



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84336 (13) C2
(51) МПК

A61K 36/483 (2006.01)

A61K 127/00 (2008.01)

A61P 1/16 (2008.01)

A61P 13/12 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ГІПОАЗОТЕМІЧНОЮ, ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ, АНТИОКСИДАНТНОЮ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

(21) а200612196

(22) 20.11.2006

(24) 10.10.2008

(46) 10.10.2008, Бюл.№ 19, 2008 р.

(72) ДЕМЕШКО ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА, UA,
КОВАЛЬОВ СЕРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA,
ЯКОВЛЄВА ЛАРИСА ВАСИЛІВНА, UA, ЧОРНА
НАТАЛІЯ СТЕПАНІВНА, UA, ФАЙЗУЛІН ОЛЕК-
САНДР ВАЛЕРІЙОВИЧ, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ, UA

(56) UA A1 48031, 15.08.2002.

UA A30879, 15.12.2000.

UA C2 44927, 15.03.2002.

UA A56771, 15.05.2003.

UA C2 76063, 15.06.2006.

2

Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник. За
ред. А.М. Гродзінського.-К.:Українська енциклопе-
дія, 1990.(57) Спосіб одержання комплексу біологічно акти-
вних речовин з гіпоазотемічною, гепатопротектор-
ною, антиоксидантною та протизапальною актив-
ністю шляхом екстракції подрібненої рослинної
сировини етанолом, упарювання до водного за-
лишку, очищення хлороформом з подальшим су-
шінням, який **відрізняється** тим, що як рослинну
сировину використовують листя робінії псевдоака-
ції, екстракцію здійснюють 12-кратною кількістю
29-31% етанолу протягом 13-15 годин, одержаний
після упарювання при температурі 65°C водний
залишок додатково відстоюють протягом 12 годин
і фільтрують, а очищення хлороформом здійсню-
ють при співвідношенні водного залишку та хло-
роформу як 2:1 в чотири етапи.

Винахід відноситься до фармації та медицини,
а саме до способів одержання біологічно активних
речовин з рослинної сировини.

До серйозних життєво небезпечних хвороб су-
часності можна віднести захворювання нирок та
печінки, зокрема ниркову недостатність.

За даними останнього дворічного періоду у
світі на 1млн. населення припадає до 173 випадків
гострої ниркової недостатності, яка становить від 7
до 23% від усіх випадків госпіталізації, і часто пе-
реходить у хронічну форму. Летальність при гост-
рій нирковій недостатності складає 50%. В людей
пожилого віку ниркові хвороби знаходяться на чет-
вертому місці серед головних причин смерті. При
консервативному медикаментозному лікуванні
захворювань нирок основні зусилля концентру-
ються на зниженні утворення кінцевих продуктів
білкового обміну та посиленні діуретичної функції
нирок. Такі якості поєднані в гіпоазотемічних пре-
паратах.

Захворювання печінки займають значне місце
(понад 40%) серед нозологічних форм, які відно-
сяться до патології травної системи. Це пов'язано
у першу чергу з загостренням екологічного стану,
ураженнями печінки при гострих отруєннях та ме-
дикаментозному впливу тощо.

Прогнозується збільшення зазначених захво-
рювань на 30%. В зв'язку з цим постає необхід-
ність створення гіпоазотемічних та гепатозахисних
засобів, які б мали досить виражену лікувально-
профілактичну дію і одночасно не справляли нега-
тивного впливу на функції життєво важливих орга-
нів і систем при тривалому їх вживанні. З цих по-
зицій представляють інтерес комплексні сумарні
фітопрепарати, які містять у концентрованому ви-
гляді біологічно активні речовини, що забезпечу-
ють специфічну дію на нирки, печінку і організм у
цілому.

Відомий спосіб одержання засобів, які мають
гіпоглікемічну активність [1]. Згідно з зазначеним

(13) C2

(11) 84336

(19) UA

способом подрібнену траву квасолі золотавої піддають екстракції 50% етанолом при співвідношенні сировини: екстрагент 1:8-1:10, одержаний екстракт упарюють до 1/18-1/20 попереднього об'єму, водний залишок очищують послідовно спиртом і хлористим метиленом.

