

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 246**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/30** (2015.01)

**A61K 35/54** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2011 PCT/RU2011/000326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12002837**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2011 E 11801207 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2589389**

54 Título: **Procedimiento de producción de un complejo biológicamente activo. Complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo**

30 Prioridad:

**01.07.2010 RU 2010126871**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.06.2018**

73 Titular/es:

**AKTSIONERNOE OBSHCHESTVO "PHARM-SINTEZ" (100.0%)**

**Stroenie 46, d.2, Kabelnaya 2-aya ulitsa  
Moskow, 111024, RU**

72 Inventor/es:

**NAZARENKO, ANNA BORISOVNA y  
SOKOLOV, MIKHAIL ANATOLEVICH**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 671 246 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de un complejo biológicamente activo. Complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo

**Técnica pertinente**

- 5 La invención como se define en las presentes reivindicaciones se refiere al procedimiento de producción del complejo biológicamente activo y complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo. El complejo es una sustancia biológicamente activa obtenida a partir del tejido embrionario del cerebro de ganado doméstico ungulado. Está destinado para su uso en la producción farmacéutica de fármacos que estimulan la regeneración fisiológica y reparadora del tejido nervioso; y para su uso en la producción de fármacos para tratar las enfermedades del sistema nervioso central y periférico. La invención se refiere también a su procedimiento de producción.

**Técnica anterior**

- 15 En la actualidad, en el trasfondo del crecimiento implacable de la incidencia de enfermedades del sistema nervioso de origen vascular, tóxico, infeccioso y autoinmune, no se dispone de fármacos del grupo de reparadores directos específicos del sistema nervioso. El objeto de la presente invención es crear una sustancia biológicamente activa con efecto reparador-regenerador específico del tejido sobre el tejido nervioso mediante la extracción de un complejo proteico-polipeptídico del tejido embrionario del cerebro de ganado.

- 20 La sustancia es un complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo en el que la masa molecular del complejo compuesto por componentes de proteínas –polipéptidos está dentro del intervalo de 5 a 200 kDa; la porción de fracciones de peso molecular medio del intervalo mínimo de 10 a 120 kDa es del 80%; y la concentración de proteína total es de 0,8 a 4,2 mg/ml. La sustancia se obtiene mediante cromatografía de intercambio iónico del filtrado de homogenato de tejidos, en presencia de la solución tampón, detergentes, inhibidores de la proteólisis y solubilizantes, del tejido cerebral de embriones de ganado doméstico ungulado del primer tercio al último medio tercio de gestación.

- 25 La actividad biológica y farmacológica del complejo proteico-polipeptídico reivindicado se debe a las relaciones de concentración eficientes de las proteínas y polipéptidos neutros débilmente ácidos y solubles en agua, relacionados con el factor de crecimiento, el factor de diferenciación y las moléculas de señalización, asegurando así el efecto reparador-regenerador específico del tejido.

Se conoce una cantidad de los fármacos proteicos-peptídicos de actividad animal nootrópica y neurometabólica de materia prima animal utilizados para tratar las enfermedades del sistema nervioso. Éstas incluyen:

- 30 1. Cerebrolysin: fármaco para tratar los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos o isquémicos, por Ebewe (Austria) (Encyclopedia of Drugs, 2006, página 970) [1], un producto del tratamiento de cerebro porcino intacto;
2. Cerebrocurin: fármaco para tratar las enfermedades asociadas con las disfunciones del sistema nervioso central, por OOO "NIR" (Ucrania) (Patente RF No 2128511(1999) [2], un producto del tratamiento del cerebro embrionario animal;
- 35 3. Cortexin: fármaco de naturaleza polipeptídica obtenido por extracción de la corteza cerebral bovina y porcina, por OOO "Geropharm" (Rusia) (Patente RF No 2104702 (1999) [3], tiene efectos nootrópicos, cerebroprotectores, anticonvulsivos y antioxidantes;
- 40 4. Cerebrolystate: fármaco que mejora la resistencia del tejido cerebral a la intoxicación, hipoxia, hipoglucemia y lesión mecánica, por la asociación científica-producción "Microgen", una empresa unitaria estatal federal Immunopreparat) (Patente RF No 2049472 (1999) [4]; el mismo tiene efecto nootrópico y es un hidrolisato de la corteza cerebral bovino.

- 45 Cerebrolysin contiene los aminoácidos (~85%), péptidos de bajo peso molecular (-15%) y microelementos, cuya materia prima es el cerebro porcino. Los efectos neuroprotectores y tróficos del fármaco se deben a los péptidos y aminoácidos específicos, de Masa molecular máx. de 10.000 Dalton, donde la alanina, leucina y lisina dominan y determinan las propiedades del fármaco. El fármaco está destinado a la administración intramuscular e intravenosa, la concentración de componentes biológicamente activos es baja; por lo tanto, el tratamiento es de dosis alta y a largo plazo. Los inconvenientes del fármaco conocido son el tratamiento a largo plazo, baja actividad y especificidad debido al débil efecto neuroprotector; y potenciales de regeneración y reparación extremadamente bajos para el tejido nervioso.

- 50 Cerebrocurin contiene los neuropéptidos prenatales solubles en agua y los productos de la escisión de los precursores inactivos de alto peso molecular del homogenato de cerebro de embriones animales, este homogenato, después de la dilución en solución fisiológica, se expone a la enzima proteolítica inmovilizada; las condiciones de interacción se definen sobre la base de la muestra de verificación de preparación diana; y la solución resultante se somete a una cura de 30 días a 10°C máx.. Esta técnica ofrece una actividad más alta (en comparación con

5 Cerebrolysin) del fármaco resultante y amplía significativamente su espectro de acción, debido a la mayor masa de péptidos y proteínas de bajo peso molecular que quedan después de la proteólisis. Sin embargo, a pesar de la formación de soluciones a largo plazo antes de que finalicen los procesos de agregación y proteólisis, esta técnica no produce la pureza requerida para uso intravenoso; por lo tanto, la menor biodisponibilidad. La extracción acuosa sin la solución, detergentes, inhibidores de la proteólisis y solubilizantes que se almacenan en las fases de producción de Cerebrocurin, y los términos indeterminados de la gestación del cerebro animal no permiten la normalización necesaria; por lo tanto, las discrepancias significativas a partir de las proporciones de concentraciones proteicas-peptídicas fijadas evolutivamente, y la menor actividad neuroregeneradora específica del tejido y la estabilidad del efecto farmacológico, quedando todas limitadas al efecto biológico del tipo de retroalimentación debido a la función de señal de los productos de proteólisis tisular.

10 Cortexin contiene el complejo de los polipéptidos alcalinos, ácidos y neutros biológicamente activos solubles en agua, masa molecular de 500 a 15000 Da, y punto isoeléctrico de 3,5 a 9,5. Estos se obtienen a partir del tejido congelado licuado de cerebro de ganado; el proceso consiste en extraer con solución de ácido acético que contiene cloruro de cinc, separar el sedimento, tratar el líquido sobrenadante con acetona, secar con posterior purificación, esterilización y liofilización del producto diana.

15 El fármaco está destinado a la administración intramuscular e intravenosa, la concentración de componentes biológicamente activos de bajo peso molecular es baja; por lo tanto, el tratamiento es a dosis alta y a largo plazo. Aunque Cortexin participa en la regulación de las relaciones inhibitoria y excitante de aminoácidos, y la concentración de serotonina y dopamina, tiene un efecto GABA positivo, reduce los efectos tóxicos de los fármacos neurotrópicos, mejora los procesos de aprendizaje y memoria, acelera las funciones cerebrales de rehabilitación después de tensiones, su actividad y especificidad no son altas debido al débil efecto neuroprotector, su potencial regenerativo es bajo y el potencial de reparación es insignificante para el tejido nervioso; por lo tanto, el tratamiento prolongado a largo plazo.

20 Cerebrolysate también contiene los polipéptidos solubles en agua obtenidos en la hidrólisis de la corteza del cerebro bovino; su actividad enzimática es débil; su masa molecular es 15000 Da máx. Lo mencionado en la variación de patente de la composición de aminoácidos del fármaco admite una variación de composición significativa de las proporciones de concentración de péptidos resultantes, determinando la baja actividad específica de tejido y la estabilidad del efecto farmacológico con los débiles efectos nootrópicos neurometabólicos y no expresados.

### Divulgación de la invención

30 El objeto de esta solicitud es crear la sustancia biológicamente activa con propiedades extendidas y alta actividad biológica, con efecto reparador-regenerador específico del tejido sobre el tejido nervioso, y desarrollar su procedimiento de producción separando un complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo del tejido embrionario del cerebro de ganado doméstico unguado; la solución del problema consiste en la combinación seleccionada de acciones y condiciones. Lo más importante fue definir las edades gestacionales cerebrales embrionarias óptimas, y seleccionar los reactivos, sus dosis, extracción, tampón y condiciones de regulación de actividad proteolítica, para preservar las relaciones de concentración eficientes de las proteínas y polipéptidos, fijadas evolutivamente y determinar la actividad de la sustancia biológica, asegurando el efecto reparador-regenerador específico del tejido.

