированию рубцовой ткани.

Для уменьшения скорости биорезорбции коллаген сшивают с помощью химических агентов, ультрафиолетового излучения или подвергают гидротермическому сшиванию. Например, химическое сшивание можно осуществить с помощью хондроитин-4-сульфата и/или хондроитин-6-сульфата. В качестве примера можно рассмотреть патент РФ №2188206, опубликованный в августе 2002 г., где речь идет об использовании нативного коллагена или такового в измельченном и солюбилизированном состоянии, поэтапно прогретого с определенными физико-химическими свойствами. Этот препарат может быть использован в фармацевтической, медико-хирургической, офтальмологической и косметической композиции. Однако полученный в результате сшивания коллагеновый гель невозможно вводить через инъекционную иглу.

Аналогами настоящего изобретения можно считать различные

коллагенсодержащие вещества и биоконструкции, которые могут использоваться для хирургических и биопластических целей: например, способ получения средства, стимулирующего репаративные процессы (патент РФ №2065745, 27.08.1996 г.); ранозаживляющее покрытие (патент РФ №2085217, 1997 г.), материал для пластики тканей (патент РФ №2137441, 1999 г.), армированный трансплантат для склеропластических операций (патент РФ №2140242, 1999 г.), антиадгезионный агент (патент РФ №2155592, 2000 г.), биосовместимый полимерный материал и способ его получения (патент РФ №2162343, 2001 г.), коллагенсодержащий материал для кератинопластики (патент США №6197330, 2001 г.), способ хирургического устранения рубцовых деформаций кожи (патент РФ №2201146, март 2003 г.), способ получения содержащего коллаген I и коллаген II, способный к рассасыванию коллагеновый матрикс, предназначенный для реконструирования хряща (патент РФ №2323011, 27.04.2008 г.).

Однако в перечисленных разработках содержится описание использования гомогенного коллагена или других составляющих внеклеточного матрикса, часто в комбинации с другими полимерами, для замещения дефектов мягких тканей и создания биологических имплантатов.

В качестве наиболее близкого аналога (и для гидрогеля, и для способа получения) можно рассмотреть патент РФ №2249462, 10.04.2005 г, где речь идет об универсальном гетерогенном коллагеновом матриксе для имплантации, представляющем собой упругоэластичную массу, полученную из двух источников коллагена, причем один источник является тканью позвоночного животного одного класса, а второй - животного другого класса, при этом источниками коллагена являются ткани животных, например, класса млекопитающих и класса птиц. Матрикс состоит из двух фаз: твердой - в виде микросфер из коллагена ткани млекопитающих размером 100-300 мкм, и жидкой - из денатурированного коллагена ткани птиц, при соотношении фаз (1-10): (1-10), конечными продуктами биодеградации матрикса являются CO_2 и H_2O .

Основными недостатком этого гетерогенного коллагенового матрикса являются:

- наблюдаемые случаи иммуногенности, вызванной коллагеном микросфер;
- относительно кратковременный эффект проявления биостимулирующих свойств из-за высокой скорости биодеградации жидкой фазы денатурированного коллагена ткани птиц, отвечающей за биостимулирующие свойства;
- возможность введения гидрогеля через тонкую инсулиновую иглу (диаметр 0,45 мм) только при больших разведениях твердой фазы, что существенно ограничивает его область применения.

Техническим результатом, достигаемым при использовании предлагаемой группы изобретений, является:

- исключение иммуногенности за счет отсутствия нативного коллагена в составе предлагаемого гетерогенного геля и использования эмбриональных или постнатальных коллагенсодержащих тканей животного происхождения (исключая человека), не обладающих иммуногенной активностью, не обладающего иммуногенной активностью,
- увеличение длительности проявления эффекта биостимулирующих свойств за счет использования в качестве сырья для твердой составляющей гидролизата внеклеточного матрикса эмбрионального или постнатального сырья животного происхождения (исключая человека), представляющего собой уникальный комплекс полипептидов, гексозаминов, уроновых кислот и других биологически активных веществ,

- возможность введения гидрогеля через тонкую иглу (с диаметром менее 0,45 мм) за счет использования сшитой и несшитой составляющих из гидролизата тканей животных (исключая человека) в эмбриональном или постнатальном периоде за счет меньшего среднего размера микроглобул (50 мкм против 100 мкм) и большей их эластичности вследствие меньшей молекулярной массы компонентов гидролизата. Так, молекулярная масса фармакопейного коллагена, получаемого щелочно-солевой обработкой, составляет ~450 кД, а молекулярная масса тропоколлагена (кислоторастворимого коллагена) - ~400 кД [Баблюян О.О., Голованова П.М. // Экспериментально-клинические аспекты применения биологических полимеров в медицине: Сборник трудов. - М., 1981. - С.34-37], в то время как масса белковой составляющей гидролизата - полипептидов не превышает 6 000 Да.

