

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201500226** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.11.30

(22) Дата подачи заявки
2015.02.26

(51) Int. Cl. *A61K 35/54* (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
B01J 37/32 (2006.01)
B01D 21/26 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФОЛЛИКУЛЯРНОГО БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА И ПРЕПАРАТ, ПОЛУЧЕННЫЙ ДАННЫМ СПОСОБОМ

(31) **2014107790**

(32) **2014.03.03**

(33) **RU**

(96) **2015000024 (RU) 2015.02.26**

(71) Заявитель:
**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ
ОБЩЕСТВО "СКАЙ ЛТД." (RU)**

(72) Изобретатель:
**Ильичёв Александр Владимирович,
Мальдов Дмитрий Григорьевич (RU)**

(74) Представитель:
Корнилов А.В. (RU)

(57) Группа изобретений относится к области биологической химии и может найти применение для получения из органического материала белковых препаратов, которые могут быть использованы в медицине для снижения иммунитета при трансплантологии, лечения эндометриоза, некоторых онкологических заболеваний, а также в ветеринарии. Согласно способа получения фолликулярного белкового препарата отбирают фолликулярную жидкость крупного рогатого скота, охлаждают ее и после охлаждения центрифугируют, получая супернатант, смешивают его с охлажденным ацетоном, отстаивают полученную смесь, после чего ее лиофильно высушивают и очищают повторным центрифугированием, получая лиофилизированный продукт, который растворяют в буфере, полученную взвесь центрифугируют при 8000-10000 об/мин в течение 15-30 мин для получения супернатанта, который разделяют ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе, собирают элюат, выходящий при концентрации NaCl в элюирующем растворе с 0,11 по 0,19 М, который диализуют против воды не менее 8 ч, получая препарат. Фолликулярный белковый препарат получают из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота. Препарат содержит сывороточный альбумин и белок семейства TGF-β, имеющий иммуноспецифичность ингибина βA, при следующем соотношении их компонентов, в мас. %: белок семейства TGF-β, имеющий иммуноспецифичность ингибина βA - 0,00005-3,0; сывороточный альбумин - остальное.

**201500226
A1**

**201500226
A1**

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФОЛЛИКУЛЯРНОГО БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА И ПРЕПАРАТ, ПОЛУЧЕННЫЙ ДАННЫМ СПОСОБОМ

Группа изобретений относится к области биологической химии и может найти применение для получения из органического материала белковых препаратов, которые могут быть использованы в медицине для снижения иммунитета при трансплантологии, лечения эндометриоза, некоторых онкологических заболеваний, а также в ветеринарии.

В настоящее время в литературе имеются данные о возрастании количества заболеваний эндометриозом при мутациях в генах, кодирующих ингибин βA у людей [Lin J., L.Zong, S.H.Kennedy, K.T.Zondervan Coding regions of INHBA, SFRP4 and HOXA10 are not linked to chromosome 7p13-15// *Molecular Human Reproduction*. 2011, V.17, № 10, p. 605-611] и подавлении развития этого заболевания в модели эндометриоза на мышах [Bristol-Gould SK, Hutten CG, Sturgis C, Kilen SM, Mayo KE, Woodruff TK.- The development of a mouse model of ovarian endosalpingiosis.//*Endocrinology*. 2005;146(12):5228-36].

Кроме того, имеются сведения о увеличении в атипичном эндометрии количества активина А (белка семейства TGF- β) который является физиологическим антагонистом ингибина в организме женщин, больных эндометриозом [Rombauts L., J. Donoghue, L. Cann, R.L. Jones and D.L. Healy- Endometrial activin-A secretion in endometriosis Activin-A secretion is increased in the eutopic endometrium from women with endometriosis.// *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2006; 46: 148-153].

Действие обоих видов белков осуществляется посредством влияния на активность половых стероидных гормонов: так активины усиливают активность эстрогенов, а ингибины ее подавляют [Peng C, Ohno T, Khorasheh S, Leung PC.,- Activin and follistatin as local regulators in the human ovary.// *Biol Signals*. 1996 Mar-Apr;5(2):81-9; Knight PG, Glister C., - Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development.// *Anim Reprod Sci*. 2003 Oct 15;78(3-4):165-83].

