



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **103001**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 36/736 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 05835**

(22) Дата подання заявки: **15.06.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.11.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2015, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Кисличенко Вікторія Сергіївна (UA),
Ленчик Лариса Володимирівна (UA),
Наврузова Ганджина Фуркатівна (TJ),
Шарифов Хуршед Шералієвич (TJ),
Зайченко Ганна Володимирівна (UA),
Саїдов Нарзулло Бобоевич (TJ)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA),
Кисличенко Вікторія Сергіївна,
вул. Володарського, 47/17, м. Харків, 61093
(UA)**

(74) Представник:

**Лерантович Еліна Томашівна, реєстр.
№285**

(54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ З ІМУНОТРОПНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Лікарський засіб з імунотропною активністю містить екстракт з лікарських рослин. Як екстракт лікарських рослин використовують густий екстракт листя персика звичайного на 30 % спирті етиловому при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10.

UA 103001 U

Корисна модель належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме до фармакології, і стосується розробки засобів рослинного походження на основі біологічно-активних речовин з листя персика звичайного, що мають імунотропну і антиоксидантну активність.

Для профілактики та комплексного лікування хронічних і уповільнених захворювань, що превалюють в останні десятиліття у багатьох країнах, перспективними є пошук і розробка нових ефективних і малотоксичних лікарських засобів. Кількість імунокорегуючих препаратів дуже велика на даний момент, однак широке застосування синтетичних імуномодуляторів обмежене через наявність у них великої кількості побічних ефектів. В даний час все більше уваги дослідниками приділяється імунотропним препаратам рослинного походження, які завдяки наявності в них комплексу біологічно активних речовин м'яко впливають на організм, не викликають звикання і можуть застосовуватися в осіб з поєднаними патологіями.

Інтерес також представляють біологічно-активні речовини з листя персика звичайного.

Відомий імунотропний ліпосомальний препарат "Ковісцин" (пат. UA № 95901, A61K35/06. 12.01.2015, бюл. № 1), який містить вітаміни А, D3, Е, незамінну амінокислоту аргінін мікроелемент цинк, а також дистильовану воду, фосфоліпідний емульгатор в олії, селен та кобальт.

Відомий імуномодулюючий препарат (пат. UA № 92914, A23B 7/024, 10.09.2014, бюл. № 17), містить вітаміни А, D3, Е, амінокислоту аргінін, мікроелемент цинк, а також дистильовану воду, фосфоліпідний емульгатор в олії, додатково містить селен.

Недоліком існуючих препаратів є те, що це ветеринарні препарати, та в них короткотривала терапевтична дія і недостатня ефективність у місці введення.

Відомий імунотропний препарат (пат. RU № 2132689, A61K 35/64, 10.07.1999), що включає екстракт рослин родини айстрові, що містить 3-окси-флавоон-силібін 98-25 мас. %, монофлерний мед, який містить 3-окси-флавоон-силібін 35-1 мас. % і флавоноїдну фракцію березового прополісу.

Також відомі засоби, які мають протизапальну, антиоксидантну дію, на основі водних очищених концентрованих екстрактів з рослини очанки (патент RU №2308961), спиртової настоянки меліси (патент RU №2275931).

Існує засіб (пат. RU № 2 496 508, A61K 36/004, 10.06.2013 Бюл. № 16), що має імунотропну та антиоксидантну активність, який отримано шляхом екстрагування насіння Лотоса горіхоносного (*Nelumbo nucifera*) 50 %-ним етиловим спиртом, при певному співвідношенні компонентів. Вищеописаний засіб має виражену імунотропну і антиоксидантну дію.

