



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **136235** (13) **U**  
(51) МПК (2019.01)  
**A61K 36/74** (2006.01)  
A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2019 01943</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>26.02.2019</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>12.08.2019</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.08.2019, Бюл.№ 15</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Шинковенко Ігор Леонідович (UA), Ільїна Тетяна Василівна (UA), Кашпур Наталія Валеріївна (UA), Ковальова Алла Михайлівна (UA), Комісаренко Андрій Миколайович (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</b></p>
--	--

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ ІМУНОМОДУЛЮЮЧОЇ ДІЇ З ТРАВИ ПІДМАРЕННИКА ЧІПКОГО**

**(57) Реферат:**

Спосіб одержання засобу з імуномодулюючою дією шляхом екстракції рослинної сировини водою дистильованою. Як рослинну сировину використовують траву підмаренника чіпкого (*Galium aparine* L.). Екстракцію здійснюють при нагріванні на водяній бані при загальному співвідношенні сировина: екстрагент - 1:10, тричі по 30 хвилин. Об'єднують зливи і концентрують під вакуумом до співвідношення сировина - готовий продукт 1:1.

**UA 136235 U**



Корисна модель належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме до способів одержання з рослинної сировини біологічно активних комплексів з імуномодулюючою активністю, які можуть бути використані як активні субстанції при створенні лікарських препаратів зазначеної фармакологічної активності у різних лікарських формах.

5 В умовах постійного впливу на організм людини несприятливих екологічних чинників пошук високоефективних препаратів для підвищення імунітету стає дедалі актуальнішим. Донедавна арсенал засобів для підвищення стійкості організму, імуностимуляції та коригування окремих імунодефіцитних станів був досить обмеженим: у клініці інфекційних захворювань застосовувались вакцини, для загальної інтенсифікації обмінних процесів - вітаміни, при аутоімунних захворюваннях - гормональні препарати, при анеміях - сполуки заліза, арсен або вітаміни, при лейкопенії - деякі синтетичні препарати.

10 Найбільш перспективними засобами є препарати природного, зокрема рослинного, походження порівняно із сполукам хімічного синтезу: внаслідок спорідненості метаболічних процесів в живих організмах, а також зменшенні числа обмежень та побічної дії при використанні. Препарати рослинного походження можуть виступати у ролі загальних адаптогенів, що значно підвищують неспецифічну резистентність організму до більшості негативних чинників.

15 На фармацевтичному ринку України імуномодуляторів рослинного походження нараховується незначна кількість. Тому актуальним для медицини та фармації є пошук та розробка вітчизняних ефективних лікарських засобів рослинного походження з імуномодулюючою дією.

20 Відомий спосіб отримання лікувально-профілактичного, імуностимулюючого фітозасобу [1] у формі гранул, який містить кислоту аскорбінову, метилцелюлозу, сорбіт, ліофілізований фітоекстракт скумпії звичайної, ліофілізований фітоекстракт бадану товстолистого, ліофілізований фітоекстракт конюшини лучної, сахарин.

25 До недоліків способу можна віднести складність, багатостадійність, потребу у спеціальному обладнанні.

Відомий спосіб одержання протизапального, імуностимулюючого лікарського засобу на рослинній основі [2], що містить витяг з суміші лікарських рослин - листя ліщини звичайної, коренів шипшини коричневої чи шипшини майської, коренів лопуха великого, трави споришу, трави золотарника канадського, квіток нагідок лікарських, кореневища з коренями оману високого у співвідношенні 2:2:2:1:1:1:1. Як витяг з суміші лікарських рослин використовують рідкий екстракт з суміші лікарських рослин на 70 % етиловому спирті при співвідношенні сировини до екстрагенту 30 1:1 або настойку з суміші лікарських рослин на 70 % етиловому спирті при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10.

30 До недоліків способу можна віднести складність, потребу у спеціальному обладнанні, використання у якості розчинника спирту етилового, вартість якого постійно зростає.