Приоритетной областью применения предлагаемого гетерогенного биополимерного гидрогеля является использование для замещения дефектов мягких тканей в качестве имплантируемого материала или аппликационного ранозаживляющего покрытия при травмах и ожогах.

Способ осуществляют следующим образом.

Для получения гетерогенного биополимерного гидрогеля используют сырье животного происхождения, преимущественно здоровых цыплят в 5-8-суточном возрасте или эмбрионов свиней на сроках гестации не более 120 суток. В качестве сырья можно использовать другие источники коллагенсодержащего внеклеточного матрикса незрелых свежезабитых животных, со слабыми антигенными свойствами. Сырье очищают, промывают, измельчают до размеров частиц от 4 до 10 мм и полученную массу замораживают при температуре не выше минус 18°C на срок от 10 до 90 сут. Затем размораживают и погружают в 1%-ный водный раствор ледяной уксусной кислоты в соотношении 1:1 по массе на 8-12 ч при температуре не выше 60°C и периодическом перемешивании. После этого с массы сливают раствор (отделяют надосадочную жидкость) и промывают ее до чистой воды. Полученную массу обрабатывают при комнатной температуре 0,5%-ным раствором гидроксида натрия в соотношении 1:1 по массе в течение 30-40 мин, концентрируя извлеченные из внеклеточного матрикса в процессе гидролиза растворенные активные пептиды, аминокислоты и минеральные соединения, производят центрифугирование (полученного гидролизата тканей в виде гидрогелевой массы), удаление жира и фильтрацию раствора. Затем часть полученного гидролизата тканей животного происхождения обрабатывают γ -облучением в дозе 10 кГр в газовой среде и гомогенизируют до получения микроглобул (микрочастиц) размером не более 100 мкм, далее отмывают фосфатным буферным раствором и смешивают с оставшимся объемом исходного гидролизата коллагенсодержащих тканей животного происхождения.

Таким образом, гидрогель получают из гидролизата тканей животного происхождения. Гидрогель состоит из двух составляющих: твердой - микрочастиц из сшитого гидролизата коллагенсодержащих тканей и жидкой - из исходного гидролизата коллагенсодержащих тканей в соотношении от 1:10 до 10:1. Размер микрочастиц не превышает 100 мкм.

ПРИМЕР 1.

Испытания в условиях *in vitro*.

Цитотоксичность: 1) гетерогенного биополимерного гидрогеля на суспензионной культуре подвижных клеток (семя крупного рогатого скота) не выявлена. Индекс токсичности составил $100 \pm 10\%$ при допустимых значениях 70-120%; 2) гидрогеля на

фибробластах мышцы линии 3Т3 клона SC-1. Морфология клеток была аналогичной контролю, количество клеток отличалось от контроля в пределах допустимой погрешности. Токсического действия не выявлено.

5 Гемолитическое действие гидрогеля было проверено на изолированных эритроцитах человека. Степень гемолиза составила $0,010 \pm 0,002\%$ при допустимом значении показателя не более 2%.

ПРИМЕР 2.

Испытания в условиях *in vivo*.

10 Раздражающего эффекта при однократной инсталляции в конъюнктивальный мешок глаза кролика нет. По оценочной шкале реакция соответствовала нулевой степени.

Исследование реакций общей анафилаксии и активной кожной анафилаксии на морских свинках показало отсутствие аллергических реакций анафилактического типа.

15 Сенсибилизирующего действия на белых крысах не выявлено, реакция дегрануляции тучных клеток отрицательная.

Имплантация выполнена на крысах (внутримышечно). Срок наблюдения 3 месяца. Морфологическими исследованиями патологических изменений окружающих тканей не выявлено.

20 Стерильность: Испытанные образцы стерильны.

Пирогенность: Экстракты, приготовленные на 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций, пирогенных реакций при внутривенном введении кроликам не показали. Суммарное повышение температуры не превысило 1,4°C.