Недоліками препарату є його неефективність при лікуванні пухлинних хворих.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення лікарського засобу з імунотропною активністю шляхом використання екстракту з лікарських рослин щоб забезпечити імунотропну активність, тобто підвищувати загальну резистентність організму, прискорювати процеси регенерації стала підставою для їх широкого застосування в комплексній терапії імунодефіцитних станів, інфекційних та інфекційно-запальних захворювань, при в'ялому перебігу регенераційних процесів, для покращання імунного стану в онкологічних хворих при цитостатичній терапії.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому лікарському засобі з імунотропною активністю, що містить екстракт з лікарських рослин, згідно корисної моделі як екстракт лікарських рослин використовують густий екстракт листя персика звичайного на 30 % спирті етиловому при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10.

Листя персика звичайного (*Persica vulgaris* mill) містять органічні кислоти, танін, каротиноїди і флавоноїди, в тому числі нарингенин, персикозид. Каротиноїди підвищують загальну опірність організму, сприяють регенерації тканин, інтенсифікують процес загоєння ран, стимулюють роботу імунної системи. Органічні кислоти з флавоноїдами мають антисептичну, бактерицидну і протизапальну дію, знижують інтоксикацію організму, заспокоюють біль, зменшують запальні процеси. Нарингенин і персикозид надають як пряму дію на пухлинні клітини, так і опосередковану. Танін володіє капіляророзміцнюючою, кровоспинною дією.

Експериментальним шляхом встановлено, що ефективним при здійсненні заявленої корисної моделі є використання співвідношення сировини до екстрагенту як 1:10-1:12. При цьому, якщо співвідношення менше 1:10, не забезпечується достатня екстракція БАР, що приводить до зниження фармакологічної активності та виходу цільового продукту. Навпаки, якщо співвідношення більше 1:12, це веде до ускладнення та подовження технологічного процесу, час упарювання та енерговитрати значно зростають. Оптимальне співвідношення 1:10-1:12 трічі тому, що забезпечується достатня екстракція БАР, час упарювання мінімальний, це дозволяє отримувати екстракт на стандартному обладнанні без додаткового перезавантаження первинної сировини.

Спосіб отримання густого екстракту листя персика звичайного полягає в наступному.

Сировину, у вигляді сухого листя персика подрібнюють. Далі подрібнене листя екстрагують 30 % розчином етанолу при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10, та настоювали протягом 2 годин при 80 °С, екстракцію повторювали тричі з новою порцією екстрагенту. Одержаний екстракт фільтрують, упарюють до 1/20-1/22 попереднього об'єму при температурі 85 °С під вакуумом у вакуум-циркуляційному апараті при розрідженні 690 мм рт.ст. до об'єму водного залишку 1 л, з подальшим відстоюванням на 2 доби у холодильнику, що забезпечує осадження механічних включень та гідрофобних речовин. Відстоювання в холодильнику також запобігає прокисанню водного екстракту. При більшому упарюванні залишок має більшу в'язкість та зменшується його текучість, що ускладнює роботу з екстрактом та збільшує його втрати в процесі виробництва. При меншому упарюванні значно подовжується процес сушки, та збільшуються енерговитрати.

Одержаний після упарювання екстракт стерилізують будь-яким зручним у промислових умовах способом, наприклад в автоклаві при 120 °С протягом 3 годин. Стерилізація забезпечує усунення мікробної контамінації та спор мікроорганізмів, що підвищує якість продукту, безпечність при його застосуванні та збільшує строк збереження.

Стерилізований екстракт сушать, наприклад, в вакуум-розпилювальному апараті при температурі на вході 160 °С та на виході 80-90 °С, до густого екстракту. Вихід готового продукту - 18,2 %.