Поэтому весьма важно получение препарата, в котором отсутствуют компоненты, оказывающие противоположные действия при его использовании в лечебных целях.

Известен способ получения фолликулярного регуляторного белка, включающий использование в качестве сырья выделенной из яичников свиньи фолликулярной жидкости, которую осаждают сульфатом аммония, а полученные фракции пропускают через гель Оранжевый А, уравновешенный буфером Трис-НСl рН 7,5. Связавшиеся фракции элюируют 0,5 М КСl в том же буфере. Фракции, содержащие ингибитор ароматозы, собирают (по Оно), диализируют против дистиллированной воды и лиофилизируют. Далее полученный материал очищают на анионообменной колонке с моно Q, затем элюируют фракции, имеющие ФРБ активность и очищают их гель-фильтрацией на сферогеле TSK G 300000 W6 в воде жидкостной хроматографией высокого разрешения. Полученный фолликулярный регуляторный белок концентрируют ультрафильтрацией на Amicon Dia – flow system с P10. (см. пат. США № 5102867, кл А61К35/44, 1992г).

В результате анализа известного способа необходимо отметить, что он характеризуется сложностью осуществления, высокой трудоемкостью, что осложняет освоение его промышленного производства. Кроме того, использование данного способа не позволяет выделить в составе фолликулярного регуляторного белка компоненты, которые оказывают эффективное воздействие на лечение, например, эндометриоза. Препарат, полученный данным способом, характеризуется невысокими лечебными свойствами.

Известен способ получения белков из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота, согласно которому фолликулярную жидкость подвергают осаждению и лиофилизируют осадок, причем перед осаждением фолликулярную жидкость охлаждают и подвергают центрифугированию в течении 18 – 25 минут. Осаждение примесей проводят охлажденным до -18°C ацетоном, который добавляют в фолликулярную жидкость в соотношении объемных частей компонентов: фолликулярная жидкость – 2, ацетон – 3. Отстаивают полученную взвесь и подвергают ее центрифугированию со скоростью 10000 об/мин в течении 20 – 35 минут с последующим отбором осадка и его лиофилизацией. (см. патент РФ №2185180, кл. А61К35/54, 2002 г.)

В результате анализа известного способа необходимо отметить, что препарат, полученный данным способом, содержит много примесей, среди которых провоцирующие

эндометриоз активины и, следовательно, не может эффективно применяться для лечения этого заболевания, то есть, имеет ограниченную область применения.

Известен способ очистки белков семейства трансформирующих ростовых факторов, получаемых из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота, согласно которому белок растворяют в буфере с нейтральным значением pH, фильтруют раствор через нитроцеллюлозный фильтр. Полученный супернатант подвергают ионообменной хроматографии. Далее полученный в результате ионообменной хроматографии компонент пропускают через 8-мм колонку (Cybracop фирмы ICN) с тем же буфером и отбирают активную фракцию, которую очищают гель-фильтрацией. Полученный продукт фильтруют через фильтр УИМ 200 и собирают фильтрат. Далее осуществляют двухступенчатую очистку фильтрата. На первой ступени очистку фильтрата осуществляют хроматографией высокого давления по принципу обратной фазы. На второй ступени очистки фильтрата используют препаративное изоэлектрофокусирование.

(см. патент РФ №2201241, кл. А61К35/54, 2003 г.) – наиболее близкий аналог.

В результате анализа известного способа необходимо отметить, что он характеризуется сложностью осуществления, высокой трудоемкостью, что осложняет освоение его промышленного производства. Использование данного способа не позволяет получить в составе трансформирующих ростовых факторов компоненты, которые оказывают эффективное воздействие на лечение эндометриоза.

Техническим результатом настоящей группы изобретений является разработка простого и доступного способа получения определенного состава белкового препарата, при котором достигается высокая биологическая активность препарата, его устойчивость к внешним факторам (температура, влажность и т.д.), что определяет его более длительное хранение, по сравнению с белковыми препаратами, полученными известными способами.

