



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109009** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
A61K 36/87 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 14705	(72) Винахідник(и): Шойрінг Уве (DE), Лангер Мартін (DE), Пломанн Бернд (DE), Файстель Бйорн (DE), Вельбрьоль Бернд (DE)
(22) Дата подання заявки: 20.05.2011	(73) Власник(и): БЬОРИНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ІНТЕРНАЦІОНАЛЬ ГМБХ, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.07.2015	(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 10164316.1	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: FR 2795964 A1, 12.01.2001 WO 0128363 A1, 26.04.2001 WO 2004047748 A2, 10.06.2004 EP 0348781 A2, 03.01.1990 US 5912363 A, 15.06.1999 EP 1762234 A1, 14.03.2007
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 28.05.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.04.2013, Бюл.№ 7	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2015, Бюл.№ 13	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2011/058282, 20.05.2011	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗБАГАЧЕНОГО ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ РОСЛИНИ Vitis vinifera L.**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу одержання екстракту з листя рослини Vitis vinifera L., який полягає в тому, що: а) підготовляють рослинну сировину з листя рослини Vitis vinifera L., б) рослинну сировину піддають екстракційній обробці екстрагентом, вибраним з води й суміші води зі спиртом, з одержанням неочищеного екстракту, в) неочищений екстракт відокремлюють від підданої екстракційній обробці рослинної сировини, г) щонайменше частково видалають екстрагент із одержанням згущеного екстракту, д) згущений екстракт знову розчиняють у воді, є) відокремлюють нерозчинні компоненти, ж) вибірково підвищують концентрацію вторинних рослинних речовин шляхом двофазної екстракції Винахід також стосується одержуваного цим способом екстракту, лікарських препаратів, що його містять, а також їх застосування.

UA 109009 C2

Даний винахід відноситься до екстрактів з листя рослини *Vitis vinifera* L., до їх одержання й застосування.

Венозною слабкістю (слабкістю венозних стінок) у повсякденній мові називають патологію, при якій утворюються скупчення води в м'яких тканинах нижніх кінцівок і яка проявляється у вигляді різного роду розладів і нездужань, таких як вага в ногах і швидкий стомлюваності ніг. Так зване застоювання води в ногах означає скупчення, що приводить до появи набряку, води в м'яких тканинах і припускає можливість виходу води з кровоносних судин. Відповідно до цього слід вважати, що проникність стінок судин є надмірно підвищеною.

Венозну слабкість можна також розглядати як ранню стадію хронічної венозної недостатності (ХВН). В основі виникнення ХВН, що називають також синдромом хронічного венозного застою, лежить порушення мікроциркуляції по судинах внаслідок утруднення венозного відтоку. Ризик виникнення й розвитку хронічної венозної недостатності збільшується з віком, наявністю ожиріння, наявністю флебіту в анамнезі, наявністю тромбозу глибоких вен і наявністю важкої травми нижніх кінцівок. У жінок ХВН зустрічається у два рази частіше, ніж у чоловіків.

Важливу роль у виникненні хронічної венозної недостатності грає наявність патологічного підвищеного кров'яного тиску в поверхневих венах. У нормі воно становить 20-30 мм рт. ст., однак внаслідок венозного тромбозу, первинної або вторинної патології венозних клапанів або ослаблення м'язового насоса зростає до 60-90 мм рт. ст. Настільки високий тиск є причиною відповідальних за наступні ускладнення анатомічних, фізіологічних і гістологічних змін судин. У фізіологічних умовах капілярне русло захищене від значних змін тиску, оскільки передкапілярні артеріоли здатні рефлекторно стискуватися. Однак у пацієнтів із хронічно підвищеним венозним тиском такий рефлекс приблизно втрачений, тобто при змінах положення тіла зміни тиску передаються далі безпосередньо на капілярне русло.

При підвищеному венозному тиску, що зберігається тривалий час, відбуваються зміни, що зачіпають стінки капілярів. До таких змін відносяться розширення й подовження капілярного русла, збільшення поверхні ендотелію, підвищене накопичення колагену типу IV у базальній мембрані й перикапілярне відкладення фібрину. Підвищений венозний тиск у сполученні з аномальними капілярами з підвищеною проникністю їхніх стінок приводить до виходу води, великих білків і еритроцитів в інтерстицій. Можливість розчинення фібрину, що накопичується, також представляється не настільки простою. Одночасно відбувається зниження газообміну, тобто настає гіпоксія шкіри. Внаслідок цього крім іншого відбувається активізація лейкоцитів.