Одержаний густий екстракт - в'язка маса від світло-коричневого до коричневого кольору, зі специфічним запахом. Колір залежить від якості сировини та умов сушки. Отриманий готовий екстракт містить не менше ніж: 10 % поліфенольних сполук в перерахунку на галову кислоту; 7 % гідроксикоричних кислот в перерахунку на хлорогенову кислоту; 5 % флавоноїдних сполук в перерахунку на рутин.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. 1 кг подрібненого шляхом вальцювання до розмірів часток 2,5-3,0 мм сухого листя персика звичайного заливали 10 л 30 % розчину етанолу та настоювали протягом 2 годин при 80 °С, екстракцію повторювали тричі з новою порцією екстрагенту. Одержані спиртові (26,95 л) витяги упарювали при температурі 85 °С під вакуумом у вакуум-циркуляційному апараті при розрідженні 690 мм рт.ст. до об'єму водного залишку 1 л. Кубовий залишок являв собою густу прозору темно-коричневу рідину, яку залишали для відстоювання на 2 доби в холодильнику. Відокремлену надосадову рідину стерилізували та сушили у вакуум-циркуляційному апараті при розрідженні 690 мм рт.ст. до густого екстракту. Вихід готового продукту - 18,2 %.

Приклад 2. Вивчення імуноотропної активності.

Для аналізу використовували 20 мг густого екстракту персика, який розчиняли у 10 мл (2 мг/мл - більша доза) або 50 мл (0,4 мг/мл - менша доза) розчину Хенкса без індикаторів і стерилізували пропусканням крізь фільтр Millipore. Тест-зразки зберігали при t 40 °С у холодильнику не більше 3-х суток.

Для визначення впливу тест-зразків з екстрактом персика на життєздатність імунокомпетентних клітин у дослідях in vitro використовували клітини глоткової мигдалини дітей, отримані після операції аденотомії. Клітини отримували у відповідності до методичних рекомендацій (Мельников О.Ф., 1981), культивували у живильному середовищі 199 з вмістом глутаміна 290 мкг/мл і гентаміцина 40 мкг/мл. У пробі з трипановим синім розраховували відносне число загиблих клітин (виражене у %) до початку інкубації (1 година при t 370 °С) і після інкубації. Поставлено 5 серій дослідів. Екстракт з листя персика звичайного виявляє імуномодельюючу дію (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив різних доз густого екстракту персика на життєздатність імунокомпетентних клітин мигдалин

№ серії досліджу	Контроль	Екстракт персика 2 мг/мл	Екстракт персика 0,4 мг/мл
	Кількість загинув, клітин, %		
Серія 1	6-11	7-13	6-11
Серія 2	11-13	10-15	10-12
Серія 3	6-12	6-16	6-12
Серія 4	8-11	7-14	8-10
Серія 5	9-14	9-17	9-15

Примітки: перша цифра позначає відносне число клітин. (%), пофарбованих у синій колір, друга - після нього.

Приклад 3. Вплив тест-зразків з густим екстрактом персика на вміст імуноглобулінів IgA вивчали методом радіальної імунодифузії в гелі. Для цього 0,1 мл тест-зразків змішували з 0,1 мл стандартної сироватки людини, що містила в 1 мл 2 г/л IgA, після чого інкубували в стерильних умовах протягом 16-и годин. У першій контрольній пробі замість тест-зразків з густим екстрактом персика застосовували еквівалентну кількість розчину глюкози, у другій контрольній пробі використали розчин Хенкса. Імуностимулююча активність екстракту персика більш виражена в низькій концентрації 0.4 мг / мл, ніж в високій - 2 мг / мл (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст імуноглобуліну IgA після інкубації з різними концентраціями екстракту персика густого, г/мл

№ серії досліджу	Контроль 1 (розчин глюкози)	Контроль 2 (розчин Хенкса)	Екстракт персика густий 2мг/мл	Екстракт персика густий 0,4 мг/мл
Серія 1	0,90	0,80	0,75	1,00
Серія 2	0,95	0,76	0,72	1,00
Серія 3	0,88	0,78	0,80	0,95
Серія 4	0,90	0,90	0,70	0,90
Серія 5	0,95	0,87	0,85	0,95

Приклад 4. Вплив тест зразків з екстрактом персика густим на експресію поверхневих антигенів за кластерами диференціації (CD) вивчали після інкубації еритроцитів з екстрактом персика в концентрації 0,4 мг/мл протягом 16-й годин в культурі in vitro з використанням методу розеток. Метод заснований на тому, що формалінізовані еритроцити, покриті відповідними моноклональними антитілами, формують розетку навколо лімфоцита з певним CD-фенотипом, які легко підраховуються в світловому мікроскопі. Показник виражається у відносній кількості (у %) клітин даного фенотипу на 100 лімфоцитів. Використовували такі маркери: CD4 (Т-лімфоцити - хелпери), CD 16 (NK - натуральні кілери), CD25 (активовані лімфоцити), CD95 (клітини з маркером апоптозу).