Указанный технический результат обеспечивается тем, что в способе получения фолликулярного белкового препарата, согласно которому отбирают фолликулярную жидкость крупного рогатого скота, охлаждают ее и после охлаждения центрифугируют, получая супернатант, смешивают его с охлажденным ацетоном, отстаивают полученную смесь, после чего ее лиофильно высушивают, и очищают повторным центрифугированием, получая лиофилизированный продукт, новым является то, что лиофилизированный продукт растворяют в буфере, полученную взвесь центрифугируют при 8000-10000 об/мин в течение 15 - 30 мин для получения супернатанта, который разделяют ионообменной хроматографией на DEAE-Сефарозе,

собирают элюат, выходящий при концентрации NaCl в элюирующем растворе с 0,11 М по 0,19 М, который диализуют против воды не менее 8 часов, получая препарат.

Фолликулярный белковый препарат, полученный из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота содержит сывороточный альбумин и белок семейства TGF- β (ТРФ- β , трансформирующий ростовой фактор), имеющий иммуноспецифичность ингибина β A, при следующем соотношении их компонентов, в мас. %:

- белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина β A, : 0,00005-3,0;
- сывороточный альбумин: остальное.

Использование в качестве сырья для получения фолликулярного белкового препарата фолликулярной жидкости, выделенной из фолликулов яичников крупного рогатого скота является весьма существенным, так как: во-первых - обеспечивает наличие доступного источника, а во-вторых, как показали исследования, использование в виде сырья фолликулярной жидкости других видов животных, не позволяет получить белковый продукт с необходимым количеством активных компонентов.. Как показали эксперименты, использование для получения фолликулярного белкового препарата, например: фолликулярной жидкости свиней (патент США №5102867) не позволяет осуществить получение продукта заданного белкового состава.

Охлаждение жидкости перед первичным центрифугированием позволяет сохранить белки в нативном состоянии и увеличить их выход.

Центрифугирование (первичное и повторное) обеспечивает очистку растворимых белков от остатков клеток.

Проведение осаждения в охлажденном ацетоне позволяет очистить препарат от небелковых компонентов.

Ионообменная хроматография на DEAE-Сефарозе приводит к получению фолликулярного белкового препарата определенного состава, состоящего из белка семейства TGF- β , имеющего иммуноспецифичность ингибина β A и бычьего сывороточного альбумина.

Термин «ингибин β A» является общеупотребимым. В литературе также встречается его тождественное обозначение - ингибин А.

Лиофилизация фолликулярного белкового препарата позволяет хранить препарат достаточно длительное время.

Необходимо отметить, и это подтверждено экспериментально, что заявленный технический результат может быть достигнут только при безусловном выполнении всех действий, отраженных в материалах заявки при строгом соблюдении заявленной их последовательности и режимов, а также количественного соотношения компонентов препарата. Таким образом, признаки, изложенные в формуле изобретения и последовательность их выполнения, являются существенными.

Способ получения фолликулярного белкового препарата осуществляют в несколько этапов.

Первоначально отбирают из яичников фолликулярную жидкость крупного рогатого скота. Отобранную жидкость центрифугируют при 8000-10000 g для получения супернатанта. Полученный в результате центрифугирования супернатант сливают в чистую емкость и охлаждают до 4 – 8 °С для увеличения количества осажденного белка. Затем к супернатанту добавляют ацетон (градации ОСЧ), охлажденный до -18 °С в соотношении от 1/1 до 2/3 по объему, перемешивают и центрифугируют 15-25 мин при 8000-10000 g (центрифуга Eppendorf 5804) для получения осадка. Супернатант отбрасывают. Осадок переносят в емкость, охлаждают до -18 °С и сушат на лиофильной сушке (VirTis benchtop SLC) до его полного высушивания. В результате получают лиофилизированный продукт в виде гранулированного порошка от белого до темно-желтого цвета, плохо растворимого в воде.