Аналогічний процес відомий за гострофазовою реакцією при запаленнях. При цьому проникність стінок судин підвищується на декілька хвилин під дією медіаторів судинної проникності, таких як гістамін, простагландини (наприклад, PGE-2), кініні й серотонін. Типовими ініціаторами подібної гострофазової реакції є цитокіни, такі як інтерлейкін-1 (IL-1 β), інтерлейкін-6 (IL-6), фактор-альфа некрозу пухлини (TNF- α), фактор-бета росту пухлини (TGF- β) або інтерферон-гама, які виділяються крім іншого ендотеліальними клітинами, фібробластами, макрофагами, гранулоцитами й лімфоцитами. Такі імунокомпетентні клітини починають виділяти цитокіни, наприклад, після ушкодження або загибелі сусідніх клітин. По кров'яному руслу цитокіни попадають у печінку, де вони разом з кортизолом спонукають цей орган до продукування приблизно 30 різних білків гострої фази (БГФ). БГФ сприяють протіканню процесів загоєння ран і протидіють ушкодженню тканини. Наслідку гострофазової реакції носять не тільки локальний, але й системний характер. Локальні ефекти повинні обмежувати можливі інфекції й елімінувати ксенобіотики (наприклад, синтетичні барвники, пестициди й хлоровані розчинники). Мертві або ушкоджені клітини усуваються в результаті фагоцитозу й ініціюють відбудовні процеси. Системні ж наслідки гострофазової реакції проявляються в захисних реакціях, які повинні забезпечувати виживання всього організму, наприклад, у захисних реакціях проти ендотоксинів.

Відповідно до директив Німецького суспільства флебології (директива Асоціації наукових медичних суспільств (AWMF) № 037/009) як допоміжні медикаментозні засоби при лікуванні хронічної венозної недостатності використовують крім іншого наступні засоби: ацетилсаліцилову кислоту, діуретики, фібринолітичні засоби (дефібротид, станазолол, сулодексид), стимулятори фібринолізу, ілопрост, пентоксифілін, простагландин E1, сапоніни (екстракти із центеллі, кінського каштана, ігліци), бензарон, кальцію добезилат, нафтазон, трибенозид, екстракт гінго білоба, а також численні речовини, що належать до великої групи флавоноїдів [Havsteen B.H., "The biochemistry and medical significance of the flavonoids", Pharmacol. Ther., 96 (2-3), 2002, ss. 67-202]. За результатами досліджень вдалося підтвердити однозначно позитивний вплив флавоноїдів на розвиток набряків [Martinez M.J., Bonfill X., Moreno

R.M., Vargas E., Capella D., "Phlebotonics for venous insufficiency", Cochrane Database of Systematic Reviews, 2005, випуск 3, арт. №: CD003229. DOI: 10.1002/14651858.CD003229.pub2].

За спостереженнями в тих регіонах, де широко розвинене виноградарство, венозна слабкість і супутні їй ускладнення зустрічаються значно рідше. Очевидне пояснення цьому полягає в тому, що в рослині виду *Vitis vinifera* L. (винограду культурного), очевидно, містяться сполуки, які мають антагоністичні властивості відносно подібного захворювання й тому протидіють його виникненню й розвитку.

Традиційно виноградне листя не тільки вживали в їжу як зелень, але й використовували у вигляді відварів і настоїв у медичних цілях при порушеннях у період менопаузи або для лікування геморою. У фармакопеї Франції до застосування як венотонізуючий засіб рекомендований екстракт із листя червоного винограду. Протягом декількох років у продаж під назвою Antistax® надходять препарати з водним екстрактом з листя червоного винограду, які успішно застосовуються при хронічній венозній недостатності (ХВН) [Kiesewetter H., Koscielny J., Kalus U., Vix J.M., Peil H., Petrini O. і ін., "Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia vitis viniferae) in chronic venous insufficiency (stages I-II). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Arzneimittel-Forschung*, 50(2), 2000, сс. 109-117]. Екстракт, що міститься в таких препаратах, містить флавоноїди в кількості приблизно 5 %. Як представники іншої групи фенольних сполук в екстракті містяться антоціани в кількості приблизно 0,1 %.

Враховуючи гарну переносимість відомих у теперішній час екстрактів з виноградного листя мета даного винаходу полягала в тому, щоб запропонувати екстракт нового типу, що рівною мірою був би придатний для застосування у всьому спектрі запальних захворювань. Локальна протизапальна дія може за певних умов виявитися корисною протягом усього шлунково-кишкового тракту при лікуванні або профілактиці запальних захворювань. До запальних захворювань верхнього відділу травного тракту відносяться гінгівіт, пародонтит, стоматит, езофагіт і гастрит. Найбільш відомими представниками запальних захворювань кишечника є лімфоцитарний коліт, виразковий коліт і хвороба Крона.