40 La solución del problema consiste en cumplir con todos los parámetros y características de aprovisionamiento de materia prima y con el procedimiento reivindicado para producir una formulación de complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo que comprende acciones que implican el rápido congelamiento del cerebro embrionario de ganado doméstico unguado de edad gestacional a partir de la mitad del primer trimestre a la mitad del último trimestre de gestación y el descongelamiento gradual, etapa por etapa, a temperaturas de 2°C a 28°C;

45 - homogeneización en solución tampón con extracción simultánea en presencia de inhibidores de la proteólisis y detergentes no iónicos, incluido tetraacetato de etilendiamina, manitol o maltosa, con un pH no inferior a 5,2 ni superior a 8,5, con una relación volumétrica de solución/tejido de al menos 1: 0,5;

- el homogenato se separa del tejido no diluido y los componentes celulares por filtración y centrifugación posterior, a "g" entre 10000 y 30000, en 90-30 minutos, respectivamente;

- el sobrenadante se filtra a través de un filtro de membrana con un tamaño de poros máximo de 0,45 µm;

50 -el filtrado se somete a cromatografía de intercambio aniónico a 2-4°C, con la solución tampón como fase móvil, separando proteínas y polipéptidos en contacto con el adsorbente, con un incremento etapa por etapa, utilizando eluyente con una fuerza iónica que oscila entre 0,08 y 0,26 mol/l y pH - entre 5,2 y 8,5, aumentando la fuerza iónica de la fase móvil en incrementos de 0,02 mol/l, comenzando a recolectar fracciones diana usando la solución con fuerza iónica de al menos 0,1; y

55 - las fracciones diana recolectadas se desalan utilizando el procedimiento de diálisis o filtración en gel y, después de la adición de sustancias conservantes caracterizadas por actividad bacteriostática y fungicida con la concentración total máxima de 0,06 mg/ml y solubilizante con la concentración total máxima de 0,01 mg/ml, se efectúa una

ultrafiltración con un tamaño de poro máximo de 0,22 µm, luego se realiza un envasado estéril.

Otra invención en el grupo reivindicado es el complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo que tiene un efecto de restauración específico de tejido en tejidos neuronales obtenidos a partir de cerebro congelado rápidamente obtenible mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 1, que incluye proteínas y polipéptidos neutros ligeramente ácidos con carga negativa, relacionados con los factores de crecimiento, diferenciación, moléculas de señalización que determinan su actividad biológica y farmacéutica, con una masa molecular de 5 a 200 kDa, con al menos un 80% de la masa proteica total que tiene una masa molecular que varía de 10 a 120 kDa, se caracteriza con un valor máximo en la longitud de onda de 274-284 nm en el espectro UV-visible y presencia de bandas en el intervalo de pI de 4,2 a 8,4 en enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida al 5%.

5 Cuando se separa el producto diana, en las etapas de homogenización y cromatografía de intercambio aniónico, el pH del medio tampón debe ser de 5,2 a 8,5; la solución tampón debe, en las etapas de homogeneización y extracción, tener concentraciones suficientes de detergentes e inhibidores de la proteólisis; la etapa de cromatografía de intercambio aniónico debe usar, como fase móvil, las soluciones de la fuerza iónica de 0,02 a 0,26 mol/l de 0,02 mol/l, el pH debe ser de 5,2 a 8,5, y la recolección de fracciones diana debe comenzar con eluyente de fuerza iónica mín. 0,1; las fracciones diana resultantes deben contener las proteínas de masa molecular de 5 kDa a 200 kDa y el complejo debe contener mín. 80% de proteína total de proteínas y polipéptidos de masa molecular de 10 kDa a 120 kDa; el complejo resultante debe caracterizarse por un pico en la longitud de onda de 274-284 nm en el espectro UV-visible y bandas en el intervalo de pI 4,2 a 8,4 en enfoque isoeléctrico en un gel de poliacrilamida al 5% y las proteínas proteolíticas que lo componen deben tener actividad proteolítica; y la materia prima debe ser cerebro embrionario congelado rápidamente de ganado de mediados del primer tercio hasta mediados del último tercio de edad gestacional. Con otros parámetros, la composición del complejo proteico-polipeptídico y las relaciones de concentración de los componentes biológicamente activos formadores serán diferentes.

15 La sustancia biológicamente activa extraída, que es un complejo proteico-polipeptídico, difiere de los obtenidos anteriormente extraídos del cerebro animal, a partir de la fuente de materia prima a las edades gestacionales fijas, a partir de las masas moleculares y la composición cualitativa de las fracciones de proteína-polipéptido, a partir de las proteínas de crecimiento de ontogénesis y fijadas evolutivamente, los factores de diferenciación y las relaciones de concentración de moléculas de señalización, y a partir de la actividad biológica y farmacológica y esta especificidad de actividad. El complejo proteico-polipeptídico extraído por cromatografía de intercambio aniónico que permite obtener las fracciones diana del nivel de carga dependiente de la fuerza iónica del eluyente consiste en los componentes de proteínas y polipéptidos débilmente ácidos y neutros debido a las condiciones combinadas empíricamente descritas anteriormente. Una peculiaridad del complejo obtenido es la existencia de moléculas suficientemente grandes (hasta 200 kDa) sin alergenicidad y sin moléculas de proteínas de inmunotoxicidad; esto se debe, en primer lugar, a las características organoespecíficas de la materia prima (cerebro embrionario rápidamente congelado a ciertas edades de gestación).

25 Las características de materia prima del complejo proteico-polipeptídico condicionan tanto la disponibilidad de los componentes requeridos para todo el intervalo de actividades biológicas, es decir, factores de crecimiento, factores de diferenciación de tejidos y células, y moléculas de señalización, y sus relaciones de concentración, también. Además, a pesar de que en diferentes etapas gestacionales, la composición cualitativa de la composición proteica-polipeptídica del cerebro embrionario (material prima) cambia, con el procedimiento reivindicado, los componentes diana restantes dentro de los intervalos de las relaciones de concentración fijadas evolutivamente, aseguran la actividad biológica requerida de la sustancia. La materia prima del complejo proteico-polipeptídico reivindicado y las variaciones de las características de los parámetros de producción deterioran su actividad biológica y pueden conducir a reacciones adversas, tales como carcinogenicidad, alergenicidad, inmunotoxicidad, etc. La liofilización de la sustancia biológicamente activa reivindicada también deteriora en forma significativa (hasta 70%) su actividad biológica específica del tejido y del órgano.

### Mejor realización de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

#### Ejemplo 1. Procedimiento de producción del complejo biológicamente activo.

50 Producción de fracción proteica a partir de cerebro embrionario ovino. 200 gramos de cerebro embrionario ovino congelado rápidamente, de 16 a 18 semanas de edad gestacional, se descongelan y se homogeneizan 5 minutos en 1000 ml de tampón TRIS-glicina-fosfato 0,05 M, pH 8,0, que contiene 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 0,1% de manitol, a 4°C. El homogenato se filtra a través de un paño cerrado para separar las sustancias de lastre, luego se centrifuga 60 minutos a 20.000 g, luego se filtra a través de un filtro de membrana de malla 0,45 µm a 4°C. El filtrado se aplica entonces a una columna cromatográfica de volumen de 200 ml con el medio de intercambio de aniones Toyopearl DEAE-650M; la columna se equilibra con 4 volúmenes del tampón de glicinfosfato, pH 8,0, que contiene 0,1 mM de EDTA. Las proteínas unidas al vehículo se separan por el gradiente por etapas del tampón de glicina-fosfato 0,05 M, pH 8,0, que contiene 0,04 M de KCl, aumentando por etapas 0,02 M la concentración de sal; la recolección de fracciones diana comienza en la concentración de sal 0,06 M. Temperatura de cromatografía: 2 a 4°C. La fracción diana se somete a filtrado etapa por etapa a contrapresión máx. de 8,0