На следующем этапе лиофилизированный продукт растворяют в буфере pH 7,2 при постоянном помешивании в течение 15-30 мин. Полученную взвесь центрифугируют при 8000-10000 об/мин в течение 15 - 30 мин для получения супернатанта. Полученный супернатант сливают и наносят на колонку с DEAE-Сефарозой. Время набивания колонки 6 -8 часов. Уравновешивают колонку буфером 12-24 часа до pH 7-7,2.

Дальнейшее выделение белкового препарата можно производить двумя путями, получая один и тот же результат:

1. Наносят на колонку супернатант, полученный из 3 г лиофилизированной фолликулярной жидкости и прогоняют 180 мл буфера. С помощью

хроматографической системы (BioRad BioLogic LP с УФ–детектором с длиной волны $\lambda=280$ нм) подают 112 мл 0,11 М раствора NaCl (приблизительно 2,6 объема колонки). Затем подают 120 мл 0,11- 0,19 М раствора NaCl в буфере и одновременно начинают собирать элюат в емкость. После этого подают на колонку 40 мл 2М раствора NaCl для удаления с колонки остатков нанесенных веществ. Собранный элюат замораживают в морозилке (Sanyo MDF-436) при -18°C - 35°C , затем лиофильно высушивают.

2. Наносят на колонку супернатант, полученный из 3г лиофилизированной фолликулярной жидкости и элюируют градиентом NaCl от 0 до 1М в буфере рН 7,05-7,20 на хроматографической системе (например, BioRad). Отбирают элюат, смываемый концентрациями соли 0,11 - 0,19 М NaCl. Контроль по самописцу. Собранный элюат замораживают в морозилке (Sanyo MDF-436) при -18°C - 35°C , затем лиофильно высушивают.

В результате использования процесса 1 или процесса 2 получают один и тот же элюат, поэтому целесообразность использования одного или другого процесса определяется приборной базой и технологическими условиями.

В результате описанных манипуляций получают белковый препарат с буфером – легкий, воздушный порошок белого цвета

Для удаления из полученного препарата примесного буфера следующим этапом осуществляют диализ белкового препарата с буфером, для чего:

- растворяют его в дистиллированной воде;

- проводят диализ через мембрану (ROTH) с объемом исключения 14 кДа против 2 литров дистиллированной воды со сменой дистиллята по схеме:

-диализ 3 часа (2 литра дистиллята);

-смена дистиллята;

-диализ 3 часа (2 литра дистиллята);

-смена дистиллята;

-диализ 2 часа (2 литра дистиллята).

Процесс осуществляют при температуре 4 - 8 °С.

Получают диализат. Мембрану надрезают и сливают раствор в стеклянный стакан и лиофильно высушивают.

Количественное содержание указанных в формуле изобретения компонентов контролируют общеизвестным иммунно-ферментным анализом, а активность белкового препарата контролируют стандартным методом определения биологической активности на культуре клеток VERO.

В результате реализации данного способа получают фолликулярный белковый препарат, содержащий сывороточный альбумин и белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина β A, при следующем соотношении их компонентов, мас. %:

- белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина β A: 0,00005-3,0;
- сывороточный альбумин: остальное.

Сущность заявленного способа будет более понятна из приведенного примера. Первоначально отбирают фолликулярную жидкость крупного рогатого скота, для чего яичники быка в зоне фолликулярных пузырьков протирают 96% спиртом, затем прокалывают одноразовым стерильным шприцем и фолликулярную жидкость отбирают 10 мл в ополоснутую спиртом центрифужную пробирку, ёмкостью не менее 20 мл. Центрифугируют фолликулярную жидкость 25 мин при 8000 g (центрифуга Eppendorf 5804). Полученный супернатант сливают в чистую емкость и охлаждают до 6°С. Затем к супернатанту добавляют ацетон (градации ОСЧ), охлажденный до -18°С в соотношении 1/1 по объему, перемешивают и центрифугируют 15 мин при 8000g (центрифуга Eppendorf 5804). Супернатант отбрасывают. Осадок переносят в емкость, охлаждают до -18 °С и сушат на лиофильной сушке (VirTis benchtop SLC) до его полного высушивания.