25 Полученный продукт (матрикс, гидрогель) может быть помещен в одноразовые шприцы, например, объемом 1 мл, 3 мл, 5 мл, 20 мл и т.д., шприц стерильно пакуют, снабжают инструкцией по применению и этикеткой, на которой указывают содержание упаковки, дату изготовления.

30 Изобретение поясняется следующим лабораторными испытаниями инъекционного гетерогенного биополимерного гидрогеля.

Испытания предлагаемых изобретений проводились в условиях острого опыта на лабораторных животных для целей восстановления повреждения спинного мозга и периферической нервной системы.

ПРИМЕР 3.

35 Для экспериментального повреждения спинного мозга были использованы половозрелые беспородные крысы-самки массой тела не менее 300 г. В соответствии с задачами исследования на крысах была использована острая модель повреждения спинного мозга путем удаления участка спинного мозга после рассечения на уровне 10 позвонка грудного отдела позвоночника, по S. Woerly et al. [S. Woerly, V.D. Doan, F. Evans-Martin, C.G. Paramore, J.D. Peduzzi, "Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury", J. of Neuroscience Res. 2001. Vol.66, P.1187-1197].

45 Из всех прооперированных крыс 20 контрольным животным (I группа) не производили трансплантацию инъекционного гетерогенного биополимерного гидрогеля (ИГБГ) в область повреждения спинного мозга.

50 В опытной группе 30 животным (II группа) вводили ИГБГ в область повреждения спинного мозга. Имплантат из ИГБГ формировали так, чтобы он соответствовал по объему и по форме области поврежденного спинного мозга, и заполняли полость раны, обеспечивая полное соприкосновение гидрогеля с поверхностями перерезанного спинного мозга. Сверху область введения гидрогеля и прилегающие к ней участки спинного мозга изолировали от окружающих тканей подкожно-жировой клетчаткой

(ПЖК), как и в контроле.

Во время наблюдения регистрировались изменения тонуса мышц и двигательной активности задних конечностей крыс. Результаты наблюдений в течение 2-х месяцев показали: в контрольной группе из 20 животных в 85% случаев (17 крыс) сохранялась параплегия задних конечностей. У 3 крыс (15%) на 35 ± 17 сутки ($n=3$) была выявлена положительная динамика восстановления двигательной активности. Во всех трех случаях наблюдали гипертонус мышц задних конечностей.

В опытной группе II при имплантации ИГБГ с изолированием ПЖК положительная динамика восстановления двигательной активности была выявлена на 28 ± 10 сутки у животных (57%) ($n=17$). У всех 17 крыс отмечали гипертонус задних конечностей с положительной динамикой к концу эксперимента. У остальных 13 крыс из 30 на всем протяжении сохранялась параплегия задних конечностей. Из сравнения результатов контрольной и опытной группы можно сделать вывод о наличии бистимулирующих (регенерационных) свойств ИГБГ в экспериментальной модели полного перерыва спинного мозга. Разница результатов эксперимента достоверна с надежностью $p < 0,5$.

ПРИМЕР 4.

Задачей данного исследования было оценить влияние ИГБГ на формирование рубцовой ткани в области пересечения периферических нервов и на процессы регенерации-дегенерации нервной ткани. Исследования выполняли на самках нелинейных крыс весом 200-250 г. В опыте использовано 10 животных (20 оперативных вмешательств на обеих задних конечностях) - выполнялось пересечение седалищных нервов - под перитонеальным наркозом (анестетиком являлась смесь кетамина и тиопентала). В исследуемые группы входили 8 животных (16 нервов), которым в ходе операций в область пересечения нерва вводился ИГБГ. Контрольная группа (без применения биоматериалов) включала 2 животных (4 нерва). Животных выводили из эксперимента на 21 и 101 сутки путем передозировки тиопенталового наркоза. После вскрытия извлекали участок оперированного нерва с прилежащими тканями и подвергали морфологической обработке. Препараты готовили по стандартным методикам (окраски: гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, Клювер-Барреру).

В контрольной группе без применения каких-либо материалов в зоне перерезки седалищного нерва определялись замещение нервной ткани плотным рубцом, формирование рубцово-спаечного процесса в области оперативного вмешательства (фиг.1. Общий вид седалищного нерва в области перерезки. 101 сутки после операции: Ван-Гизон $\times 60$, 1 - рубцовая ткань, 2 - эпинеурий, 3 - мышечная ткань).