Під гемороєм у звичайній мові розуміють варикозноподібне або ж вузлоподібне здуття, відповідно розширення печеристого тіла прямої кишки (*Corpus cavernosum recti*), що розташовано між прямою кишкою й сфінктером задньопрохідного отвору. Таке печеристе тіло називають також гемороїдальним сплетенням. Воно складається з артеріального й венозного сплетення, що разом із сфінктером забезпечує можливість точного змикання задньопрохідного отвору. Говорячи про геморої, під ним, однак, здебільшого мають на увазі гемороїдальну хворобу й заподіювані нею страждання. До типових для неї симптомів при цьому відносяться легкі кровотечі, почуття тиску, сверблячка, шкірна висипка і проблеми, що проявляються на стадії, яка зайшла вже далеко при контрольованому відході газів, що утворилися в кишечнику, і при дефекації. Причини можуть полягати крім іншого у варикозноподібних розширеннях розташованих поблизу заднього проходу кровоносних судин. Аналогічне захворювання, назване періанальним тромбозом (або "помилковим" гемороєм), виникає в результаті утворення згортка крові (тромбу) у шкірних венах навколо заднього проходу й називається також анальним тромбозом. Періанальні тромбози часто виникають через тривале сидіння, сидіння на холодних поверхнях, сильного або тривалого натужування при дефекації (наприклад, при твердому випорожненні), а також при вагітності й пологах. Періанальні тромбози можуть також виникати внаслідок сильного кашлю, внаслідок фізичного навантаження, внаслідок нестачі рідини через її пиття в занадто малих кількостях і навіть внаслідок чихання. При цьому кровоносні судини також можуть збільшуватися в розмірах, що перевищують звичайні розміри. При гемороїдальній хворобі, так само як і при періанальному тромбозі поряд з оперативними заходами поширеним також є застосування супозиторіїв з болезаспокійливими або протизапальними діючими речовинами (директива з лікування гемороїдальної хвороби "www.uni-duesseldorf.de/AWMF/11/081-007p.htm" і директива по лікуванню перианального тромбозу "www.derma.de/585.0.html").

Рівень техніки

Відносно інших частин рослини *Vitis vinifera* L., наприклад, виноградних кісточок, уже описані деякі методи підвищення концентрації тих або інших речовин. На відміну від таких методів, як мікрохвильова екстракція (CN 1102589 C), які, однак, забезпечують лише малий коефіцієнт збагачення при збільшеному виході продукту, методи екстракції надкритичними рідинами (CN 1107110 C) придатні тільки для ліпофільних структур. Згідно з CN 1454896 для підвищення концентрації олігомерних проантоціанидів використовують кислотну первинну екстракцію в поєднанні з рідинно-рідинною екстракцією. В ЕР 348781 описаний спосіб підвищення концентрації олігомерних сполук із виноградних кісточок шляхом фільтрування через

мембранний фільтр, тоді як в WO 2005/036988 і EP 1909750 заявлений хроматографічний спосіб вибіркового підвищення концентрації поліфенолів і зниження концентрації мономерів.

У GB 934554 описаний спосіб теплої водно-спиртової екстракційної обробки (50-80 % EtOH) листя червоного винограду з наступним підкисленням для додання червоного фарбування. Для видалення хлорофілу й восків пропонується рідинно-рідинна екстракція бензолом або чотирьоххлористим вуглецем, а як альтернатива -пересадження в чистій воді. Шляхом висалювання можна прискорити осадження дубильних речовин. Далі йде стадія очищення шляхом рідинно-рідинної екстракції бутанолом або пентанолом. З отриманого в результаті спиртового насиченого екстрагенту при необхідності шляхом обробки діетиловим ефіром, гасом або бензолом осаджують проціанідинову фракцію й потім сушать в щадних умовах (у вакуумі або у башті розпилювального сушіння). Подібний спосіб є винятково складним і витратним у здійсненні, а склад одержуваного ним продукту характеризується значними відхиленнями від складу еталонного екстракту. Тому тривають пошуки альтернативного способу, що дозволяв би одержувати екстракти з меншими витратами.

В основу даного винаходу було покладене завдання розробити альтернативний спосіб одержання ефективних екстрактів з виноградного листя.

Зазначене завдання вирішується за допомогою способу одержання екстракту з листя рослини *Vitis vinifera* L., який полягає в тому, що

- а) підготовляють рослинну сировину з листя рослини *Vitis vinifera* L.,
- б) рослинну сировину піддають екстракційній обробці екстрагентом, вибраним з води й сумішей води зі спиртом, з одержанням неочищеного екстракту,
- в) неочищений екстракт відокремлюють від підданої екстракційній обробці рослинної сировини,
- г) щонайменше частково видаляють екстрагент із одержанням згущеного екстракту,
- д) згущений екстракт знову розчиняють у воді,
- е) відокремлюють нерозчинні компоненти,
- ж) вибірково підвищують концентрацію вторинних рослинних речовин шляхом I. двофазної екстракції або II. фільтрування через мембранний фільтр.

Відповідно до винаходу використовують листя рослини *Vitis vinifera* L. Його в принципі можна використати у свіжому або висушеному стані.

Переважно листя слід подрібнювати перед їх екстракційною обробкою.