kfg/cm<sup>2</sup>, a través de materiales de potencial de retención de 5 kDa y 200 kDa; luego se desaliniza y se diluye con la solución de glicina-NaOH 0,05 M, pH 7,4, hasta la concentración de proteína de 1,2 mg/ml, añadiendo el monooleato de polioxietilensorbitan (Tween 20) hasta la concentración total de 0,01 mg/ml. La solución se somete al filtrado de esterilización, a través de un filtro de membrana de malla máx. de 0,22 µm. Para caracterizar la fracción de proteína-polipéptido resultante se usaron la espectrofotometría ultravioleta, la cromatografía en gel, la electroforesis en gel de poli(acrilamida) y el análisis de aminoácidos. El espectro ultravioleta de la solución se lee en el intervalo de longitud de onda de 250 a 350 nm, la absorción máxima se observa a 2805 nm. Para determinar la masa molecular de las proteínas y polipéptidos formadores del complejo se usan los siguientes procedimientos: cromatografía en gel con Superdex 75 (GE Healthcare) y electroforesis SDS-Page desnaturalizante en gel de poli(acrilamida) al 12 por ciento en comparación con un conjunto estándar de proteínas marcadoras. La columna se calibra con los estándares de proteínas, intervalo de masas moleculares: 13 kDa a 250 kDa. Los procedimientos anteriores han encontrado que el fármaco contiene proteínas y polipéptidos de 5 kDa a 200 kDa, de los cuales el 82% tiene la masa molecular dentro del intervalo de 10 a 120 kDa. Análisis de aminoácidos (%): Asp: 10,82 + 2,5; Thr: 5,4 + 1,2; Ser: 5,2 + 1,3; Glu: 16,2 + 3,1; Pro: 7,045 + 2,4; Gly: 5,2 + 2,2; Ala: 5,4 + 1,2; Val: 7,08 + 2,7; Met: 2,65 + 1,3; He: 4,45 + 1,5; Leu: 9,4 + 2,2; Tyr: 4,02 + 1,1; Phe: 4,8 + 1,3; Orn: 0,48 + 0,1; Lys: 8,48 + 2,1; His: 2,8 + 0,8; Arg: 6,52 + 2,1.

### Ejemplo 2. Procedimiento de producción del complejo biológicamente activo.

Producción de fracción de proteína del cerebro embrionario porcino. 200 gramos de cerebro embrionario porcino congelado rápidamente, de 3 a 4 semanas de edad gestacional, se descongelan y se homogeneizan 5 minutos en 800 ml de tampón TRIS-glicina-fosfato 50 mM, pH 5,8, que contiene 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 0,1% de maltosa, a 4°C. El homogenato se filtra a través de un paño cerrado para separar las sustancias de lastre, luego se centrifuga 30 minutos a 30.000 g, y luego se filtra a través de un filtro de membrana de malla de 0,5 µm a 25°C. El filtrado se aplica después a una columna cromatográfica de volumen de 250 ml con el medio de intercambio aniónico DEAE-Sepharose; la columna se equilibra con 4 volúmenes de la solución tampón de maleato, pH 5,8, que contiene 0,1 mM de EDTA. Las proteínas unidas al vehículo se separan por el gradiente por etapas de la solución tampón de maleato, pH 8,0, que contiene 0,04 M de NaCl, aumentando por etapas 0,02 M la concentración de sal; la recolección de fracciones diana comienza en la concentración de sal 0,06 M. Temperatura de cromatografía: 2 a 4°C. La fracción diana se ultra filtra etapa por etapa a máx. 8.0 kfg/cm<sup>2</sup> de contrapresión, a través de potencial de retención de 5 kDa y 250 kDa; luego se desaliniza y se diluye con la solución de aspartato-NaOH 50 M, pH 7,4, hasta la concentración de proteína de 1,2 mg/ml, agregando el monooleato de polioxietilensorbitan (Tween 20) a la concentración total de 0,005 mg/ml. La solución se esteriliza por filtración, a través de un filtro de membrana de malla máx. de 0,22 µm. Para caracterizar la fracción de proteína-polipéptido resultante se usaron la espectrofotometría ultravioleta, cromatografía en gel, electroforesis en gel de poli(acrilamida) y análisis de aminoácidos. El espectro ultravioleta de la solución se lee en el intervalo de longitud de onda de 250 a 350 nm, la absorción máxima se observa a 280 ± 5 nm. Para determinar la masa molecular de las proteínas y polipéptidos formadores de complejos se usan los siguientes procedimientos: cromatografía en gel con Superdex 75 (GE Healthcare) y electroforesis de SDS-Page desnaturalizante en gel de poli(acrilamida) al 12 por ciento en comparación con un conjunto estándar de proteínas marcadoras. La columna se calibra con los estándares de proteínas, intervalo de masas moleculares: 13 kDa a 250 kDa. Los procedimientos anteriores han encontrado que el fármaco contiene proteínas y polipéptidos de 5 kDa a 200 kDa, de los cuales el 82% tiene la masa molecular dentro del intervalo de 10 a 120 kDa. Análisis resultante de aminoácidos complejos (%): Asp: 10,82 + 1,3; Thr: 5,4 + 0,9; Ser: 5,2 + 1,1; Glu: 16,2 + 1,9; Pro: 7,045 + 1,7; Gly: 5,2 + 0,8; Ala: 5,4 + 1,1; Val: 7,08 + 2,3; Met: 2,65 + 0,6; He: 4,45 + 0,8; Leu: 9,4 + 2,5; Tyr: 4,02 + 0,6; Phe: 4,8 + 1,1; Orn: 0,48 + 0,1; Lys: 8,48 + 2,3; His: 2,8 + 0,7; Arg: 6,52 + 2,1.

### Ejemplo 3. Efecto del complejo biológicamente activo (fármaco) en el desarrollo de explantes cerebrales

Los experimentos usaron 52 fragmentos de la corteza cerebral y 40 fragmentos de los ganglios cerebroespinales de los embriones de gallináceas de 10 a 12 días. El medio nutriente para cultivar los explantes contenidos: solución de Eagle: 35%, suero fetal bovino: 25%, solución de Hanks: 35% y extracto embrionario de gallináceas: 5%; se añadieron glucosa (0,6%), insulina (0,5 U/ml), penicilina (100 U/ml) y glutamina (2 mM). La corteza cerebral y los fragmentos de ganglios cerebroespinales se colocaron en este medio y se cultivaron 2 días sobre sustrato colagénico, en placas de Petri, en un termostato, a 36,7°C. El complejo proteico-polipeptídico en estudio y la Cerebrolysin y Cortexin 0,5, 1, 2, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 y 1000 ng/ml como control positivo se añadieron al medio experimental. El índice de área, es decir, la relación del explante total con el área de la zona de crecimiento y el área de salida del fragmento de cerebro sirvió como criterio de actividad biológica. La fiabilidad de la diferencia de los índices de área media comparados se evaluó mediante el criterio t de Student. El índice de área se expresó en porcentajes; el índice del área de control se asumió al 100%. La zona de crecimiento de los explantes cerebrales de control estaba formada por las neuritas cortas, células progenitoras gliales y células similares a los fibroblastos. Las siguientes series experimentales se establecieron cuando se estudió el efecto directo del fármaco en los fragmentos cerebrales. Se agregaron Cerebrolysin y Cortexin en varias concentraciones a la corteza cerebral de los embriones gallináceos y medio nutriente de explantes de ganglios cerebroespinales. El tercer día de cultivo con la adición de 100 ng / ml de Cerebrolysin, se observó un aumento del índice de área confiable de los explantes cerebrales en 24 ± 3,5%, en comparación con los índices del área de control. No se observaron índices de área confiables de explantes de corteza cerebral en otras concentraciones de Cerebrolysin. El tercer día de cultivo con la adición de 50 ng / ml de Cortexin, se observó un aumento del índice de área confiable de los explantes cerebrales en 32 ± 4%, en

comparación con los índices del área de control. Se observó un aumento confiable del índice de área de los explantes de la corteza cerebral en: Cortexin 100 ng / ml: en  $28 + 3,5\%$ , y Cortexin 200 ng / ml: en  $23 + 2\%$ . No se observaron índices de área de explantes confiables en la corteza cerebral en otras concentraciones de Cortexin. Se observó una activación del desarrollo de los explantes de la corteza cerebral distinta bajo el complejo de 20 ng / ml en estudio: el índice de área experimental de explantes fue un  $48 \pm 4,5\%$  mayor que los explantes de control y los explantes de comparación con Cortexin y Cerebrolysin. No se observó un aumento confiable del índice del área de explantes al agregar Cerebrolysin en el medio de cultivo de explantes de ganglios cerebroespinales; con la Cortexin, se observó el aumento del índice del área de explantes en un  $22 \pm 3\%$ . Con la adición del complejo en estudio en el medio de cultivo de explantes de ganglios cerebroespinales, se observó un aumento del índice de área de explantes de  $36 \pm 3,5\%$ . Al estudiar el cultivo de explantes de ganglios cerebroespinales y de la corteza cerebral de 7 días, más largo, se observaron los mismos efectos estimulantes de neuritas con el mismo complejo en las concentraciones de estudio. Por lo tanto, a partir de los tejidos cerebrales, se observó el umbral de las concentraciones del complejo proteico-polipeptídico en estudio de menor eficiencia en comparación con Cerebrolysin y Cortexin. Por lo tanto, se observó un aumento de la zona de crecimiento de los fragmentos de explantes de la corteza cerebral solo para la Cerebrolysin 100 ng / ml y la Cortexin 50 y 100 ng / ml; para el complejo proteico-polipeptídico en estudio, las concentraciones respectivas fueron 20, 10, 50 y 100 ng / ml. Dicho esto, la intensidad del efecto estimulante del complejo proteico-polipeptídico fue confiablemente mayor que para la Cortexin y la Cerebrolysin. No se observó un efecto confiable de Cerebrolysin en el aumento de la zona de crecimiento de explantes ganglionares cerebroespinales; Cortexin aumentó confiablemente el índice del área en un 24%, mientras que el complejo proteico-polipeptídico en estudio provocó el aumento del índice de área en un 36%. Esto muestra el efecto estimulante bien expresado y dirigido del fármaco en las neuronas de las diferentes divisiones cerebrales.