Далее 1,3 г лиофилизированной фолликулярной жидкости растворяют в 40 мл буфера рН 7,2 в стеклянной колбе емкостью 50 мл с помощью ультразвуковой мешалки УЗМ 001 (Польша) при постоянном помешивании в течение 30 мин. Полученную взвесь центрифугируют на центрифуге Eppendorf 5804 при 8000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант (прибл.8 мл) сливают и наносят на колонку (кат. № 57407-08-6 DFF100,

Sigma, Diethylaminoethyl Sepharose с DEAE-Сефарозой. Колонка: стекло, размеры 1,5*30 см, рабочий объем колонки – 42 мл. Время набивания колонки 6 часов. Время уравнивания колонки буфером - 12 часов до pH 7,2). Затем наносят на колонку супернатант, полученный из 1,3 г лиофилизированной фолликулярной жидкости и промывают колонку 180 мл буфера. С помощью хроматографической системы (BioRad BioLogic LP с УФ-детектором с длиной волны $\lambda=280$ нм) подают 112 мл 0,11 М раствора NaCl (приблизительно 2,6 объема колонки). Затем подают 120 мл 0,19 М раствора NaCl в буфере и одновременно начинают собирать элюат в емкость (получаем 120 мл раствора). После этого подают на колонку 40 мл 2М раствора NaCl для удаления с колонки остатков нанесенных веществ. Собранный элюат замораживают в морозилке (Sanyo MDF-436) при - 35 °С, затем лиофильно высушивают (VirTis benchtop SLC).

Далее осуществляют диализ полученного лиофилизата для чего:

- растворяют 0,26 г белка в 10 мл дистиллированной воды.
- подвергают диализу через мембрану (ROTH) с объемом исключения 14 кДа против 2 литров дистиллированной воды со сменой дистиллята по схеме:
 - диализ 3 часа (2 литра дистиллята);
 - смена дистиллята;
 - диализ 3 часа (2 литра дистиллята);
 - смена дистиллята;
 - диализ 2 часа (2 литра дистиллята).

Процесс осуществляют при температуре 6 °С.

Получают диализат в количестве 12 мл. Мембрану надрезают и сливают раствор в стеклянный стакан 50 мл. Определяют концентрацию белка по методу Брэдфорда и снова лиофильно высушивают.

Количественное содержание указанных в формуле изобретения компонентов контролируют иммунно-ферментным анализом, а активность белкового препарата контролируют методом определения биологической активности на культуре клеток VERO.

В результате получают 0,26 г фолликулярного белкового препарата, содержащего:

- бычий сывороточный альбумин 0,254813 г
- белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина β A 0,000013 г

- примеси 0,005174 г, которые не оказывают существенного влияния на достижение указанного технического результата.

Необходимо отметить, что указанный технический результат обеспечивается только в пределах указанных в формуле изобретения значений компонентов фолликулярного белкового препарата.

При меньших значениях белка семейства TGF- β , имеющего иммуноспецифичность ингибина β A, препарат утрачивает свою активность, при больших значениях возрастает риск возникновения патологических эффектов. Наличие сывороточного альбумина обуславливает стабильность ингибинов в белковом препарате.

Данный препарат был проверен на крысиной модели эндометриоза. Введение внутривентриально препарата в дозе 40 мкг на животное ежедневно по одной дозе в течение 10 дней крысам с хирургически индуцированным эндометриозом привело к уменьшению объема имплантов у крыс в 7,9 раз.

Полученный данным способом и с вышеописанным составом препарат применялся при лечении эндометриоза у женщин.

Эндометриоз - распространённое гинекологическое заболевание, при котором клетки эндометрия (внутреннего слоя стенки матки) разрастаются за пределами этого слоя. Эндометриозная ткань имеет рецепторы к гормонам, поэтому в ней возникают те же изменения, что и в нормальной эндометрии, проявляющиеся ежемесячными кровотечениями. Эти небольшие кровотечения приводят к воспалению в окружающих тканях и вызывают основные проявления заболевания: боль, увеличение объема органа, бесплодие. Основные методы лечения эндометриоза в настоящее время – это гормональная терапия и хирургическое лечение.