В одному із окремих варіантів здійснення даного винаходу підготовка рослинної сировини полягає в зборі листя рослини *Vitis vinifera* L. у момент, до якого вміст у них флавоноїдів досяг оптимуму, у сушінні й подрібнюванні листя, а також при необхідності в різанні листя на шматочки.

Екстракційну обробку рослинної сировини проводять водою або сумішшю води зі спиртом для одержання таким шляхом неочищеного екстракту. Екстрагент переважно при цьому використовати в кількості від 5 до 30 кг на 1 кг висушеної рослинної сировини.

Як екстрагент переважно використовувати воду або суміш води з етанолом з вмістом останнього від 5 до 95 % (в об'ємному співвідношенні).

Особливо переважним є застосування екстрагенту, що поряд з водою містить етанол у кількості від 25 до 50 % (в об'ємному співвідношенні).

Екстракційну обробку рослинної сировини переважно проводити при температурі в межах від 40 до 80 °C, а найбільш доцільно проводити її, як було встановлено, при температурі, що на 15-25 °C є нижче температури кипіння застосовуваного екстрагенту.

Переважний при екстракційній обробці рослинної сировини тиск може знаходитися в широких межах, не представляючи собою критичну величину. Звичайно, однак, екстракційну обробку рослинної сировини проводять при тиску в межах від 900 до 1500 мбар, переважно від 950 до 1100 мбар, насамперед при навколишньому тиску, тобто при тиску близько 1013 мбар.

Неочищений екстракт потім відокремлюють від підданої екстракційній обробці рослинної сировини. Таке відділення звичайно проводять шляхом фільтрації або іншими відомими фахівцями в даній галузі методами. Для застосування в подібних цілях придатною є, наприклад, фільтрація через сито з розміром отворів 4 мм і через наступні поліамідні рукавні фільтри з розміром комірок 250 мкм. Інші придатні для застосування в цих цілях методи розділення є відомими фахівцями.

Після цього з відділеного неочищеного екстракту щонайменше частково видаляють екстрагент із одержанням згущеного екстракту. Під частковим видаленням екстрагенту згідно з даним винаходом маєтись на увазі видалення екстрагенту в кількості від 30 до 99 % (в об'ємному співвідношенні) у перерахуванні на використовуваний обсяг екстрагенту, переважно

в кількості від 75 до 98 % (в об'ємному співвідношенні), насамперед в основному повне видалення екстрагенту, тобто його видалення в кількості щонайменше 95 % (в об'ємному співвідношенні). Звичайно екстрагент видаляють шляхом нагрівання й/або під зниженим тиском. Придатні для застосування в цих цілях методи й устаткування відомі фахівцям.

5 Отриманий таким шляхом згущений екстракт знову розчиняють у воді й відокремлюють нерозчинні компоненти.

Звичайно воду для повторного розчинення в ній згущеного екстракту використовують у кількості, що становить від 1 до 10 частин у перерахуванні на 1 частину отриманого неочищеного екстракту. Нерозчинні компоненти відокремлюють звичайними в даній області
10 методами, такими як фільтрація й/або центрифугування.

Далі йде стадія вибіркового підвищення концентрації вторинних рослинних речовин або шляхом двофазної екстракції, або шляхом фільтрування через мембранний фільтр.

Двофазну екстракцію можна проводити у вигляді твердофазної екстракції, при цьому для застосування як твердої фази добре зарекомендувала себе адсорбуюча смола. До придатних
15 для застосування в цих цілях адсорбуючих смол відносяться, наприклад, такі із групи неіоногенних гідрофобних співполімерів дивінілбензолу, аліфатичних складних полієфірів і формофенольних полімерів, що випускають під найменуваннями Amberlite®, Levatite®, Miontech® і Diaion®. Для застосування при здійсненні пропонованого у винаході способу придатними є адсорбуючі смоли із середнім розміром внутрішніх пор переважно в межах від
20 300 до 700 ангстрем, переважно від 400 до 500 ангстрем.

Речовини, які зв'язуються з адсорбентом, вимивають із нього й використовують надалі, а речовини, що не зв'язалися з ним відкидають.

Звичайно екстракцію проводять при температурі в межах від 10 до 30 °С. Значення рН застосовного завантажуваного розчину звичайно встановлюють на величину в межах від 3 до 6,
25 а переважно встановлювати його на величину в межах від 4,5 до 5,5, особливо переважно на 5.

Двофазну екстракцію можна далі проводити у вигляді рідинно-рідинної екстракції, при цьому в переважному варіанті друга фаза являє собою не змішувану з водою рідину й вибрана із групи спиртів, кетонів, алканів і складних ефірів. В одному з окремих варіантів друга фаза являє собою не змішуваний з водою спирт, переважно спирт з C₄-C₅, особливо переважно н-бутанол.
30 При цьому ту фракцію, що переходить у другу фазу, використовують надалі, а водну фазу відкидають.

Звичайно екстракцію проводять при вмісті сухої речовини у вихідному розчині в межах від 3 до 30 %, переважно від 10 до 20 %, особливо переважно 15 %.