#### **Ejemplo 4. Estudio de toxicidad de complejo biológicamente activo.**

Los efectos tóxicos sistémicos del complejo proteico-polipeptídico se estudiaron en las condiciones de toxicidad aguda, administración única y toxicidad crónica, administración a largo plazo [5]. El estudio de toxicidad aguda utilizó 72 ratones blancos machos exogámicos, 20 a 22 gramos de masa corporal. Los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos iguales. Los animales recibieron inyecciones intramusculares de una vez de 5 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg y 500 mg/kg de complejo en 0,5 ml de solución estéril de glicina-NaOH 0,05 M pH 7,5. Los animales del grupo control recibieron las mismas dosis de la solución estéril 0,05 M de glicina-NaOH pH 7,5. El estudio de toxicidad subaguda utilizó 95 ratas blancas machos exogámicas, de 150 a 180 gramos de masa corporal. Los animales recibieron el complejo proteico-polipeptídico una vez al día por vía intramuscular, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg en 0,5 ml de solución estéril de glicina-NaOH 0,05 M pH 7,5. Los animales del grupo control recibieron las mismas dosis de la solución estéril 0,05 M de glicina-NaOH pH 7,5. La composición y propiedades morfológicas de la sangre periférica se estudiaron antes de la introducción del complejo y en los días 30, 60 y 90. Tras la finalización del experimento, se midieron la bioquímica sanguínea y la coagulación.

El estudio de toxicidad crónica utilizó 112 conejillos de Indias machos, de 250 a 680 gramos de masa corporal, durante 6 meses. Los animales del grupo experimental recibieron el complejo proteico-polipeptídico una vez al día por vía intramuscular, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg en 0,5 ml de solución estéril de glicina-NaOH 0,05 M pH 7,5, durante 6 meses. Los animales del grupo control recibieron las mismas dosis de la solución estéril 0,05 M de glicina-NaOH pH 7,5. Se determinaron los números de eritrocitos, hemoglobina, reticulocitos, trombocitos y leucocitos, la fórmula leucocitaria, la velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR) y la resistencia de los eritrocitos en la sangre periférica de los animales utilizando procedimientos convencionales. Además, se determinó la proteína total en suero sanguíneo (procedimiento de Lowry) y potasio y sodio (espectrofotometría de plasma). Al finalizar el experimento, se realizaron los exámenes patomorfológicos del cerebro y médula espinal, ganglios espinales, glándulas tiroideas y paratiroides, glándulas suprarrenales, glándulas seminales, hipófisis, corazón, pulmones, aorta, hígado, riñones, vejiga urinaria, glándula pancreática, estómago, intestino delgado, intestino grueso, timo, bazo, glándulas linfáticas y médula ósea. Los estudios de toxicidad aguda han revelado que la administración única del complejo en estudio en animales, en una dosis que excede la dosis terapéutica recomendada para uso clínico de más de 5000 veces, no provoca reacciones tóxicas; esto significa un amplio intervalo terapéutico del complejo. Los estudios de toxicidad subaguda y crónica del complejo han revelado que no hay efectos secundarios en la administración a largo plazo en las dosis que superan la supuesta dosis terapéutica de 3000 veces. El examen del efecto del complejo sobre la morfología y la bioquímica de la sangre periférica de los conejillos de Indias de 3 y 6 meses después del inicio del estudio no ha revelado una alteración fiable de estos parámetros.

No se han revelado cambios patológicos al evaluar el estado de desempeño de los animales, la morfología y bioquímica de la sangre periférica, las funciones internas, el sistema cardiovascular y respiratorio y las funciones del hígado y los riñones. Por lo tanto, el complejo proteico-polipeptídico obtenido mediante el procedimiento reivindicado no tiene, en la administración a largo plazo a animales, ninguna propiedad tóxica que impida su uso como fármaco parenteral.

#### **Ejemplo 5. Mutagenicidad de la sustancia.**

Para evaluar la mutagenicidad del complejo proteico-polipeptídico reivindicado, se utilizó el siguiente conjunto de pruebas:

- Ensayo de mutagenicidad de Ames Salmonella/microsoma utilizando las cepas de Salmonella typhimurium TA 97, TA 98 y TA 100 como objetos de prueba; y

- micronúcleos en células de médula ósea murinas.

- 5 Se analizó una muestra del complejo proteico-polipeptídico, en forma de líquido transparente estéril empaquetado en un vial de vidrio oscuro, 20 ml, 2,3 mg/ml de sustancia.

#### EVALUACIÓN DE MUTAGENICIDAD DEL COMPLEJO PROTEICO-POLIPEPTÍDICO POR ENSAYO AMES.

- 10 El ensayo de mutagenicidad de Salmonella typhimurium es un sistema de prueba bacteriano para explicar las mutaciones génicas de prototrofia de histidina bajo el efecto de los compuestos químicos y/o sus metabolitos, induciendo las mutaciones de la sustitución de bases o desplazamiento del marco de lectura en el tipo de genoma del organismo. Los mutágenos que inducen la sustitución de pares de bases son los agentes que provocan las mutaciones de sustitución de pares de bases en la molécula de ADN. Los mutágenos que inducen las mutaciones de cambio de marco de lectura del código genético son los agentes que provocan la adición o el déficit de pares de bases únicos o múltiples en la molécula de ADN.

- 15 El objetivo del procedimiento es revelar la capacidad de las sustancias farmacéuticas o sus metabolitos para inducir las mutaciones génicas en las cepas indicadoras de Salmonella typhimurium. Las bacterias se tratan con un compuesto bajo prueba con sistema de activación metabólica (SM +) o sin (SM-). Después de un cierto tiempo de incubación, se compara el número de colonias revertidas de las diferentes cepas de prueba con el del revertante espontáneo de control negativo (cultivos no tratados o tratados con disolvente). Si el compuesto bajo prueba y/o sus metabolitos tienen actividad mutagénica, inducirán las mutaciones inversas desde la auxotrofia de histidina hasta la prototrofia en las cepas dependientes de histidina de Salmonella typhimurium.

- 20 Los ensayos usaron un conjunto de cepas indicadoras de Salmonella typhimurium que permiten registrar las mutaciones de sustitución de pares de bases (TA 100) de cambio de marco de lectura de código genético (TA 98 y TA 97). Las cepas provienen de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales, Instituto de Investigación en Genética y Selección de Microorganismos Industriales, Centro Científico de la Federación de Rusia.

- 25 Los cultivos bacterianos que manejan las Reglas de procedimiento, las verificaciones genotípicas de cepas, sus reglas de mantenimiento del museo, los utensilios experimentales, reactivos, medios y soluciones nutritivas, obtención de homogenato de hígado de rata, activación de compuestos mixtos y procedimientos de análisis estadístico cumplen con los estándares descritos en detalle en la literatura relevante.

La activación metabólica utilizó la fracción S9 del hígado de ratas Wistar; 5 días antes del sacrificio las ratas recibieron el inductor de enzimas microsómicas (sovol, 300 mg/kg, simple, por vía intraperitoneal). Para controlar el sistema de activación metabólica se usó el bromuro de etidio (10 µg/placa), cepa TA 98, SM +.

- 35 Se examinó la solución estéril del complejo proteico-polipeptídico estéril de 0,3 mg/ml: 0,1 ml/placa de solución madre y tres diluciones 10X en solución fisiológica (0,1 ml/placa). Las dosis de la prueba de sustancia fueron 690, 230, 23, 2,3, y 0,23 µg/placa.

- 40 El experimento tuvo controles positivos; para ellos se usaron las sustancias inductoras de mutaciones en cepas de microorganismos relevantes con o sin activación. Las variantes de no activación usaron la azida sódica, 10 µg/placa, cepa TA 100, SM-; 2,7-2,7-diamino-4,9-dioxi-5,10-dioxo-4,5,9,10-tetrahidro-4,9- diazopireno (DDDTDP), 10 µg/placa, cepa TA 98, SM-; y 9-aminocaridina (9AA), 50 µg/placa, cepa TA 97, SM-. Para controlar la actividad del sistema de activación metabólica, se utilizó el bromuro de etidio (10 µg/placa), cepa TA 98, SM +. El control negativo usó la solución fisiológica (0,1 ml/placa).