Примеры.

Лечение проводилось препаратом (дозировкой 0,3 мг) следующего состава:

- бычий сывороточный альбумин 0,25 мг
- белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина β A 0,000013 мг

Схема терапии:

- первый месяц – 10 инъекций по 0,3 мг с пятого дня месячного цикла каждый день.

- второй месяц – 10 инъекций по 0,3 мг с пятого дня месячного цикла каждый день.
- третий месяц – 10 инъекций по 0,3 мг с пятого дня месячного цикла каждый день.

Пациентка У., 27л. Клинический диагноз: эндометриоз матки, диффузная форма, поставлен в 2008г. Жалобы на обильные, болезненные менструации.

До начала лечения клинико-биохимические показатели: анализ мочи, клинический анализ крови, биохимия, коагулограмма, онкомаркеры - в пределах нормы. Гормоны крови: эстрадиол 0,618 нмоль/л., прогестерон 7,6 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: эндометриоз матки. Морфологическое заключение: активный аденомиоз.

На фоне лечения положительная динамика: болей нет, менструации умеренные. Клинико-биохимические показатели в пределах нормы. В гормональном анализе крови отмечено увеличение уровня эстрадиола до 0,72 нмоль/л, снижение уровня прогестерона до 3,97 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: положительная динамика. Морфологическое заключение: эндометриоз не обнаружен (положительная динамика).

Пациентка С., 39 л. Клинический диагноз: эндометриоз матки, очаговая форма, поставлен в 2002 г. Жалобы на обильные, болезненные менструации.

До начала лечения клинико-биохимические показатели: анализ мочи, биохимия, коагулограмма, онкомаркеры - в пределах нормы. Клинический анализ крови: Нв- 110 г/л. Онкомаркеры СА 125 - 47,6 (норма - менее 35 Ед/мл). Гормоны крови: эстрадиол 0,56 нмоль/л., прогестерон 1,8 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: эндометриоз матки. Морфологическое заключение: аденомиоз умеренной активности.

На фоне лечения отмечена положительная динамика: уменьшился болевой и синдром гиперполименореи. Клинико-морфологические показатели в пределах нормы. Клинический анализ крови: Нв- 102г/л. В гормональном анализе крови отмечено увеличение уровня эстрадиола до 0,8 нмоль/л, снижение уровня прогестерона до 0,2 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: положительная динамика. Морфологические исследования: аденомиоз слабой активности (положительная динамика).

Пациентка К., 33 г. Клинический диагноз: Эндометриоз матки, диффузная форма, поставлен в 2000 г. Жалобы на обильные менструации. Менструальный цикл нерегулярный.

До начала лечения клинико-биохимические показатели: анализ мочи, клинический анализ крови, биохимия, коагулограмма, онкомаркеры - в пределах нормы. Гормоны крови: эстрадиол -0,538нмоль/л, прогестерон - 3,7 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: эндометриоз матки. Морфологическое заключение: аденомиоз слабой активности.

На фоне лечения отмечена положительная динамика: уменьшился синдром гиперполименореи. Клинико-биохимические показатели в пределах нормы. В гормональном анализе крови отмечено снижение эстрадиола до 0,218 нмоль/л, повышение прогестерона до 36,7 нмоль/л. УЗИ органов м/таза - положительная динамика. Морфологическое исследование: аденомиоз не выявлен (положительная динамика).

Побочных эффектов в процессе лечения у пациенток не наблюдалось.

Применение препарата пациентками, страдающими эндометриозом привело:

к исчезновению гиперполименореи - в 8% случаев, и её снижению - в 92% случаев;

к исчезновению альгодисменореи – в 36% случаев и её снижению - в 64% случаев;

При оценке степени тяжести заболевания – к исчезновению симптомов в 32% случаев и снижению тяжести заболевания - в 68% случаев.

Исходя из заключений комплексного морфологического (гистологического и иммуноморфологического) исследования положительный эффект терапии выявлен в 80% случаев, а в остальных случаях выявлена тенденция к снижению активности очагов аденомиоза.