У принципі для вибіркового підвищення концентрації можна також використати
35 фільтрування через мембранний фільтр, для застосування при якому добре зарекомендували себе мембрани з відсіченням за молекулярною масою (межею крупності макромолекул, що проходять через них) у межах від 30 до 2000 кілодальтон (кДа).

При цьому пермеат використовують надалі, а концентрат відкидають.

В одному із окремих варіантів здійснення даного винаходу екстракт по завершенні
40 вибіркового підвищення концентрації з одержанням сухого екстракту з листя рослини *Vitis vinifera* L. піддають сушінню. Сушіння при цьому проводять звичайними в даній області методами, такими, наприклад, як розпилювальне сушіння в стрічковій сушарці. Однак концентрований екстракт можна також використати надалі й без його попереднього сушіння.

Описаним вище пропонованим у винаході способом одержують екстракти з листя рослини
45 *Vitis vinifera* L. зі співвідношенням між натуральною рослинною сировиною й екстрактом (НРС/Е) у межах від 12:1 до 40:1. Загальний вміст флавоноїдів в одержаних пропонованим у винаході способом і пропонованих у винаході екстрактах звичайно становить щонайменше 15 мас. %, переважно щонайменше 20 мас. %, а вміст антоціанів становить щонайменше 0,1 мас. %, переважно щонайменше 0,2 мас. %, насамперед щонайменше 0,3 мас. %. Завдяки цьому
50 досягається посилене інгібування цитокінів, що підвищують проникність судинних стінок, у зіставленні з порівняльним або контрольним екстрактом (відповідно до рівня техніки).

Відповідно до цього ще одним об'єктом даного винаходу є екстракт, одержаний описаним вище способом.

Наступним об'єктом даного винаходу є препарат-екстракт, що містить пропонований у
55 винаході екстракт, а також щонайменше одну фізіологічно сумісну допоміжну речовину. Прийнятні фізіологічно сумісні допоміжні речовини відомі фахівцям.

Ще одним об'єктом даного винаходу є застосування пропонованого у винаході екстракту або
60 пропонованого у винаході препарату-екстракту для приготування медикаментів, фармацевтичних композицій або харчових добавок. Подібні засоби приготують звичайними в даній галузі методами.

Ще одним об'єктом даного винаходу є застосування пропонованого у винаході екстракту або пропонованого у винаході препарату-екстракту для лікування або профілактики запальних захворювань кровоносних судин або шлунково-кишкового тракту, при порушенні венозної мікроциркуляції, при обумовлених ішемією захворюваннях, при гемороїдальній хворобі або при перванальному тромбозі. Під запальним захворюванням кровоносних судин, яке підлягає лікуванню відповідно до винаходу мається на увазі насамперед флебіт. Під порушенням венозної мікроциркуляції, яке підлягає лікуванню відповідно до винаходу мається на увазі насамперед хронічна венозна недостатність (ХВН). Під обумовленими ішемією захворюваннями, які підлягають лікуванню відповідно до винаходу маються на увазі насамперед захворювання серця, особливо інфаркт міокарда.

Наступним об'єктом даного винаходу є застосування пропонованого у винаході екстракту або пропонованого у винаході препарату-екстракту для лікування або профілактики гострих або хронічних запалень шлунково-кишкового тракту, гемороїдальної хвороби або періанального тромбозу.

При пропонованому у винаході застосуванні згідно з винаходом екстракту або препарату-екстракту згідно з винаходом для лікування або профілактики зазначених вище захворювань і порушень його можна вводити в організм внутрішньосудинно, перорально, ректально або крізьшкірно. При цьому пропоновані у винаході екстракти або пропоновані у винаході препарати-екстракти мають місцеву або системну дію.

Нижче винахід більш докладно пояснюється на прикладах, які не обмежують його обсяг.

Використовувані методи аналізу

Хімічні параметри

Вміст флавоноїдів визначають методом рідинної хроматографії високого розділення (РХВР-методом), що дозволяє виявляти наявність таких флавоноїдів, як ізокверцитин, кверцитин-3-О- β -D-глюкуронід і кемферол-3-О- β -D-глюкозид. Нерухомою фазою при цьому служить хроматографічна колонка Superspher RP8 із частками розміром 4 мкм і з розміром 125 × 4 мм. Ізократичне розділення проводять у рідинному хроматографі при 25 °C і при швидкості потоку 1 мл/хв. Екстрагент складається на 107 частин з тетрагідрофурану, на 55 частин з ацетонітрилу й на 810 частин з фосфорної кислоти (0,003 молей/л). Виявлення проводять на довжині хвилі 360 нм.

Вміст антоціанів визначають окремим РХВР-методом аналогічно до європейської фармакопеї 6.4, монографія 2394 "Fresh Bilberry fruit dry extract, refined and standardised".