До недоліків відомого способу можна віднести моноспрямовану фармакологічну активність кінцевого продукту та значні витрати етанолу внаслідок введення додаткової операції очищення екстракту спиртом.

За прототип вибраний спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин, що має гепатопротекторну дію [2]. Спосіб здійснюють шляхом екстрагування подрібненої сухої трави гороху посівного 10-кратною кількістю 49-51% етанолу протягом 11-12 годин. Одержаний екстракт упарюють до водного залишку, який очищують від речовин ліпофільної природи хлористим метиленом при співвідношенні водний залишок : хлористий метилен 3:4 з подальшим сушінням до сухого залишку.

Недоліком способу за прототипом можна вважати одержання кінцевого продукту з вузькоспрямованою фармакологічною дією та надмірні витрати хлористого метилена.

Завдання, що вирішується даним винаходом, полягає у створенні способу одержання комплексу біологічно активних речовин (БАР) з широким спектром фармакологічної активності, шляхом екстракції листя робінії псевдоакації етанолом при заявленій сукупності операцій і технологічних параметрів, що дозволяє одержати сухий екстракт з вираженою гіпоазотемічною, гепатопротекторною, антиоксидантною та протизапальною активністю, який може бути використаний при створенні нових засобів для лікування нирок та токсичних уражень печінки.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі одержання комплексу біологічно активних речовин з гіпоазотемічною, гепатопротекторною, антиоксидантною та протизапальною активністю, шляхом екстракції подрібненої рослинної сировини етанолом, упарювання до водного залишку, очищення хлороформом з подальшим сушінням, згідно з винаходом передбачено, що в якості рослинної сировини використовують листя робінії псевдоакації, екстракцію здійснюють 12-кратною кількістю 29-31% етанолу протягом 13-15 годин, одержаний після упарювання водний залишок додатково відстоюють і фільтрують, а очищення хлороформом здійснюють при співвідношенні водного залишку до хлороформу як 2:1.

Параметри заявленого способу визначені дослідним шляхом.

Вибір етанолу в якості екстрагента обумовлений його здатністю вилучити з листя робінії псевдоакації комплексу БАР з заданим спектром фармакологічної активності. При здійсненні серії експериментів з визначення концентрації етанолу було встановлено, що вичерпна екстракція необхідного комплексу БАР забезпечується 29-31% етанолом. При концентрації етанолу, нижчим за 29%, зменшується вихід екстрактивних речовин з сировини. Збільшення концентрації етанолу понад

31% недоцільне внаслідок забезпечення вичерпного екстрагування комплексу БАР з заданими властивостями етанолом у заявленому інтервалі концентрацій. Оптимальним екстрагентом є 30% етанол.

Визначені експериментальним шляхом такі ознаки, як кількісне співвідношення сировини до екстрагенту 1:12 (12-кратна кількість екстрагенту) та тривалість екстракції протягом 13-15 годин, є необхідними і достатніми для ефективного здійснення заявленого способу і одержання кінцевого продукту з очікуваними видами активності.

Очищення одержаного після упарювання екстракту у вигляді водного залишку здійснюється його послідовним відстоюванням, що призводить до осадження нерозчинної фракції, відокремлення осаду шляхом фільтрування та очищення хлороформом у співвідношенні водний залишок : хлороформ як 2:1. Експерименти показали, що саме така сукупність зазначених показників забезпечує достатній рівень чистоти кінцевого продукту.

Виявлений спосіб дозволяє за допомогою відомих операцій, але здійснених у заданій послідовності при заданих параметрах, одержати з листя робінії псевдоакації комплекс біологічно активних речовин, який має гіпоазотемічну, гепатопротекторну, антиоксидантну та протизапальну активність.