El agar semi-enriquecido selectivo (0,7%) en tubos de ensayo se fundió en un baño de agua a 100°C; luego se colocó en el baño de agua con termostato de 45°C a 46°C.

- 45 Primero, se pusieron en los tubos de ensayo de agar 0,1 ml de la muestra diluida de manera relevante, luego 0,1 ml de la suspensión bacteriana y 0,5 ml de la mezcla de activación microsómica (variante de activación metabólica). Luego, el contenido del tubo se mezcló rápidamente y se descargó en el agar mínimo inferior en las placas de Petri. La mezcla de activación microsómica y el tiempo de introducción de la reserva de agar semilíquido por placa no superó los 10 a 15 segundos. Las placas se dejaron durante 30 a 40 minutos a temperatura ambiente; después de la primera gelificación con agar, se colocaron en un termostato a 37°C. Los resultados fueron contabilizados después de una incubación de 48 horas.

- 55 Las variantes del sistema de activación no metabólica (SM-) y del sistema de activación metabólica (SM +) se experimentaron en paralelo. En la variante SM-, se puede observar el efecto de mutágenos directos (fármacos mutagénicos debido a la actividad de la estructura inicial del compuesto). A partir del efecto de los promutágenos, es decir, los compuestos cuyo efecto se asocia con la formación de metabolitos mutagénicos, esto puede ser tenido en cuenta cuando se comparan los resultados de los datos de análisis de pruebas de los compuestos SM- y SM+.

- Cada control y variantes experimentales usaron 2 placas cada uno. El efecto mutagénico se consideró significativo cuando el número medio de las colonias revertantes por placa en el experimento excedió el control una, 2 y más veces. Los resultados experimentales se tuvieron en cuenta en la condición de respuesta estándar en todas las variantes de control positivo y negativo. Los números de colonias revertantes en el control del disolvente, variantes SM- y SM +, se encontraban dentro del intervalo de fluctuaciones de nivel espontáneo para las cepas dadas. La respuesta de las cepas a los mutágenos estándar estaba dentro del intervalo de niveles comunes.
- El complejo proteico-polipeptídico examinado con todas las concentraciones no ha mostrado ningún efecto mutagénico para las cepas TA 100, TA 98 y TA 97, con y sin sistema de activación metabólica.
- CONCLUSIÓN: El complejo de polipéptido-proteína es incapaz de inducir mutaciones génicas con las cepas de prueba de Salmonella typhimurium dentro de todo el intervalo de concentraciones experimentales.
- EVALUACIÓN DE MUTAGENICIDAD DEL COMPLEJO PROTEICO-POLIPEPTÍDICO POR PRUEBA MICRONUCLEAR EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.
- La actividad citogenética es la capacidad de una sustancia para provocar anomalías cromosómicas estructurales y cuantitativas en las células somáticas y embrionarias.
- Los micronúcleos son las formaciones que contienen ADN de pequeño tamaño que consisten en los fragmentos acéntricos cromosómicos o están disminuidos en los cromosomas de la ana-telofase. En la etapa de telofase, estos fragmentos pueden entrar en los núcleos de las células hijas o formar micronúcleos individuales o múltiples en el citoplasma.
- El objetivo del estudio es revelar y evaluar cuantitativamente la actividad citogenética (mutagenicidad) de los fármacos farmacológicos en los policromatófilos de médula ósea de mamíferos. La base del procedimiento es el registro microscópico de las células de micronúcleos.
- El experimento utilizó los ratones híbridos F1 (CBAx C57Bl6/J) machos y hembras, dos meses de edad, 18 a 20 gramos de peso corporal. Cada grupo incluyó 6 animales. Los animales se mantuvieron bajo el régimen de luz de 12 horas, con agua y alimentos libremente disponibles. Los experimentos con animales de evaluación de mutagenicidad del complejo proteico-polipeptídico de administración simple y de cinco veces cumplieron con los protocolos oficiales. Se realizaron tres series experimentales con controles relevantes: dosis terapéutica: machos, administración única; dosis subtóxica: machos, administración única; y dosis terapéutica: machos y hembras, administración de cinco veces.
- Teniendo en cuenta que el posible procedimiento de administración clínica del complejo de polipéptido-proteína biológicamente activa puede ser intravenoso o endolumbar, este estudio utilizó el intraperitoneal con ratones. La dosis de evaluación de mutagenicidad del complejo de proteína - polipéptido se definió sobre la base de la dosis terapéutica diaria máxima recomendada (TD) para humanos. Se recomienda la administración de concentración IV de 2 ml a 0,5 mg/ml. La dosis terapéutica para humanos, incluidos infantes, puede ser de 0,05 mg/kg/día. Para calcular la dosis experimental de los ratones, se recomienda el factor de conversión para tener en cuenta al relación de área de superficie corporal humana y murina respecto de la masa corporal. En nuestro estudio fue 8,33. Por lo tanto, para la dosis terapéutica murina se tomaron aproximadamente 8,33 dosis terapéuticas humanas (0,42 mg/kg).
- Para la dosis subtóxica se usó el máximo experimental posible, 23 mg/kg, ya que la concentración de la sustancia era de 2,3 mg/ml; la sustancia total convencional administrada a ratones es 0,1 ml por 10 g de peso corporal. Por lo tanto, la dosis máxima probada, calculada para humanos, fue de 2,76 mg/kg.
- Se formaron siete grupos de animales, cuatro experimentales y tres de control (véase la Tabla 2). La sustancia de 0,42 mg/kg se administró cinco veces, a intervalos de 24 horas, tanto a machos como a hembras. En todos los grupos, los animales se sacrificaron 6 horas después de la última administración del complejo proteína-polipéptido.
- En otros dos grupos experimentales, el complejo proteico-polipeptídico se administró una vez a los machos, a 0,42 mg/kg y 23 mg/kg.
- Para el control negativo, se usó el control negativo de la solución fisiológica. Se administró por vía intraperitoneal a los machos y hembras de los dos grupos de control, los tiempos y volúmenes fueron los mismos que para el experimento. Control positivo: 20 mg/kg de ciclofosfamida disuelta improvisadamente en solución fisiológica, administración intraperitoneal única, 24 horas antes del sacrificio.
- La preparación de células de la médula ósea para la cuenta de micronúcleos se realizó de manera convencional, de acuerdo con los lineamientos de "Micronuclear Test Environmental Factors Mutagenicity Assessment in Mammalia Organs Cells". El procedimiento de sacrificio fue la dislocación cervical 6 horas después de la última administración del fármaco. Se extrajeron ambos huesos femorales, luego se quitaron los músculos. Para lavar la médula ósea, el suero embrionario bovino (NPP PanECO). La médula ósea de ambos huesos femorales se extrajo en un microtubo con una jeringa. La suspensión se centrifugó a 1000 rpm en 5 minutos; el sobrenadante se eliminó, y el sedimento se resuspendió cuidadosamente. Se usó una gota de la suspensión para preparar el frotis y luego se secó al aire. El



frotis luego se fijó con metanol durante 3 minutos. Para la tinción se utilizó el procedimiento de Romanowsky-Giemsa. 2000 policromatófilos por animal se analizaron luego con preparaciones codificadas. En el recuento de 500 eritrocitos, se determinó la relación de policromatófilos y eritrocitos normocromáticos. El análisis terminó, se codificaron las preparaciones.

- 5 El criterio de resultado positivo es el crecimiento reproducible y estadísticamente significativo del número de eritrocitos de policromatófilos en micronúcleos en al menos un grupo experimental en comparación con el control. El resultado positivo indica que la sustancia induce daños a los cromosomas y/o daños en los aparatos mitóticos de las células en animales experimentales.

- 10 El tratamiento estadístico de los resultados de la cuenta de micronúcleos utilizó el criterio X2 experimental para controlar la comparación de series; la comparación intergrupala proporcional de los policromatófilos utilizó el criterio de Mann-Whitney.

- 15 Resultados de la cuenta de policromatófilos de micronúcleos de médula ósea de ratones: en ninguna variante experimental, el complejo de proteína- polipéptido indujo el aumento de la proporción de policromatófilos de micronúcleos de médula ósea de los ratones en comparación con la serie de control experimental y relevante. Los 20 mg/kg de ciclofosfamida (control positivo) por vía intraperitoneal en ratones machos provocó células de micronúcleos 19,6 veces más altas (62,1 ‰ contra 3,16 ‰ en control, P <0,001). La porción de eritrocitos policromatófilos en el total de eritrocitos de la médula ósea se encontraban aproximadamente al mismo nivel tanto para el grupo experimental como para el control; por lo tanto, no hay efecto tóxico de la sustancia en las dosis probadas sobre la hematogénesis. Bajo el control positivo (ciclofosfamida) se registró el cambio de relación de 20 policromatófilos y eritrocitos normocromáticos a los últimos (en comparación con el control, P <0,005).