Препарат также может быть использован для лечения некоторых онкологических заболеваний и в ветеринарии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения фолликулярного белкового препарата, согласно которому отбирают фолликулярную жидкость крупного рогатого скота, охлаждают ее и после охлаждения центрифугируют, получая супернатант, смешивают его с охлажденным ацетоном, отстаивают полученную смесь, после чего ее лиофильно высушивают, и очищают повторным центрифугированием, получая лиофилизированный продукт, **отличающийся** тем, что лиофилизированный продукт растворяют в буфере, полученную взвесь центрифугируют при 8000-10000 об/мин в течение 15 - 30 мин для получения супернатанта, который разделяют ионообменной хроматографией на DEAE-Сефарозе, собирают элюат, выходящий при концентрации NaCl в элюирующем растворе с 0,11 М по 0,19 М, который диализуют против воды не менее 8 часов, получая препарат.

2. Фолликулярный белковый препарат, полученный из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота, содержащий сывороточный альбумин, и белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина βA , при следующем соотношении их компонентов, в мас. %:

- белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина βA : 0,00005-3,0;
- сывороточный альбумин: остальное.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201500226

| | | |
|--|---|--|
| Дата подачи: 26 февраля 2015 (26.02.2015) | Дата испрашиваемого приоритета: 03 марта 2014 (03.03.2014) | |
| Название изобретения: Способ получения фолликулярного белкового препарата и препарат, полученный данным способом | | |
| Заявитель: ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "СКАЙ ЛТД" | | |
| <input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) <input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа) | | |
| А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: <i>см. дополн. лист</i> | | |
| Согласно международной патентной классификации (МПК) | | |
| Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА: | | |
| Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) A61K 35/54, B01J 37/32, B01D 15/36, A61K 38/17, 38/38 | | |
| Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска: | | |
| В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ | | |
| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей | Относится к пункту № |
| D,Y | RU 2185180 C2 (ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "СКАЙ ЛЕД") 20.07.2002, с. 4, левая кол., строка 21 - правая кол., строка 12, п. 1 формулы | 1, 2 |
| Y | SUGINO K. et al. Purification and characterization of high molecular weight forms of inhibin from bovine follicular fluid. Endocrinology, 1992 Feb; 130 (2): pp. 789-796, (реферат) [он-лайн] [найдено 03.08.2015] Найдено из PubMed, PMID: 1733725 | 1, 2 |
| Y | RU 2434018 C2 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "АСТРАХАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ") 20.11.2011, реферат | 1 |
| Y | Практическая химия белка. Под ред. А. Дарбре, М., Мир, 1989, с. 75-76 | 1 |
| Y | US 5051406 A (NIPPON HYPOX LABORATORIES INCORPORATED) 24.09.1991, реферат | 2 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | последующие документы указаны в продолжении графы В | <input type="checkbox"/> |
| * Особые категории ссылочных документов: | | |
| "А" | документ, определяющий общий уровень техники | "Т" |
| "Е" | более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее | более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения |
| "О" | документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. | "Х" |
| "Р" | документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета | документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности |
| "D" | документ, приведенный в евразийской заявке | "У" |
| | | документ, имеющий наиболее близкое отношение поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории |
| | | "&" |
| | | документ, являющийся патентом-аналогом |
| | | "L" |
| | | документ, приведенный в других целях |
| Дата действительного завершения патентного поиска: | | 04 августа 2015 (04.08.2015) |
| Наименование и адрес Международного поискового органа: Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., 30-1. Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА | | Уполномоченное лицо :  Т.Ф. Владимирова Телефон № (495) 531-64-81 |

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

Номер евразийской заявки:
201500226

| ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В) | | |
|---|---|----------------------|
| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей | Относится к пункту № |
| D,A | RU 2201241 C2 (ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "СКАЙ ЛТД") 27.03.2003, реферат | 1, 2 |

ОТЧЕТ О ПОИСКЕ

Номер евразийской заявки:
201500226

A61K 35/54 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
B01J 37/32 (2006.01)
B01D 21/26 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)