Спосіб здійснюється таким чином. Подрібнену до розміру часток 2,0-3,0мм сухе листя робінії псевдоакації екстрагують методом перколяції 12-кратною кількістю 29-31% етанолу протягом 13-15 годин. Одержаний екстракт упарюють під вакуумом при температурі 60-70°C до водного залишку, який охолоджують при кімнатній температурі та відстоюють в холодильнику на протязі 12 годин. Осад відфільтровують, а водний залишок очищують від речовин ліпофільної природи хлороформом у співвідношенні водний залишок - хлороформ 2:1 з подальшим сушінням до сухого залишку.

Одержують сухий екстракт листя робінії псевдоакації (акації білої) - гігроскопічний порошок від світло-коричневого до коричневого кольору.

Вихід готового продукту 7-9%.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1. 5кг подрібненого до 2,0-3,0мм сухого листя робінії псевдоакації екстрагують 60л 30% етанолу у перколяторі протягом 14 годин зі швидкістю збору екстракту 4л/год. Одержаний екстракт упарюють при температурі 65°C під вакуумом у вакуум-циркуляційному апараті при розрідженні 550мм рт. ст. до обсягу водного залишку 3,0л. Водний залишок після охолодження до кімнатної температури поміщують у холодильник на 12 годин, після чого осад відокремлюють. Обробку очищеного водного залишку хлороформом проводять в реакторі з мішалкою в 4 етапи, додаючи послідовно по 1,5л хлороформу на кожному етапі з подальшим перемішуванням протягом 10 хвилин і відстоюванням протягом 2 години на кожному етапі. Одержаний водний концентрат сушать у вакуум-сушильній шафі до отримання сухого екстракту.

Приклад 2. Гіпоазотемічну активність комплексу БАР з листя робінії псевдоакації, одержаного за

заявленим способом, вивчали на моделі гострої ниркової недостатності, викликаній хроматом калію. Дослід проводили на 24 білих безпородних щурах масою тіла 180-210г.

Гостру ниркову недостатність відтворювали шляхом підшкірного введення 2,5% розчину хромату калію у кількості 0,7мл/кг. Як препарат порівняння використовували препарат рослинного походження леспефлан. Тваринам після введення

хромату калію протягом тижня внутрішньошлунково вводили досліджувані препарати: комплекс БАР з листя робінії псевдоакації у дозі 0,005мл/кг, леспефлан - 2мл/кг. Щурам групи контрольної патології вводили відповідну кількість води. За контроль взято 6 здорових щурів. На 8 день експерименту в сироватці крові дослідних тварин визначали концентрацію креатиніну та сечовини. Результати експерименту наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Гіпоазотемічна активність комплексу БАР з листя робінії псевдоакації, одержаного за заявленим способом, на моделі гострої ниркової недостатності у щурів (n=6)

Показники	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Комплекс БАР робінії псевдоакації, 0,005 мл/кг	Леспефлан, 2мл/кг
Креатинін мкмоль/л	63,80±3,53	185,23±26,56*	102,68±7,50**	120,97±21,06**
Сечовина ммоль/л	4,13±0,12	23,72±2,48*	10,92±1,67**	14,38±3,51**

Примітки: 1. * - відхилення показника достовірне щодо інтактного контролю, $p < 0,05$;

2. ** - відхилення показника, достовірне щодо контрольної патології, $p < 0,05$;

3. n - кількість тварин у групі.

Аналіз результатів свідчить, що під впливом хромату калію у сироватці крові щурів рівень креатиніну і сечовини у порівнянні з інтактним контролем достовірно зріс на 190% і 474% відповідно. У групах тварин, яких лікували комплексом БАР з листя робінії псевдоакації та препаратом порівняння леспефлан рівень креатиніну достовірно знизився у порівнянні з контрольною патологією на 45% і 35% відповідно. Вміст сечовини у сироватці крові достовірно знизився під впливом комплексу БАР з листя робінії псевдоакації на 54%, а під впливом препарату леспефлан на 39%. Таким чином можна зробити висновок про виражену гіпоазотемічну дію комплексу БАР, одержаного за заявленим способом, який перевищує дію препарату порівняння леспефлан, що дає підставу рекомендувати його для використання його як засобу для лікування нирок.