Відомий спосіб комплексної переробки рослинної сировини [3] для отримання засобу з імуномодулюючою дією шляхом попередньої багаторазової послідовної обробки трави маренки восьмилісткової хлороформом, сумішшю етилацетат: спирт (8:2) та водою; екстракцію хлороформом здійснюють при загальному співвідношенні сировина: екстрагент - 1:8-1:10, етилацетатноспиртовою сумішшю (8:2) при загальному співвідношенні сировина: екстрагент - 1:10-1:12, водою - при загальному співвідношенні сировина: екстрагент - 1:4-1:5, тричі по 30 хвилин, а потім здійснюють видалення білково-полісахаридного комплексу при загальному співвідношенні водний витяг: 96 % етанол - 1:3 та упарювання отриманого фільтрату до видалення екстрагенту.

40 До недоліків способу можна віднести його трудомісткість, багатостадійність та довготривалість. Спосіб потребує додаткових енергозатрат та використання різних органічних розчинників, що не завжди економічно доцільно.

50 Відомий спосіб одержання засобу з імуномодулюючою дією [4] шляхом екстракції трави підмаренника справжнього (*Galium verum* L.) 96 % спиртом етиловим при нагріванні на водяній бані при загальному співвідношенні сировина: екстрагент - 1:10, тричі по 30 хвилин, потім об'єднують зливи і концентрують під вакуумом до співвідношення сировина - готовий продукт 1:1.

55 До недоліків способу можна віднести його дорожнечу, оскільки ціна на спирт етиловий постійно зростає.

Задачею корисної моделі є створення способу одержання засобу з імуномодулюючою дією, який, дозволяє одержати субстанцію з вираженою фармакологічною дією, на основі якої може бути створений ряд фармацевтичних засобів у різних лікарських формах, придатних до

ефективного та безпечного тривалого вживання з лікувально-профілактичною для пацієнтів різних вікових груп.

Поставлена задача вирішується завдяки використанню як рослинної сировини - трави підмаренника чіпкого (*Galium aparine* L.) і проведення екстракції водою дистильованою, екстракцію здійснюють при нагріванні на водяній бані при загальному співвідношенні сировина: екстрагент - 1:10, тричі по 30 хвилин, потім об'єднують зливи і концентрують під вакуумом до співвідношення сировина - готовий продукт 1:1.

Корисною моделлю передбачено, що як рослинна сировина використовується трава підмаренника чіпкого. Підмаренник чіпкий (*Galium aparine* L.) - багаторічна трав'яниста рослина родини маренові (*Rubiaceae*), широко використовується у народній медицині з лікувальною метою.

Заявлений спосіб дозволяє вилучити з трави підмаренника чіпкого біологічно активні речовини, які мають невідому досі для даної сировини імуностимулюючу дію, вперше досліджену авторами.

Усі параметри заявленого способу визначено експериментальним шляхом з урахуванням біологічної активності одержаного засобу, ефективності, доступності та нешкідливості реактивів, практичного відтворення способу у промислових умовах. Сукупність ознак заявленого способу є новою, невідомою із джерел інформації.

Експериментальним шляхом встановлено, що доцільним при здійсненні заявленого способу є використання трикратної екстракції сировини водою дистильованою, співвідношення сировини до екстрагента 1:10 та концентрування витягу до співвідношення сировина - готовий продукт 1:1. При цьому, якщо співвідношення менше 1:10, то не забезпечується достатня екстракція БАР, що призводить до зниження фармакологічної активності та виходу цільового продукту. Якщо співвідношення більше 1:10, то це призводить до ускладнення та подовження технологічного процесу, збільшення енерговитрат.

Корисну модель здійснюють наступним чином: заготовлену у фазі цвітіння подрібнену траву підмаренника чіпкого поміщають у екстрактор, заливають водою дистильованою при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:10 і екстрагують настоюванням на киплячій водяній бані з використанням зворотного холодильника. Одержаний екстракт (при співвідношенні сировина: екстрагент 1:10) зливають, а сировину ще двічі екстрагують за аналогічних умов. Екстракти об'єднують і концентрують у вакуумі до співвідношення сировина - готовий продукт 1:1.