В группе операций, выполняемых с введением в зону пересечения ИГБГ в области вмешательства определялся сформированный соединительнотканый рубец, в котором отмечались регенерирующие аксоны (фиг.2. Рубцовая ткань в области перерезки седалищного нерва с использованием «Сферо®Геля». 101 сутки после операции: Ван-Гизон $\times 1000$, 4 - соединительнотканые волокна, 5 - осевые цилиндры, 6 - фибробласт).

Результаты проведенного экспериментального исследования применения нового инъекционного гетерогенного биополимерного гидрогеля позволяют предполагать повышение эффективности оперативных вмешательств при травматических поражениях периферических нервов, выполненных с использованием указанного материала.

При введении инъекционного гетерогенного биополимерного гидрогеля в область

шва нерва создаются предпосылки для более эффективной регенерации аксонов и их прорастания через область анатомического повреждения.

ПРИМЕР 5.

Оценка скорости биодеградации ИГБГ при имплантации.

5 Экспериментальные животные (10 крыс линии Вистар) были разбиты на две группы. Образцы коллагена (2%), полученного щелочно-солевой обработкой гольевого спилка дермы крупного рогатого скота (ФС 42-2670-89, производство
10 завода "Белкозин" г.Луга) и ИГБГ вводили внутримышечно в левую и правую бедренную мышцу, соответственно, одновременно каждому животному. Забор материала у первой группы крыс проводили через 1 месяц, у второй - через 3 месяца с последующим гистологическим анализом.

15 Эксперименты *in vivo* подтвердили, что микрогетерогенность геля приводит к увеличению времени его жизни. На сроке 1 месяц после имплантации ИГБГ в подкожно-жировую клетчатку крысы не обнаружено признаков деградации образца (Фиг.3а. Деградация ИГБГ при имплантации в подкожно-жировую клетчатку крысы: гистологическая картина после имплантации ИГБГ в подкожно-жировую клетчатку на сроке 1 месяц (ув.х200), окрашивание гематоксилин - эозин). После трех месяцев
20 имплантации отмечается фрагментация образца, но потеря массы составляет не более одной трети от исходной (Фиг.3б. Гистологическая картина после имплантации ИГБГ в подкожно-жировую клетчатку на сроке 3 месяца: окрашивание гематоксилин - эозин, ув.х200). В местах введения образцов коллагена обнаружить его не удалось из-за его полной резорбции.

25 Пример 6.

Сравнительный анализ химического состава коллагена I типа и ИГБГ.

30 Объекты для испытаний: коллаген (2%), полученный щелочно-солевой обработкой гольевого спилка дермы крупного рогатого скота. ФС 42-2670-89. Производство завода "Белкозин" г.Луга; полученный гидролизат.

Сравнительные результаты исследований суммированы в таблицах 1-3.

Таблица 1. Сравнительные данные аминокислотного состава коллагена (полученного из дермы крупного рогатого скота) и ИГБГ			
№	Наименование аминокислоты	Содержание аминокислоты в 100 г сухого белка	
		Коллаген	ИГБГ
35	1 Гликоль (глицин)	26,57	23,41
	2 Аланин	10,32	9,14
	3 Валин	2,46	2,43
	4 Лейцин	3,73	3,00
	5 Изолейцин	1,88	1,76
40	6 Пролин	14,42	11,83
	7 Оксипролин	12,83	10,14
	8 Аспарагиновая кислота	6,95	5,51
	9 Глутаминовая кислота	11,16	10,24
	10 Аргинин	8,22	8,01
45	11 Лизин	3,96	3,80
	12 Оксилизин	1,15	1,19
	13 Гистидин	0,70	0,81
	14 Серин	4,27	2,86
	15 Треонин	2,26	2,26
50	16 Цистин	-	-
	17 Метионин	0,97	1,24
	18 Фенилаланин	2,35	2,23
	19 Тирозин	0,99	0,73
	20 Триптофан	-	-

По аминокислотному составу ИГПГ идентичен коллагену, полученному щелочно-солевой обработкой голевого спилка дермы крупного рогатого скота.