- 25 Por lo tanto, la prueba para la inducción de micronúcleos en los policromatófilos de micronúcleos de médula ósea de ratones en una y cinco veces la administración intraperitoneal de 0,42 mg/kg de peso corporal a machos y hembras (correspondiente, según el recuento, a la dosis terapéutica diaria para humanos) no ha revelado ninguna actividad mutagénica del complejo proteico-polipeptídico. No se ha revelado ninguna actividad mutagénica para la 25 administración del complejo de polipéptido-proteína única máxima posible, de 23 mg/kg en machos. El complejo proteico-polipeptídico no ha mostrado ningún efecto tóxico a partir del parámetro de "proporción de eritrocitos policromatófilos".

#### CONCLUSIÓN PARA LA EVALUACIÓN DE MUTAGENICIDAD DEL COMPLEJO DE PROTEÍNA-POLIPÉPTIDO

- 30 El complejo de polipéptido-proteína no ha mostrado actividad mutagénica en la prueba de Ames Salmonella/microsomos o en la prueba de inducción de micronúcleos de células de médula ósea de ratones realizada de acuerdo con las Directrices para el Estudio Experimental (Preclínico) de Nuevas Sustancias Farmacológicas.

#### **Ejemplo 6. Actividad específica de la sustancia [6, 7].**

- 35 EFECTO IRRITANTE LOCAL.

Los estudios han demostrado que la sustancia del complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo no produce un efecto irritante local cuando se administra por vía subcutánea, intravenosa e intranasal. En la administración intravenosa rápida, son posibles efectos de hipertermia. No se ha revelado ningún efecto irritante local sobre la mucosa nasal y de garganta en la administración intranasal de 1 mes en conejos.

- 40 ESTUDIOS DE INMUNOTOXICIDAD Y ALERGENICIDAD

#### Anafilaxis cutánea activa

- 45 El experimento usó los conejillos de Indias, 10 por grupo, 3 grupos. Patrón de sensibilización: primera inyección por vía subcutánea; luego dos por vía intramuscular, días alternos, área femoral. El día 14, la sustancia se administró por vía intracutánea, en diluciones de dos veces, en áreas cortadas del lomo. Para controlar la sensibilidad cutánea, la solución fisiológica se administró a un mismo animal, en otra área de piel cortada. A los animales de control se les administró una sustancia potenciadora de la inyección (igual a la dosis sensibilizante). Luego los animales fueron administrados por vía intravenosa 0.5 ml de solución azul de Evans al 1%. Treinta minutos después, los animales se sacrificaron con éster; se determinó el tamaño de la mancha azul en el costado interno de la piel en el punto de 50 administración. La reacción se consideró positiva en la mancha de más de 6 mm frente a máx. 3 mm en control. En 3 casos, la reacción positiva se registró en el grupo que recibió una dosis terapéutica de 10 veces. El número de reacciones significa la posibilidad de respuestas individuales.

Reacción de hipersensibilidad de tipo retardado en ratones.

- 55 El experimento usó los ratones no lineales, de 18 a 20 g de masa corporal, 10 animales por grupo, 30 en total. La sensibilización fue única, por vía intracutánea, en la inserción de la cola, emulsión de fármaco en NAF (1: 1). La dosis administrada fue de 60 µl. Los animales de control se sensibilizaron con emulsión de PAF con solución de

Hanks (1: 1). Para revelar la sensibilización, 5 días después, a los ratones se les administraron 40 µl del fármaco de prueba en solución de Hank en una almohadilla del pie posterior. Veinticuatro horas después de la prueba, el tamaño del edema se midió usando el micrómetro de ingeniería MK-0-25. El resultado del tratamiento estadístico no ha revelado ninguna diferencia significativa en el grosor del pie entre los grupos experimental y de control (P> 0,05). La administración de la sustancia no provoca la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado.

Estudio de actividad fagocítica de macrófagos peritoneales.

El experimento usó las ratas albinas de 180 a 200 g de peso corporal, 30 animales, 10 por grupo. Se estudiaron las dos dosis de fármacos, terapéuticas y terapéuticas de 10 veces; el tercer grupo era para el control. El procedimiento se basa en determinar la densidad óptica de la solución de lisis después de la destrucción de los fagocitos que han absorbido las partículas rojas neutras. Las ratas expuestas al fármaco en estudio fueron decapitadas. A los animales se les administraron por vía intraperitoneal 5 ml del medio 199 que contenía el 20% del suero embrionario bovino. Después de masajear la cavidad peritoneal, el medio fue succionado con una jeringa. Las porciones de la suspensión celular obtenidas de todo el grupo de animales se unieron en un conjunto común. La concentración de células vivas se llevó a  $1,5 \times 10^3$  células / ml. La suspensión celular se dispensó luego estérilmente en las placas de Petri de plástico de 40 mm de diámetro, 2 ml cada una. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. El sobrenadante con células despegadas fue eliminado; la monocapa fijada al plástico se lavó dos veces con el medio 199. Una solución con el rojo neutro se colocó en las placas ligeramente secas; estos se curaron durante 1 hora a 37°C. La solución fue derramada. Las células se lavaron con el medio 199. Se colocaron tres mililitros de la solución de lisis en cada placa. Las células se trataron completamente mediante un movimiento giratorio. La solución se vertió en tubos de ensayo; la densidad óptica se verificó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

La administración de la sustancia no inhibe la actividad de los macrófagos. No existen diferencias estadísticamente válidas entre los resultados de los grupos experimental y de control.

Reacción de desgranulación de los mastocitos

El experimento usó 30 ratas hembras de 180 a 200 g de peso corporal. La solución de sustancia se administró por vía intraperitoneal en dosis terapéuticas y dosis terapéuticas de 10 veces; el grupo intacto sirvió como control. Para obtener la suspensión de mastocitos, se decapitaron los animales, se inyectó un tampón en la cavidad peritoneal; Después de masajear la pared abdominal anterior, la suspensión de mastocitos se recogió en tubos de ensayo centrífugos. Las preparaciones se realizaron en los portaobjetos de vidrio teñidos con el rojo neutro al 0,3% en solución de alcohol. A 0,03 ml de la suspensión de mastocitos, se añadieron 0,03 ml del suero animal experimental y 0,03 ml del fármaco en estudio en dilución 1: 100. En control, la desgranulación máxima fue del 5%. Las preparaciones se cubrieron con un cubreobjetos sellando los bordes con cera. Luego se incubaron durante 15 minutos en el termostato a 37 ° C. Las preparaciones se estudiaron bajo microscopio en X40, contando los mastocitos desgranulados y normales, 100 en total. La reacción se consideró positiva con la desgranulación por encima del 20%.

La sustancia en la concentración de 0,01 mg / kg no provoca la desgranulación de los mastocitos, es la misma para el control; el umbral del 5% no se ha sobrepasado. La reacción del grupo de dosis terapéutica de diez veces es débilmente positiva, sin embargo, dentro del porcentaje de errores estadísticos.

PRUEBAS PRIÓNICAS

Los ensayos se tomaron de 4 viales. La reacción usó el procedimiento de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, con una almohadilla de poliestireno de 96 cavidades. Sistema de prueba de diagnóstico: PrionScreen. Espectrofotómetro: Digiscan. Cada ensayo se sometió a 4 repeticiones. Controles: K-: 8 cavidades, K+: 8 cavidades. Las densidades ópticas de control y estudio resultantes fueron consistentes con las condiciones de reacción.

Resultados: no se revelaron priones en la sustancia en estudio.

CONCLUSIÓN GENERAL.

Se ha estudiado la toxicidad de la sustancia original del complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo en los experimentos agudos y subcrónicos, y sus efectos irritantes, inmunotóxicos y alergénicos locales; y se ha llevado a cabo la búsqueda de posibles infecciones por priones.

La toxicidad aguda del fármaco se ha estudiado experimentalmente con los ratones de línea BALB / C. El fármaco se administró por vía subcutánea, intraperitoneal y por vía oral. La dosis máxima posible para la administración en ratones es de 0,2 ml, lo que hace 10 mg / kg. Se ha revelado que en la dosis especificada, el fármaco administrado por cualquiera de los tres procedimientos no dio como resultado la muerte de los animales ni provocó envenenamiento agudo.

El experimento subcrónico usó ratas de la línea Wistar, tanto maduras como inmaduras. El fármaco en estudio se administró por vía subcutánea, 0,01 mg / kg de dosis terapéutica y 0,1 mg / kg de diez veces la dosis terapéutica; y

por vía intravenosa, 0,0025 mg / kg, y x10 0,025 mg / kg. El experimento intranasal, 1 dosis / día (o 1.5 mg / ml, 0.2 ml) utilizó los conejillos de Indias. El estudio de toxicidad utilizó los procedimientos convencionales para la hematología y la bioquímica sanguínea, y la histología de las vísceras.

- 5 Se ha revelado que la administración de la sustancia de cualquier manera, tanto en la dosis terapéutica como terapéutica de diez veces, en el transcurso de 1 mes, no provoca alteración de las vísceras ni produce ningún efecto tóxico en el sistema sanguíneo. No se han revelado efectos irritantes locales en ninguna administración.