Приклад 3. Гепатопротекторну активність комплексу БАР з листя робінії псевдоакації, одержаного за заявленим способом, вивчали на моделі гострого токсичного ураження печінки тетрахлорметаном. Досліди проводили на 36 білих щурах масою 0,18-0,25кг, розділених на 6 груп.

Для відтворення гострого токсичного ураження печінки тетрахлорметан вводили дослідним тваринам у вигляді 50% олійного розчину з розрахунку 0,8мг/100г маси тіла підшкірно протягом двох діб. Досліджуваний засіб і препарат порівняння силібор вводили тваринам за 1год. до і через 2год. після введення тетрахлорметану.

Тваринам 1-3 груп вводили комплекс БАР робінії псевдоакації відповідно у дозах 10мг/кг, 25мг/кг, 50мг/кг. Для порівняння активності досліджуваного екстракту використовували рослинний засіб гепатозахисної дії силібор, який вводили тваринам четвертої групи з розрахунку 25мг/кг при тих же умовах дослідів. П'ята група тварин, крім 50% олійного розчину тетрахлорметану, не одержувала нічого. Шостій групі не вводили ні гепатотропної отрути, ні препаратів, її використали для контролю нормального фізіологічного стану тварин.

Через 24год. після останнього введення тетрахлорметану були досліджені біохімічні та функціональні показники стану печінки дослідних тварин. Результати біохімічних показників крові наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив комплексу БАР листя робінії псевдоакації (КЛРП) на біохімічні показники стану печінки при гострому токсичному ураженні печінки тетрахлоретаном

Група тварин	Об'єкт дослідження	Номер тварини	Рівень продуктів ПОЛ, нмоль/мл	Активність аланінаміно-трансфери (АлАТ), мМоль/л-год.	Активність каталази, мгH ₂ O ₂ /мл крові	Лактатдегідрогеназа, мккат/л	Дієнові кон'югати, у.о./в 1мл
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Комплекс БАР, 10мг/кг	1	4,02	0,43	10,25	2,13	2,02
		2	3,78	0,49	10,33	2,00	2,12
		3	3,55	0,49	11,48	2,23	2,20

Продовження таблиці 2

Група тварин	Об'єкт дослідження	Номер тварини	Рівень продуктів ПОЛ, нмоль/мл	Активність аламінінаміно-трансферази (АлАТ), мМоль/л·год.	Активність каталази, мгH ₂ O ₂ /мл крові	Лактатдегідрогеназа, мккат/л	Дієнові кон'югати, у.о./в 1мл
		4	3,52	0,44	10,46	2,15	2,20
		5	3,62	0,45	10,67	2,32	2,34
		6	3,85	0,46	11,58	2,04	2,12
		сер.знач.	3,72	0,46	10,80	2,15	2,17
2.	Комплекс БАР, 25мг/кг	1	3,75	0,34	10,20	1,95	2,08
		2-і	3,46	0,32	10,13	2,13	2,25
		3	3,48	0,35	10,18	2,13	2,20
		4	3,22	0,33	10,17	2,01	2,12
		5	3,50	0,33	9,47	2,01	2,12
		6	3,72	0,34	11,12	2,15	2,38
		сер.знач.	3,52	0,34	10,21	2,06	2,19
3.	Комплекс БАР, 50мг/кг	1	3,01	0,20	12,80	1,87	1,45
		2	3,03	0,19	12,09	1,81	1,35
		3	2,68	0,20	11,61	1,68	1,32
		4	2,92	0,18	11,65	1,75	1,34
		5	2,75	0,20	11,84	1,68	1,46
		6	2,83	0,18	12,12	1,87	1,48
		сер.знач.	2,87	0,20	12,02	1,78	1,40
4.	Силібор	1	3,38	0,30	12,13	1,95	1,82
		2	2,98	0,34	11,12	1,75	1,64
		3	3,01	0,34	12,45	2,00	1,60
		4	2,89	0,31	12,25	1,81	1,76
		5	3,16	0,32	11,12	2,00	1,70
		6	3,19	0,32	11,25	1,89	1,68
		сер.знач.	3,10	0,32	11,72	1,90	1,70
5.	50% олійний р-н тетра-хлорметану	1	4,39	0,47	8,12	2,65	3,30
		2	4,86	0,53	7,68	2,78	3,02
		3	4,96	0,53	8,12	3,12	3,24
		4	4,92	0,53	7,35	2,92	3,38
		5	4,88	0,53	7,68	2,98	3,41
		6	4,52	0,53	7,47	2,92	3,18
		сер.знач.	4,76	0,52	7,74	2,90	3,26
6.	Інтактні тварини	1	2,57	0,17	11,90	1,84	1,52
		2	2,90	0,15	13,25	1,69	1,38
		3	2,98	0,16	12,20	1,90	1,49
		4	2,82	0,15	12,30	1,67	1,50
		5	2,80	0,17	11,20	1,67	1,36
		6	2,95	0,16	12,35	1,74	1,45
		сер.знач.	2,84	0,16	12,20	1,75	1,45