Отримана субстанція являє собою темно-брунатну рідину, яка містить 9,63 % полісахаридів, 1,87 % гідроксикоричних кислот та 0,26 % флавоноїдів. Цільовий вихід продукту складає 1 кг, або 100 %.

У результаті здійснення запропонованого способу одержують субстанцію рослинного походження з імуномодулюючою дією, нетоксичну, придатну до тривалого застосування.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. 1,0 кг заготовленої у фазу цвітіння і подрібненої трави підмаренника чіпкого завантажували у екстрактор, заливали 10,0 л води дистильованої та настоювали на киплячій водяній бані з використанням зворотного холодильника протягом 30 хвилин. Одержаний екстракт зливали. Сировину ще двічі заливали по 10,0 л води дистильованої та проводили екстракцію у тих же умовах. Зливи об'єднували і концентрували на роторно-вакуумному апараті до 1 кг.

Вихід екстракту трави підмаренника чіпкого склав 1 кг, або 100 %.

Приклад 2. Імуномодулюючу дію субстанції з трави підмаренника чіпкого, одержаного за запропонованим способом, вивчали *in vitro* шляхом вивчення їх впливу на функціональну активність лімфоцитів в реакції бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) [5-8].

Як матеріал для тестування субстанцій використовували мононуклеарні клітини (лімфоцити), які були вилучені з венозної гепаринізованої крові шляхом центрифугування з використанням градієнта щільності фіколл-верографіна (щільність 1,077 г/мл), як описано за стандартною методикою [5, 6]. Отримані клітини культивували в середовищі 199, яке було доповнене 10 % розчином ембріональної телячої сироватки, 2 мл L-глутаміну, 100 мкг/мл гентаміцину. Суспензію (1млн. клітин в 1 мл культурального середовища з додаванням субстанцій) інкубували протягом 15-18 годин в термостаті при 37 °С, з 5 % CO<sub>2</sub>, в атмосфері насиченої водяної пари. Перед постановкою РБТЛ готували розведення екстракту, одержаного за заявленим способом, у співвідношеннях 1/10, 1/20 та 1/200. По 100 мкл розведених субстанцій вносили до 100 мкл первинних культур імунокомпетентних клітин.

Інтенсивність проліферативної реакції оцінювали за показниками активації синтезу ДНК, яка фіксувалася шляхом обробки зразків моноклональними антитілами до білку S-періоду

клітинного мітотичного циклу - бромдеоксіурідин (BrdU) Antibody (3H579) концентрацією 100 мг/мл (Santa Cruz Biotechnology). Після остаточної підготовки зразків для постановки проточно-цитометричного аналізу з використанням флуоресцентного детектора отримали числові данні загальної кількості клітин та відсоток бластних форм у зразках. Як контроль використовували стимуляцію одного із зразків мітогеном ФГА в концентрації 2,5 мкг/мл. Експеримент містив постановку реакції РБТЛ без додавання дослідних субстанцій (спонтанна бластна трансформація). Одержані показники статистично обробляли за допомогою програми "Microsoft Excel" [8].

Результати досліджень наведено в таблиці.

Таблиця

Вплив субстанцій *Galium aparine* L. на показники бластної трансформації лімфоцитів ( $X \pm m$ ,  $n=5$ )

Субстанції	Розведення екстракту	РБТЛ, (%)
Екстракт	1/200	60,8±3,2*
	1/20	65,5±3,3*
	1/10	61,6±3,5*
Контроль (ФГА)	-	48,1±2,1
Спонтанна	-	8,5±0,7

Примітка: \* -  $P < 0,05$  у порівнянні до показника контролю.