Фармакологічна модель *in vitro* з інгібування цитокінів

Людські моноцити протягом 24 год. при 37 °C в атмосфері з 5 %-ним вмістом CO₂ стимулюють ліпополісахаридом (10 нг/мл). Екстракти додають за 30 хв. до додавання ліпополісахариду з метою перевірити, чи здатні вони впливати на стимуляцію клітин ліпополісахаридом. Дію екстрактів досліджували при їх застосуванні в аналізованих концентраціях від 10 до 300 мкг/мл. Після закінчення 24 год. надосадкові розчини відбирали, центрифугували й аналізували на вміст у них PGE-2, IL-6, IL-1 і TNF- α , концентрацію яких визначали при цьому, використовуючи набори для твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA)/імуоферментного аналізу (EIA) (фірма Biotrend/фірма Immunotools) відповідно до інструкцій виробника.

Приклад 1: Водний порівняльний екстракт (рівень техніки)

2 кг рослинної сировини з листя рослини *Vitis vinifera*, підготовленої відповідно до європейської фармакопеї, піддають у перколяторі при 75 °C екстракційній обробці 24 л осмотичної води (води, очищеної зворотним осмосом). Елюат фільтрують і при зниженому тиску концентрують до згущеного екстракту з вмістом сухої речовини близько 50 %. Густий екстракт змішують із 4 % діоксиду кремнію й сушать у вакуумній сушильній шафі при 50 °C. Отриманий екстракт характеризується співвідношенням НРС/Е, що дорівнює 5:1, вмістом флавоноїдів 5,1 % і вмістом антоціанів 0,15 %.

Інгібування викиду [%]			
TNF- α	IL-1 β	IL-6	PGE-2
50,4 \pm 5,9	46,9 \pm 1,9	42,5 \pm 5,3	11,6 \pm 5,5
при 50 мкг/мл	при 300 мкг/мл	при 50 мкг/мл	при 300 мкг/мл

Приклад 2: Пропонований у винаході збагачений шляхом адсорбції екстракт (на водній основі)

2 кг рослинної сировини з листя рослини *Vitis vinifera*, підготовленої відповідно до європейської фармакопеї, піддають у перколяторі при 75 °С екстракційній обробці 44 л осмотичної води. Елюат при зниженому тиску концентрують до згущеного екстракту з вмістом сухої речовини близько 50 %. Густий екстракт зберігають у холоді протягом 16 год., після чого знову розбавляють осмотичною водою до вмісту сухої речовини 10 %. Після закінчення 24 год. дубильні речовини, що випали в осад (таніни) відфільтровують і потім розведений екстракт наносять на адсорбент XAD7HP. Насичений адсорбент промивають осмотичною водою, після чого компоненти екстракту елюють етанолом. Етанольну фазу упарюють до вмісту сухої речовини більше 50 %. Отриманий густий екстракт у природному вигляді сушать у вакуумній сушильній шафі при 50 °С. Отриманий екстракт характеризується співвідношенням НРС/Е, що дорівнює 19:1, вмістом флавоноїдів 21,1 % і вмістом антоціанів 0,77 %.

Цитокін	Інгібування викиду [%]	
	IL-6	PGE-2
Екстракт із прикладу 2	42,5±4,6	32,1±7,1
	при 10 мкг/мл	при 50 мкг/мл
Екстракт із прикладу 1	42,5±5,3	11,6±5,5
	при 50 мкг/мл	при 300 мкг/мл

В експериментах зі збагаченням шляхом адсорбції екстрактом із прикладу 2 вдалося виявити збільшення інгібування цитокінів у зіставленні з порівняльним екстрактом із прикладу 1, отриманим відомим з рівня техніки способом.

В експериментах з інгібування IL-6 необхідна в 5 разів менша концентрація пропонованого у винаході екстракту для досягнення такої ж протизапальної дії.

Вплив на PGE-2 виражений в ще більшому ступені. При використанні екстракту із прикладу 1 в аналізованій концентрації 300 мкг/мл вдалося досягти лише 11,6 %-ного інгібування. На відміну від цього при застосуванні пропонованого у винаході екстракту із прикладу 2 в 6 разів меншої концентрації, рівної 50 мкг/мл, досягалося навіть 32,1 %-е інгібування.

Ці обидва значення в 5 разів, відповідно в 18 разів (в 3 рази більше значення в %, помножене на коефіцієнт концентрації, що дорівнює 6) перевищують коефіцієнт збагачення, що дорівнює 3,8 і властивий пропонованому у винаході екстракту при його зіставленні з екстрактом із прикладу 1. Коефіцієнт збагачення, що дорівнює 3,8, являє собою частка від розподілу співвідношень НРС/Е в порівнюваних між собою екстрактах.