Результати досліджень показали, що введення тваринам тетрахлорметану призводить до ураження печінки, яке характеризується різким підвищенням рівня продуктів ПОЛ до 4,76нмоль/мл (у нормі 2,84нмоль/мл), дієнових кон'югатів до 3,26у.о./в 1мл (у нормі 1,45у.о./в 1мл), підвищенням активності АлАТ до 0,52мМоль/л·год (у нормі 0,16мМоль/л·год) і вмісту лактатдегідрогенази до 2,90мккат/л (у нормі 1,75мккат/л), а також зниженням активності каталази до 7,74мгH₂O₂/мл (в нормі 12,20мгH₂O₂/мл) у крові тварин. Одночасне введення гепатотропної отрути і комплексу БАР робінії псевдоакації у різних дозах неоднозначно впливає на зміни досліджуваних показників, які характеризують функціональний стан клітин печінки. Найбільшу ефективність за дослідженими показниками при гострому тетрахлорметановому

гепатиті виявляє комплекс БАР робінії псевдоакації в дозі 50мг/кг, що супроводжується доведенням показників до рівня інтактних тварин.

Наведені дані свідчать, що застосування комплексу БАР робінії псевдоакації, одержаного за заявленим способом, при гострому токсичному гепатиті значно зменшує патологічні зміни в тканині печінки, тобто проявляє виражену гепатопротекторну активність за рахунок зниження пероксидної оксидзації ліпідів і посилення антиоксидантного захисту. За гепатопротекторну активністю комплекс БАР робінії псевдоакації перевершує препарат порівняння силібор.

Приклад 4. Антиоксидантну активність комплексу БАР робінії псевдоакації, одержаного за заявленим способом, досліджували за співвідношенням відновленого глутатіону (ВГ) і ТБК-реактивів

у гомогенаті нирок щурів на моделі гострої ниркової недостатності, викликаній хроматом калію. Експеримент здійснювали за методом, аналогічним наведеному у прикладі 1, але зі зміною токсичної речовини на хромат калію. В якості препарату порівняння використаний леспефлан. Дані експерименту наведені у таблиці 3.

чної речовини на хромат калію. В якості препарату порівняння використаний леспефлан. Дані експерименту наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Антиоксидантна активність комплексу БАР робінії псевдоакації на моделі гострої ниркової недостатності у щурів

Показники	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Комплекс БАР 0,005мл/кг	Леспефлан 2мл/кг
ТБК-реактанти, мкмоль/г	214,36±22,76	127,14±11,51*	199,14±19,93	195,13±21,59
ВГ, мкмоль/г	2,70±0,24	3,98±0,69	10,31±1,86*/*/*	4,32±0,67*

Примітки:

1. * - відхилення показника достовірне щодо групи інтактного контролю, $p < 0,05$;
2. ** - відхилення вірогідне щодо групи контрольної патології, $p < 0,05$;
3. *** - відхилення вірогідне щодо групи порівняння леспефлан.