5 Таблица 2. Содержание микроэлементов в ИГПГ и коллагене

Наименование химического элемента	Химический символ	Содержание в мг на кг	
		ИГПГ	Коллаген
Мышьяк	As	0	0
Бериллий	Be	0	0
10 Кальций	Ca	452,00	442,00
Кадмий	Kd	0	0
Кобальт	Co	0,60.	0,62
Хром	Cr	1,14	1.17
Медь	Cu	1,39	1,4
15 Железо	Fe	5,79	5,0
Калий	K	40,19	42,1
Литий	Li	0,12	0,16
Магний	Mg	53,61	50,61
Марганец	Mn	0,74	0,76
20 Натрий	Na	165,12	162,2
Никель	Ni	3,48	3,8
Фосфор	P	143,44	141,44
Свинец	Pb	0	0
Селен	Se	0	0
Кремний	Si	6,02	6,2
25 Олово	Ol	0	0
Титан	Ti	0,44	0,34
Вольфрам	W	0	0
Цинк	Zn	10,41	8,41

30 По микроэлементному составу оба образца идентичны.

Таблица 3.

Биохимическая характеристика ИГПГ и 2% раствора коллагена

Наименование образца	Содержание азота, г/г	Содержание белка по азоту, мг/г	Содержание белка по Лоури, мг/г	Содержание коллагена г/г	Содержание уоновых кислот, мг/г	Содержание гексозаминов, мг/г	Сухой остаток %
ИГПГ	6,80	42,50	50	4,60	1,03	2,50	4,20
35 2% раствор коллагена	3,42	21,37	-	1,90	0,06	1,10	2,19

Гидролизат превосходит коллаген по содержанию гексозаминов в 2 раза, а уоновых кислот более чем в 15 раз. Это как в известном материале (не гетерогенном) в эксолине.

40 При комнатной температуре ИГПГ представляет собой упругий однородный гель (Фиг.4. Общий вид инъекционного гетерогенного биополимерного гидрогеля (ИГПГ) из гидролизата тканей животного происхождения), устойчивый при длительном хранении и не склонный к явлениям синерезиса (выделение жидкой фазы). При

45 температуре 37° ИГПГ превращается в жидкость, смешивающуюся во всех соотношениях с водой. Высокая водорастворимость ИГПГ при температуре тела и наличие более низкомолекулярных остатков увеличивает его резорбцию и проникновение в ткани.

Таким образом, преимуществами ИГБГ являются:

50 1. Обе составляющие: твердая и жидкая, сформированы из гидролизата, обладающих биостимулирующими свойствами.

2. За счет существенно меньшей молекулярной массы гидролизата (не более 6000 Да) средний размер микрочастиц порядка 50 мкм, что позволяет вводить готовый

продукт через инъекционную иглу при любом соотношении составляющих (фаз), составляющих гидрогель.

3. Пролонгированный биостимулирующий (репаративный, регенеративный) эффект, т.к. биостимулирующими свойствами, в отличие от наиболее близкого аналога патент РФ №2249462, опубликованный в апреле 2005 г., обладает и твердая составляющая гетерогенного геля (в виде микрочастиц), скорость биодеградации которой при имплантации или накожной аппликации существенно меньше скорости биодеградации жидкой (гомогенной) составляющей, что, соответственно, обуславливает пролонгирование биостимулирующего эффекта ИГБГ.

4. Отсутствие аллергенности ИГБГ за счет использования эмбрионального или постнатального сырья животного происхождения (исключая человека), не обладающего иммуногенной активностью

Формула изобретения

1. Инъекционный гетерогенный упругоэластичный биодеградируемый биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии, который получают из гидролизата эмбриональных или постнатальных коллагенсодержащих тканей животного происхождения, исключая человека, причем он состоит из двух составляющих: твердой - микрочастиц из сшитого гидролизата и жидкой - из исходного гидролизата в соотношении от 1:10 до 10:1, причем размер микрочастиц не превышает 100 мкм.

2. Инъекционный гетерогенный упругоэластичный биодеградируемый биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии по п.1, отличающийся тем, что в качестве коллагенсодержащих тканей используют ткани здоровых цыплят в 5-8 суточном возрасте или эмбрионов свиней на сроках гестации не более 120 суток.