Приклад 3: Пропонований у винаході екстракт (зі збагаченням шляхом рідинно-рідинної екстракції)

2 кг рослинної сировини з листя рослини *Vitis vinifera*, підготовленої відповідно до європейської фармакопеї, піддають у перколяторі при 75 °С екстракційній обробці 44 л осмотичної води. Елюат при зниженому тиску концентрують до згущеного екстракту з вмістом сухої речовини близько 50 %. Густий екстракт зберігають у холоді протягом 16 год., після чого знову розбавляють осмотичною водою до вмісту сухої речовини 10 %. Після закінчення 24 год. танінову фракцію, що випала в осад відфільтровують і потім розведений екстракт двічі піддають екстракційній обробці н-бутанолом у співвідношенні 3:2. Бутанольну фазу упарюють до вмісту сухої речовини більше 50 %. Отриманий густий екстракт у природному вигляді сушать у вакуумній сушильній шафі при 50 °С. Отриманий екстракт характеризується співвідношенням НРС/Е, що дорівнює 16:1, вмістом флавоноїдів 21,7 % і вмістом антоціанів 0,43 %. Залишкова водна фаза характеризується співвідношенням НРС/Е, що дорівнює 5:1, вмістом флавоноїдів менше 0,1 % і вмістом антоціанів нижче межі виявлення.

	Інгібування викиду [%]		
	TNF- α	IL-1 β	PGE-2
ВуОН-фаза	52,2 \pm 6,7	55,8 \pm 6,6	24,3 \pm 3,9
Приклад 3А	при 10 мкг/мл	при 10 мкг/мл	при 50 мкг/мл
Н ₂ О-фаза	17,1 \pm 4,8	39,8 \pm 6,0	1,6 \pm 4,6
Приклад 3Б	при 50 мкг/мл	при 300 мкг/мл	при 300 мкг/мл

При порівнянні обох фаз, отриманих у результаті рідинно-рідинної обробки, з усією очевидністю виходить, що в органічній фазі (бутанолі) можливе підвищення концентрації протизапальних активних початків.

В експериментах з екстрактом із прикладу 3А, збагаченим шляхом екстракційної обробки бутанолом, вдалося виявити збільшення інгібування цитокінів у 15 разів (TNF- α), в 42 рази (IL-1/3) і в 91 раз (PGE-2) у зіставленні з відділеною водною фазою із прикладу 3Б.

При цьому коефіцієнт збагачення становить лише 3,2 (частка від розподілу співвідношень НРС/Е в порівнюваних між собою екстрактів із прикладу 3А і приклади 3Б).

Зазначене свідчить про вибіркове підвищення концентрації активних початків в органічній фазі в результаті їхнього переходу в неї з водної фази.

Пропонований у винаході екстракт із прикладу 3А перевершує також екстракт, отриманий відомим з рівня техніки способом.

Цитокін	Інгібування викиду [%]	
	TNF- α	PGE-2
Екстракт із прикладу 3А	52,2 \pm 6,7 при 10 мкг/мл	24,3 \pm 3,9 при 50 мкг/мл
Екстракт із прикладу 1	50,4 \pm 5,9 при 50 мкг/мл	11,6 \pm 5,5 при 300 мкг/мл

В експериментах з екстрактом із прикладу 3А вдалося виявити збільшення інгібування цитокінів у зіставленні з екстрактом із прикладу 1, отриманим відомим з рівня техніки способом.

В експериментах з інгібування TNF- α необхідна в 5 разів менша концентрація пропонованого у винаході екстракту із прикладу 3А для досягнення такої ж протизапальної дії.

Вплив на PGE-2 виражено в ще більшому ступені. При використанні екстракту із прикладу 1 в аналізованій концентрації 300 мкг/мл вдалося досягти лише 11,6 %-ного інгібування. На відміну від цього при застосуванні пропонованого у винаході екстракту із прикладу 3А в 6 разів меншої концентрації, рівної 50 мкг/мл, досягалось навіть 24,3 %-не інгібування.

Ці обидва значення в 5 разів, відповідно в 12 разів (в 2 рази більше значення в %, помножене на коефіцієнт концентрації, що дорівнює 6) перевищують коефіцієнт збагачення, що дорівнює 3,2 і властивий пропонованому у винаході екстракту при його зіставленні з екстрактом із прикладу 1. Коефіцієнт збагачення, що дорівнює 3,2, являє собою частку від ділення співвідношень НРС/Е в порівнюваних між собою екстрактів.

Приклад 4: Одержання пропонованого у винаході етанольного екстракту 2 кг рослинної сировини з листя рослини *Vitis vinifera*, підготовленої відповідно до європейської фармакопеї, піддають у перколяторі при 45 °С екстракційній обробці 24 л EtOH, узятому в кількості 40 про. %. Елюат фільтрують і потім при зниженому тиску концентрують до згущеного екстракту з вмістом сухої речовини близько 50 %. Густий екстракт зберігають у холоді протягом 16 год., після чого знову розбавляють осмотичною водою до вмісту сухої речовини 10 %. Після закінчення 24 год. дубильні речовини, що випали в осад, відфільтровують і потім з розведеного екстракту шляхом фільтрування через мембранний фільтр (з відсіченням по молекулярній масі 300 кДа) видаляють інші співекстраговані високомолекулярні речовини. Отриману в результаті фракцію (пермеат) до сухості сушать у вакуумі при 50 °С. Отриманий екстракт характеризується співвідношенням НРС/Е, що дорівнює 6,7:1, і вмістом флавоноїдів 7,6 %.