Los estudios de alergenicidad usaron las aplicaciones intracutáneas en conejillos de Indias. La sustancia no ha provocado ninguna respuesta alérgica en dosis terapéuticas. Para la dosis terapéutica diez veces mayor, se han registrado tres casos de hipersensibilidad. No se ha revelado inmunotoxicidad con las ratas Wistar.

- 10 La búsqueda de infecciones priónicas usó el procedimiento de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas. El medicamento está libre de estos agentes causales.

#### **Ejemplo 7. Efecto sobre los parámetros citocinéticos de la población celular.**

- 15 **Materiales y procedimientos.** Los fibroblastos murinos 3T3 se cultivaron en DMEM (PanEco, Moscú, Rusia), con adiciones: 584 mg / l de glutamina; agente antimicótico-antimicrobiano (Sigma, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y 10% de volumen de suero embrionario bovino estandarizado (HyClone, EE.UU.). Para lo experimental, las células se plantaron en las almohadillas de 24 cavidades (Corning), 3000 células / ml (cavidad). Para la morfología, las células se plantaron en cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Ted Pella, EE.UU.), colocados en las cavidades.

- 20 **Aplicación de sustancias de ensayo.** Un cultivo celular que alcanzó la densidad requerida, el medio de cultivo se reemplazó por el fresco de la misma composición (control), DMEM sin suero con 2 mg / ml de medio BSA (Sigma) (control negativo), DMEM sin suero con 10 % de volumen de sustancia biológicamente activa (experimento 1) y DMEM con 10% de suero y 10% de sustancia biológicamente activa (experimento 2).

- 25 **Procedimientos experimentales.** Las células se analizaron 8, 24 y 48 horas después de la aplicación de los agentes de prueba. Se analizó el estado de cultivo in vivo; se tomaron fotos de las células: microscopio invertido de contraste de fase Axiovert 200M (Carl Zeiss, Alemania), con lente de campo CE Plan-Nefluar 10x NA 0.5 y cámara digital ORCA II Erg-2 (Hamamatsu Photonics, Japón). Para determinar el número de células, la lámina de células se disoció con la mezcla 3: 1 de solución Versen (PanEco) y la solución de tripsina al 0,025% (PanEco). La suspensión resultante se centrifugó a 300 g; el sedimento se resuspendió en la solución de Hanks y se contó en la cámara de Goryaev. Para analizar los parámetros citocinéticos de la población celular, las células cultivadas en los cubreobjetos se fijaron con el glutaraldehído al 1% en tampón de fosfato 0,1 M a 4°C; se permeabilizó con la solución de Triton X-100 al 0,5% en PSB (10 minutos); se lavó con agua destilada; se tiñó con hematoxilina de Mayer (90 segundos) (Sigma); se disecó y se colocó en DePeX. Después de la permeabilización, las células se tiñeron con DAPI (0,1 µg/**МЛ**) y se colocaron en Moviol. Las preparaciones resultantes se estudiaron con el microscopio de fluorescencia Axioskop II (Carl Zeiss), lentes de campo Plan-Neofluar 40x NA 1,2 y 100x NA 1,3.
- 30
- 35

#### **RESULTADOS. PARÁMETROS CITOCINÉTICOS DE LA POBLACIÓN.**

Control. 8 horas. Índice mitótico: 8%. Apoptosis y necrosis: 0%.

24 horas. Índice mitótico: 11.9%. Apoptosis y necrosis: 0%. Celdas en la cavidad: 265.000.

48 horas. Índice mitótico: 9%. Apoptosis y necrosis: 0%. Celdas en la cavidad: 780.000.

- 40 **BSA. 8 horas. Índice mitótico: 5%. Apoptosis y necrosis: 0**

24 horas. Índice mitótico: 5,5%. Apoptosis y necrosis: 0%. Células en la cavidad: 167.500.

48 horas. Índice mitótico: 3%. Apoptosis y necrosis: 0%. Células en la cavidad: 625,000.

**Sustancia biológicamente activa.**

8 horas. Índice mitótico: 6%. Apoptosis y necrosis: 0%.

- 45 24 horas. Índice mitótico: 7.1%. Apoptosis y necrosis: 0%. Células en la cavidad: 250.000.

48 horas. Índice mitótico: 6%. Apoptosis y necrosis: 0%. Celdas en la cavidad: según el recuento: 187.000; real: ≈400.000 (eyección).

**Suero + Sustancia biológicamente activa.**

8 horas. Índice mitótico: 8%. Apoptosis y necrosis: 0%.

24 horas. Índice mitótico: 4.5% (eyección). Apoptosis y necrosis: 0%. Células en la cavidad: 317.500.

48 horas. Índice mitótico: 9%. Apoptosis y necrosis: 1%. Células en la cavidad: 680.000.

5 Todas las líneas experimentales muestran el aumento de biomasa; no se observa efecto citotóxico en ningún caso. En el control negativo, la eficiencia de la proliferación es mínima; con el complejo proteico-polipeptídico se estimula la proliferación en comparación con el control negativo. El control positivo y la sustancia y el medio añadido en suero muestran un mismo nivel de proliferación.

Las células incubadas con la sustancia forman procesos delgados y largos. Esto se ve especialmente bien en el primer día experimental. Con el suero en el fondo de la sustancia, el efecto permanece.

Conclusiones:

- 10 1) La sustancia biológicamente activa que consiste en el complejo proteico-polipeptídico no es un agente citotóxico.  
 2) La sustancia contiene factores de crecimiento, pero no es tan eficiente como estimulador de la proliferación como el suero sanguíneo.  
 3) La sustancia provoca cambios en la forma de las células, con una formación de procesos bien visible.

15 **Ejemplo 8. Efecto sobre el suministro sanguíneo cerebral y la tasa de supervivencia de ratas bajo daño cerebral isquémico.**

El experimento usó ratas Wistar macho, de 180 a 250 g de peso corporal, bajo oclusión bilateral irreversible de las arterias carótidas comunes utilizando los procedimientos generalmente conocidos [8-10]. Todas las manipulaciones veterinarias fueron asépticas, para mantener el estado de los animales experimentales. Los animales experimentales se mantuvieron en condiciones estándar [11].

20 Las ratas recibieron la anestesia de éter (éter dietílico químicamente puro, OAO "Medhimprom") a; luego se realizó una incisión cutánea de 8 a 10 cm de largo en la región del cuello, a lo largo de la línea media, para acceder a las arterias carótidas. Ambas arterias carótidas fueron expuestas, separando el nervio vago y el simpático. Los hilos de seda (seda blk 17 x 45 cm/M3/USP2/no cosido/Ethicon Johnson & Johnson, cat. No W203) se colocaron debajo de los vasos; luego, junto con un asistente, las dos arterias carótidas se ligaron en una sola etapa con un nudo de triple fricción. La incisión de la piel se suturó luego con la seda quirúrgica (seda blk 100 cm/M5/Sgle armado KP-3USP2/no cosido/Ethicon Johnson & Johnson, cat. No W794), uno o dos puntos quirúrgicos, con tratamiento adicional de la herida con el 5% de tintura de yodo. La solución fisiológica o cellex se administraron por vía intraperitoneal. El tiempo total de manipulación fue de 8 a 10 minutos; luego los animales fueron colocados en una jaula.

30 La tasa de supervivencia se siguió inmediatamente después del procedimiento y en el transcurso del primer día, es decir, la tasa de supervivencia final se fijó en 24 horas. La actividad biológica del fármaco en forma de protección cerebral bajo isquemia global incompleta en la ligadura de arterias carótidas en un solo paso se evaluó de la siguiente manera:

- expresada: tasa de supervivencia: > 80% de ratas;  
 35 - medio expresada: tasa de supervivencia: > 70% a 80% de ratas; y  
 - no expresada: tasa de supervivencia: <70% de ratas.

El procesamiento estadístico de los datos utilizó la prueba exacta de Fischer, teniendo en cuenta la multiplicidad de las comparaciones.

40 **Experimento 1**

Se usaron tres grupos de animales:

- Grupo 1: animales de control, solución fisiológica con jeringa desechable de insulina estéril: 0,5 ml/rata en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas después de la ligadura de las arterias carótidas;  
 - Grupo 2: animales operados simuladamente: mismas manipulaciones que en el control pero sin ligadura de arterias carótidas; solución fisiológica 0,5 ml/rata en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas; y  
 45 - Grupo 3: animales después de la ligadura de arterias carótidas; sustancia biológicamente activa: 0,5 ml/rata solución al 0,1% (0,2 mg/kg) en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas.