3. Способ получения инъекционного гетерогенного упругоэластичного биодеградируемого биополимерного гидрогеля для заместительной и регенеративной хирургии, включающий измельчение исходного сырья - эмбриональных или постнатальных коллагенсодержащих тканей животного происхождения, исключая человека, после чего полученную массу замораживают при температуре не выше минус 18°C на срок от 10 до 90 суток, затем размораживают, обрабатывают 1%-ным раствором ледяной уксусной кислоты при соотношении 1:1 по массе при температуре не более 60°C, отделяют надосадочную жидкость, выполняют промывку водой и последующую повторную обработку при комнатной температуре 0,5%-ным раствором гидроксида натрия в соотношении 1:1 по массе в течение 30-40 мин, затем осуществляют центрифугирование полученного гидролизата тканей животных в виде гидрогелевой массы с последующим ее фильтрованием, часть полученного гидролизата обрабатывают γ -облучением в дозе 1,0 кГр в газовой среде и гомогенизируют до получения микрочастиц размером не более 100 мкм, отмывают фосфатным буферным раствором и смешивают с оставшимся объемом исходного гидролизата тканей животных, получают инъекционный гетерогенный упругоэластичный биодеградируемый биополимерный гидрогель.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что полученный гетерогенный гидрогель стерилизуют γ -облучением в дозе 15 кГр.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что в качестве коллагенсодержащих тканей используют ткани здоровых цыплят в 5-8 суточном возрасте или эмбрионов свиней на сроках гестации не более 120 суток.

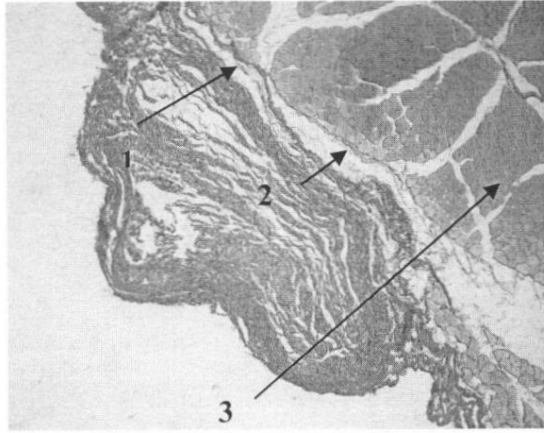


Рис. 1

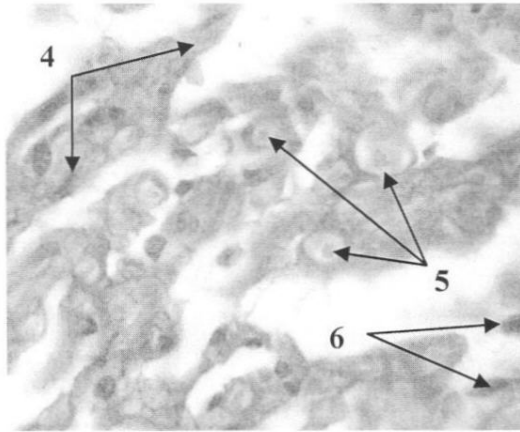


Рис. 2

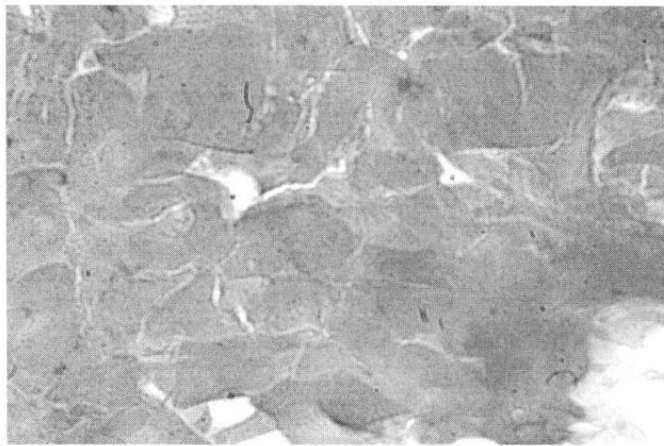


Рис. 3а

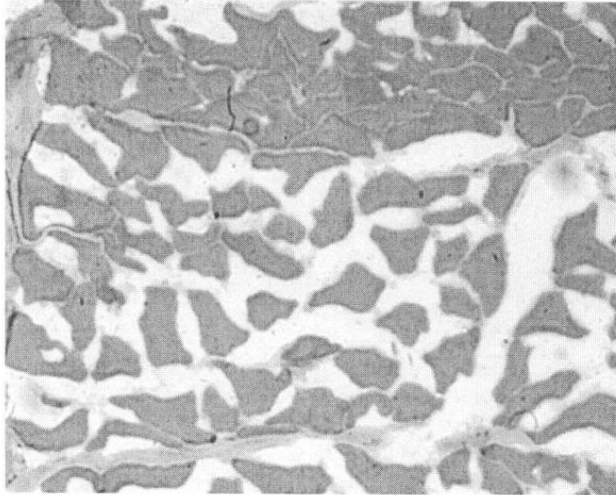


Рис. 36



Рис. 4