Аналіз результатів дослідження свідчить, що одержаний за запропонованим способом екстракт з трави підмаренника чіпкого значною мірою стимулює трансформаційну активацію мононуклеарних клітин периферичної крові. При використанні 100 мкл досліджуваної субстанції в розведенні 1/20 відзначається максимальна стимуляція трансформаційної активації імункомпетентних клітин. Так, екстракт *Galium aparine* у розведенні 1/20 збільшив трансформаційну активацію мононуклеарів на 57,0 % у порівнянні з інтактним контролем (спонтанною бластною трансформацією) та на 17,4 % у порівнянні з ФГА. При розведенні 1/10 отриманий екстракт збільшує трансформаційну активацію мононуклеарів на 53,1 % у порівнянні з інтактним контролем та на 13,5 % у порівнянні з ФГА. Навіть при розведенні 1/200 отриманий за заявленим способом екстракт збільшує трансформаційну активацію мононуклеарів на 52,3 % у порівнянні з інтактним контролем та на 12,7 % у порівнянні з ФГА. Таким чином екстракт підмаренника чіпкого проявляє дозозалежну стимулюючу дію на трансформаційну активацію мононуклеарних клітин периферичної крові.

Отже, запропоновано спосіб отримання імуномодельючого засобу з трави підмаренника чіпкого шляхом екстракції рослинної сировини водою дистильованою. Запропонований спосіб простий, економічний, є екологічно безпечним і може бути здійснений на будь-якому фармацевтичному підприємстві зі стандартним обладнанням.

Комплекс БАР з трави підмаренника чіпкого, одержаний за запропонованим способом, виявляє виражену імуномодельючу дію, є практично нетоксичним і може бути використаний як лікарська субстанція при створенні лікарських засобів зазначеної дії.

Джерела інформації:

1. Патент України № 39766, МПК (2009) А61К 6/00, А61К 9/16 (2006.01). Лікувально-профілактичний, імуностимулюючий фітозасіб у формі гранул. - з. № у 200812078, заявл. 13.10.2008, опубл. 10.03.2009, бюл. № 5.

2. Патент України № 98083, МПК (2015.01) А61К 36/00. Протизапальний, імуностимулюючий засіб на рослинній основі. - з. № у 201413306, заявл. 11.12.2014, опубл. 10.04.2015, бюл. №7.

3. Патент України № 100292, МПК А61К 36/74 (2006.01) А61Р 37/04. Спосіб комплексної переробки трави маренки восьмилистокової для отримання засобу з імуномодулюючою дією. - з. № у 201412603, заявл. 24.11.14., опубл. 27.07.2015, бюл. № 14.

4. Патент України № 120554, МПК А61К 36/74 (2006.01) А61Р 37/02 (2006.01). Спосіб отримання засобу імуностимулюючої дії з трави підмаренника справжнього. - з. № у 201704409, заявл. 03.05.17., опубл. 10.11.2017, бюл. № 21.

5. Киселева Е. П. Использование микрометода для бласттрансформации лимфоцитов человека и животных / Е. П. Киселева, А. С. Цвейбах, Е. И. Гольдман, Н. В. Пигарева // Иммунология. - 1985. - № 1. - С.76-78.

6. Никитин В. М. Справочник методов иммунологии / В. М. Никитин // Кишинев: Штинца. - 1982. - 304 с.

7. Патент України № 105324, МПК G01N 21/00. Спосіб оцінки функціональної активності лімфоцитів за допомогою біоаналізатора Agilent 2100 / ДУ "ІМІ НАМН". - № u 201509727; заявл. 07.10.2015; опубл. 10.03.2016. Бюл. № 5.

5 8. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н.Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич // Киев: Морион. - 2000. - 320 с.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10 Спосіб одержання засобу з імуномодулюючою дією шляхом екстракції рослинної сировини водою дистильованою, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують траву підмаренника чіпкого (*Galium aparine* L.), екстракцію здійснюють при нагріванні на водяній бані при загальному співвідношенні сировини: екстрагент - 1:10, тричі по 30 хвилин, потім об'єднують зливи і концентрують під вакуумом до співвідношення сировини - готовий продукт 1:1.

15

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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