Los experimentos han demostrado que el mayor número, es decir, 11 de 24, de los animales en control murió dentro de la primera hora después de la ligadura de las arterias carótidas; 4 animales más murieron en las siguientes 24 horas; en total, 15 ratas de 24 murieron (63%, véase la Tabla 1). Entre los animales operados simuladamente, 2

(17%) ratas murieron inmediatamente después de la operación. La sustancia biológicamente activa 0,2 mg/kg (0,5 ml de solución al 0,1%) por vía intraperitoneal en 1 y 5 horas provocó la muerte en solo dos animales: 34/36 ratas sobrevivieron. El aumento de la tasa de supervivencia comparado con el control es del 95%. La Tabla 1 muestra los datos obtenidos.

5 **Tabla 1. Efecto de la sustancia biológicamente activa sobre la tasa de supervivencia de ratas bajo ligadura de ambas arterias carótidas.**

Grupos de animales	Bioactividad expresada	
	Sobrevivieron	Murieron
Grupo1 Control: 24 ratas	9 de 24 (37%)	15 de 24 63%
Grupo 2 operado en forma simulada 12 ratas	10 de 12* (83%)	2 de 12 (17)%
Grupo 3 Sustancia 0,2 mg/kg 36 ratas	34 de 36* (95%)	2 de 36 (5%)

\* -P ≤ 0,01 en comparación con el control.

10 Por lo tanto, la sustancia biológicamente activa del complejo proteico-polipeptídico asegura un aumento de la tasa de supervivencia de los animales estadísticamente significativa en comparación con el control bajo isquemia global incompleta del cerebro de la ligación de ambas arterias carótidas en una sola etapa.

**Experimento 2.**

Se usaron tres grupos de animales:

- 15 - Grupo 1: animales de control, solución fisiológica con jeringa de insulina desechable estéril: 0,5 ml/rata en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas después de la ligadura de las arterias carótidas;
- Grupo 2: animales después de la ligadura de arterias carótidas; sustancia biológicamente activa: 0,5 ml/rata de solución al 0,1% (0,2 mg/kg) en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas; y
- 20 - Grupo 3: animales después de la ligadura de arterias carótidas; 0,2 mg/kg de sustancia biológicamente activa liofilizada: 0,1 mg de peso seco en solución fisiológica al 0,1%, 0,5 ml/rata en 1 hora y 0,5 ml/rata en 5 horas.

25 Los experimentos han demostrado que el mayor número, es decir, 11 de 24, de los animales en control murió dentro de la primera hora después de la ligadura de las arterias carótidas; 4 animales más murieron en las siguientes 24 horas; en total, murieron 15 ratas de 24 (63%, véase la Tabla 1). La sustancia biológicamente activa diluida liofilizada 0,2 mg/kg (0,5 ml de solución al 0,1%) por vía intraperitoneal en 1 y 5 horas provocó la muerte en solo cuatro animales: sobrevivieron 8/12 ratas. La sustancia biológicamente activa 0,2 mg/kg (0,5 ml de solución al 0,1%) por vía intraperitoneal en 1 y 5 horas provocó la muerte en solo dos animales: 34/36 ratas sobrevivieron. El aumento de la tasa de supervivencia en comparación con el control es del 95%. La Tabla 1 muestra los datos obtenidos.

30 **Tabla 1. Efecto de la sustancia biológicamente activa en la tasa de supervivencia de ratas bajo ligadura de ambas arterias carótidas.**

Grupos de animales	Bioactividad expresada	
	Sobrevivieron	Murieron
Grupo1 Control: 24 ratas	9 de 24 (37%)	15 de 24 63%
Group 2 Torta seca 12 ratas	8 de 12* (66,7%)	4 de 12 (33,3)%
Grupo 3 Sustancia: 0,2 mg/kg 36 ratas	34 de 36* (95%)	2 de 36 (5%)

\* -P ≤ 0,01 en comparación con el control.

Por lo tanto, la sustancia biológicamente activa del complejo proteico-polipeptídico asegura un aumento de la tasa de supervivencia de los animales estadísticamente significativa en comparación con el control bajo isquemia global incompleta del cerebro en la ligación de ambas arterias carótidas en una sola etapa.

35 La actividad biológica de la fracción liofilizada del complejo proteico-polipeptídico bajo isquemia global incompleta del cerebro en la ligación de ambas arterias carótidas en una sola etapa es mucho más baja que la de la sustancia líquida.

Fuentes de información tomadas en cuenta:

1. Encyclopedia of Drugs, 2006, página 970.
2. Patente RF No 2128511(1999)
3. Patente RF No 2104702(1999)
- 5 4. Patente RF No 2049472(1999)
5. Methodological Guidelines. Carcinogenicity Assessment of Pharmacological Drugs and Excipients in Short-Term Tests. // Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances. Editor general: Prof. R.U. Khabriev, RAMS. 2° edición, revisado y corregido Moscú, OAO "Meditsina" Publishing House. 2005., página 131-170.
- 10 6. Methodological Guidelines. Carcinogenicity Assessment of Pharmacological Drugs. // Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances. Editor general: Prof. R.U. Khabriev, RAMS. 2° edición, revisado y corregido Moscú, OAO "Meditsina" Publishing House. 2005., página100-122.
- 15 7. Methodological Guidelines. Carcinogenicity Assessment of Pharmacological Drugs and Excipients in Short-Term Tests. // Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances. Editor general: Prof. R.U. Khabriev, RAMS. 2° edición, revisado y corregido Moscú, OAO "Meditsina" Publishing House. 2005., página131-170.
8. I.V. Silkina, T.S. Gan'shina, S.B. Seredinin, P.S. Mirzoyan. Enhancement of Blood Supply to Ischemic Brain Under Effect of Afobazol. J. Exp. and Clin. Pharmacology, 2004, volumen 67, No 5, página 9-13.
- 20 9. Smith M.L., Bendek G., Dahlgren N. at all, Models for studing, long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. A 2-vessell occlusion model.// Neurol.Scan., 1984, v.69, página 385 - 400.
10. Y.Wang-Fisher. Manual of Stroke Models in rats. CRC press, 2008, página 3-4.
11. Laboratory Animals Care and Keeping Program. Nursery for laboratory animals under Federal Institute of bioorganic chemistry, noviembre de 2005.

#### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

25 La invención está destinada a ser utilizada en la fabricación medicamentos para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y periférico; la misma incluye el proceso de fabricación.

30

35

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de una formulación de complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo que comprende acciones que implican la rápida congelación de cerebro embrionario de ganado doméstico ungalado de edad gestacional desde la mitad del primer trimestre hasta la mitad del último trimestre de la gestación y gradual descongelamiento, etapa por etapa, descongelación, a temperaturas de 2°C a 28°C;
- homogeneización en solución tampón con extracción simultánea en presencia de inhibidores de la proteólisis y detergentes no iónicos, incluyendo tetraacetato de etilendiamina, manitol o maltosa, con un pH no inferior a 5,2 ni superior a 8,5, con una relación volumétrica de solución/tejido de al menos 1: 0,5;
- 10 - el homogenato se separa del tejido no diluido y los componentes celulares por filtración y centrifugación posterior, a "g" entre 10000 y 30000, en 90-30 minutos, respectivamente;
- el sobrenadante se filtra a través de un filtro de membrana con un tamaño de poros máximo de 0,45 µm;
  - el filtrado se somete a cromatografía de intercambio aniónico a 2-4°C, con la solución tampón como fase móvil, separando proteínas y polipéptidos en contacto con el adsorbente, con un incremento etapa por etapa, utilizando eluyente con una fuerza iónica que oscila entre 0,08 y 0,26 mol/l y pH - entre 5,2 y 8,5, aumentando la fuerza iónica de la fase móvil en incrementos de 0,02 mol/l, comenzando a recolectar fracciones diana usando la solución con fuerza iónica de al menos 0,1; y
- 15
- las fracciones diana recolectadas se desalan utilizando el procedimiento de diálisis o filtración en gel y, después de la adición de sustancias conservantes **caracterizadas por** actividad bacteriostática y fungicida con la concentración total máxima de 0,06 mg/ml y solubilizante con la concentración total máxima de 0,01 mg/ml, se efectúa una ultrafiltración con un tamaño de poro máximo de 0,22 µm, luego se realiza un envasado estéril.
- 20
2. El complejo proteico-polipeptídico biológicamente activo que tiene efecto de restauración específico de tejido en tejidos neuronales obtenidos a partir de cerebro congelado rápidamente obtenible mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 1, que incluye proteínas y polipéptidos neutros ligeramente ácidos con carga negativa relacionados con los factores de crecimiento, diferenciación, moléculas de señalización que determinan su actividad biológica y farmacéutica, con una masa molecular de 5 a 200 kDa, con al menos un 80% de la masa proteica total que tiene una masa molecular que varía de 10 a 120 kDa, se caracteriza con un valor pico en la longitud de onda de 274-284 nm en el espectro UV-visible y la presencia de bandas en el intervalo de 4,2 a 8,4 en enfoque isoeléctrico
- 25
- 30 en gel de poliacrilamida al 5%.