Екстракт персика густий суттєво не впливав на експресію поверхневих антигенів лімфоцитів (табл. 3).

Таблиця 3

Вміст лімфоцитів певного фенотипу (CD) після інкубації з екстрактом персика густим в дозі 0,4 мг / мл

№ досліду	Вміст клітин з маркерами CD, %							
	К CD4	CD4+ ЭП	К CD25	CD25+ ЭП	К CD16	CD 16+ ЭП	К CD 95	CD95+ЭП
1	36	36	11	19	14	12	10	17
2	31	37	13	11	17	18	12	15
3	22	26	14	13	15	19	12	11
4	19	22	14	17	17	22	6	10

Примітка. К - контроль (відносне число клітин у вихідній суспензії до інкубації).

Приклад 5. Вплив екстракту персика густого на активність тканинних природних цитотоксичних клітин (ЕЦК) досліджували методом спектрофотометричної реєстрації цитолиза по виходу гемоглобіну з еритроцитів курчат. Клітини мигдалин отримували за методом, описаним вище. Співвідношення ефектор / мішень становило 5:1, час інкубації -16 годин. Середовищем для культивування був обраний збагачений безбарвний розчин Хенкса (2 % ембріональна теляча сироватка, виробництва компанії Serva; концентрат незамінних амінокислот, виробництва компанії Sigma; гентаміцин 40 мкг / мл). Дослідження проводили з використанням імуноферментного аналізатора Stat Fax 2100 (США). У попередніх дослідках велика концентрація екстракту персика гнітила активність ЕЦК, тому експеримент проводили тільки з малою дозою екстракту персика густого (0.4 мг / мл). Встановлено, що екстракт персика має помірно виражену стимулюючу дію відносно факторів вродженого імунітету (посилення природної цитотоксичності). Результати дослідів представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

Вплив екстракту персика на активність ЕЦК (% деструкції мішеней)

№ серії	Контроль	Екстракт персика 0,4 мг/мл густий
Серія 1	2,4	5,2
Серія 2	0,3	3,1
Серія 3	0,9	6,2
Серія 4	0,3	3,8
Серія 5	2,9	6,2

Екстракт персика густий має помірно виражену стимулюючу дію як відносно факторів вродженого (посилення природної цитотоксичності), так набутого імунітету (посилення антитілоутворення) в тестах in vitro. Імуностимулююча активність екстракту персика густого більш виражена в низькій концентрації 0,4 мг / мл, ніж у високій - 2 мг / мл.

Таким чином заявлений новий лікарський засіб з імуноотропною активністю відзначається рядом переваг:

1) простота виконання та можливість здійснення на стандартному обладнанні в промислових умовах України;

2) використання як екстрагента 30 % розчину етанолу, тобто спосіб доступний, екологічно безпечний, дешевий, такий що не вимагає роботи з отруйними, вогненебезпечними й шкідливими для здоров'я людини реактивами;

3) використання як сировини листя персика звичайного, який широко культивується в Україні, що дозволяє більш раціонально використовувати природні ресурси;

4) наявність імуноотропної активності густого екстракту з листя персика звичайного;

5) перспективність використання одержаного екстракту як лікарської субстанції для одержання різних лікарських форм;

6) тривалий термін зберігання засобу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Лікарський засіб з імуноотропною активністю, що містить екстракт з лікарських рослин, який **відрізняється** тим, що як екстракт лікарських рослин використовують густий екстракт листя персика звичайного на 30 % спирті етиловому при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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