Аналіз даних табл. 3 показав, що на моделі гострої ниркової недостатності комплекс БАР робінії псевдоакації проявив виражену антиоксидантну активність, про що свідчить достовірне підвищення відновленого глутатіону у гомогенаті нирок дослідних тварин у порівнянні з групами інтактного контролю, контрольної патології та групою, яка одержувала препарат порівняння леспефлан. Про перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) у нирках свідчить вміст ТБК-реактивів. У даному випадку складна патологія призвела до виснаження субстрату ПОЛ, що викликала достовірне зниження рівня ТБК-реактивів у гомогенаті нирок у порівнянні з групою інтактного контролю. У групах тварин, які отримували досліджувані препарати зниження рівня ТБК-реактивів носило вірогідний характер.

Таким чином дані таблиці 3 свідчать про те, що комплекс БАР робінії псевдоакації більш ефективно впливає на перебіг стану гострої ниркової недостатності у щурів ніж препарат порівняння - леспефлан, тобто проявляє виражену антиоксидантну активність.

Приклад 5. Протизапальну активність комплексу БАР робінії псевдоакації, одержаного заявленим способом, вивчали на моделі набряку стопи щурів, викликаного субплантарним введенням 1% розчину карагеніну у дозі 0,1мл на тварину. Комплекс БАР робінії псевдоакації вводили у дозах 50, 100 та 200мг/кг. В якості препарату порівняння був використаний ортофен у дозі 8мг/кг. Комплекс БАР та препарат порівняння вводили внутрішньоступково за 1 годину до ін'єкції карагеніну.

Розвиток набряку оцінювали за різницею об'ємів лапи до і після ін'єкції карагеніну (ΔV). Протизапальну активність розраховували за формулою:

$$\frac{\Delta V_{\text{контр}} - \Delta V_{\text{досл}}}{\Delta V_{\text{контр}}};$$

де

$\Delta V_{\text{контр}}$ - різниця об'ємів лапи до та після введення карагеніну у контрольній групі тварин;

$\Delta V_{\text{досл}}$ - різниця об'ємів лапи до та після введення карагеніну у групі тварин, що отримували комплекс БАР робінії псевдоакації або ортофен. Результати дослідження наведено у таблиці 4.

Таблиця 4

Протизапальна активність комплексу БАР робінії псевдоакації у порівнянні з ортофеном

Показник	Контроль	Комплекс БАР робінії псевдоакації			Ортофен 8мг/кг
		50мг/кг	100мг/кг	200мг/кг	
ΔV	36,4±2,36	31,25±1,44	21,75±2,36	15,75±0,49	18,8±1,66
Протизапальна активність (%)	-	14,15	40,23	56,73	48,35

Отримані дані свідчать, що комплексу БАР робінії псевдоакації виявляє виражену протизапальну активність у дозах 100 та 200мг/кг.

Таким чином, заявлений новий спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з листя робінії псевдоакації, що має виражену гіпозотемічну, гепатопротекторну, антиоксидантну та протизапальну активність і може бути використаний в якості активної діючої речовини при створенні лікарських засобів аналогічного призначення, виготовлених у різних лікарських формах.

Комплекс біологічно активних речовин з листя робінії псевдоакації, одержаний за заявленим способом, практично нетоксичний (LD_{50} становить більше 15000мг/кг), не викликає алергічних реакцій та інші прояви негативної побічної дії на функції життєвоважливих органів.

Заявлений спосіб є економічним, передбачає використання екологічно безпечних реактивів, мо-

же бути здійснений в умовах стандартного хіміко-фармацевтичного виробництва зі стандартним обладнанням. Заявлений спосіб передбачає використання листя робінії псевдоакації у період листопаду, тобто найдешевшої, широко розповсюдженої вітчизняної сировини, не наносячи тим самим шкоди рослинним ресурсам.

Джерела інформації:

1. Деклараційний патент на винахід №48031 А, Україна, МПК 6 А61К35/78, з. №4387530, заявл. 03.03.1988, опубл. 15.08.2002, Бюл. №8.

2. Патент на винахід №30879, Україна, МПК 7 А61К35/78, А61К9/20, А61Р1/16, з. №98063104, заявл. 16.06.1998, опубл. 16.06.2003, Бюл. №6.