Приклад 5: Одержання пропонованого у винаході збагаченого шляхом адсорбції екстракту (на основі EtOH)

2 кг рослинної сировини з листя рослини *Vitis vinifera*, підготовленої відповідно до європейської фармакопеї, піддають у перколяторі при 75 °C екстракційній обробці 24 л EtOH, узятим у кількості 20 об. %. Елюат при зниженому тиску концентрують до згущеного екстракту з вмістом сухої речовини близько 50 %. Густий екстракт зберігають у холоді протягом 16 год., після чого знову розбавляють осмотичною водою до вмісту сухої речовини 10 %. Після закінчення 24 год. дубильні речовини, що випали в осад, відфільтровують і потім розведений екстракт наносять на адсорбент ХАД7НР. Насичений адсорбент промивають осмотичною водою, після чого компоненти екстракту елюють етанолом. Етанольну фазу упарюють до вмісту сухої речовини більше 50 %. Отриманий густий екстракт у природному вигляді сушать у вакуумній сушильній шафі при 50 °C. Отриманий екстракт характеризується співвідношенням НРС/Е, що дорівнює 21:1, і вмістом флавоноїдів 25,1 %.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Спосіб одержання екстракту з листя рослини *Vitis vinifera* L., який полягає в тому, що:

а) підготовляють рослинну сировину з листя рослини *Vitis vinifera* L.,

б) рослинну сировину піддають екстракційній обробці екстрагентом, вибраним з води й суміші води зі спиртом, з одержанням неочищеного екстракту,

в) неочищений екстракт відокремлюють від підданої екстракційній обробці рослинної сировини,

г) щонайменше частково видаляють екстрагент із одержанням згущеного екстракту,

д) згущений екстракт знову розчиняють у воді,

е) відокремлюють нерозчинні компоненти,

ж) вибірково підвищують концентрацію вторинних рослинних речовин шляхом двофазної екстракції.

2. Спосіб за п. 1, при здійсненні якого як екстрагент використовують воду або суміш води з етанолом з вмістом останнього в межах від 5 до 95 % (в об'ємному співвідношенні).

3. Спосіб за п. 1 або 2, при здійсненні якого екстрагент для екстракції нагрівають до температури в межах від 40 до 80 °C, переважно до температури, що на 15-25 °C нижче його температури кипіння.

4. Спосіб за одним з попередніх пунктів, при здійсненні якого двофазну екстракцію проводять у вигляді твердофазної екстракції.

5. Спосіб за п. 4, при здійсненні якого як другу фазу використовують адсорбуючу смолу, яку переважно вибирають із групи неіоногенних гідрофобних співполімерів дивінілбензолу, аліфатичних складних поліефірів і формофенольних полімерів.

6. Спосіб за одним з попередніх пунктів, при здійсненні якого двофазну екстракцію проводять у вигляді рідинно-рідинної екстракції.

7. Спосіб за п. 6, при здійсненні якого як другу фазу використовують нерідину, що змішується з водою, вибрану із групи спиртів, кетонів, алканів і складних ефірів.

8. Екстракт, отриманий способом за одним із пп. 1-7.

9. Екстракт за п. 8, у якому співвідношення між натуральною рослинною сировиною й екстрактом (НРС/Е) становить від 12:1 до 40:1, загальний вміст флавоноїдів становить щонайменше 15 мас. %, а вміст антоціанів становить щонайменше 0,1 мас. %.

10. Препарат-екстракт, що містить екстракт за п. 8 або 9, а також щонайменше одну фізіологічно сумісну допоміжну речовину.

11. Застосування екстракту за п. 8 або 9 або препарату-екстракту за п. 10 для приготування медикаментів, фармацевтичних композицій або харчових добавок.

12. Застосування екстракту за п. 8 або 9 або препарату-екстракту за п. 10 для лікування або профілактики запальних захворювань кровоносних судин, або шлунково-кишкового тракту, при порушенні венозної мікроциркуляції, при обумовлених ішемією захворюваннях, при гемороїдальній хворобі або при періанальному тромбозі.

13. Застосування за п. 12, при якому запальне захворювання кровоносних судин являє собою флебіт.

14. Застосування за п. 12, при якому порушення венозної мікроциркуляції являє собою хронічну венозну недостатність (ХВН).

15. Застосування за п. 12, при якому обумовлені ішемією захворювання являють собою захворювання серця, насамперед інфаркт міокарда.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601