



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **145703** (13) **U**  
(51) МПК (2021.01)  
**A61K 36/73** (2006.01)  
A61P 37/00  
**A61K 135/00** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

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

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2020 05174</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>11.08.2020</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>29.12.2020</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>28.12.2020, Бюл.№ 24</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Комісаренко Микола Андрійович (UA), Упир Тарас Володимирович (UA), Комісаренко Андрій Миколаєвич (UA), Ленчик Лариса Володимирівна (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA), Ковальова Алла Михайлівна (UA), Поліщук Іван Миколайович (UA), Осолодченко Тетяна Павлівна (UA), Ільїна Тетяна Василівна (UA), Пономаренко Світлана Володимирівна (UA)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>Комісаренко Микола Андрійович, вул. Чкалова, 39, кв. 2, м. Харків, 61076 (UA)</b></p>
---	--

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ ІМУНОМОДУЛЮЮЧОЇ ДІЇ З ПЛОДІВ МАЛИНИ ЗВИЧАЙНОЇ**

**(57) Реферат:**

Способі одержання засобу з імуномодулюючою дією шляхом екстракції рослинної сировини спиртом етиловим 96 %, як рослинну сировину використовують плоди малини звичайної (*Rubus idaeus* L.), екстракцію здійснюють настоюванням при кімнатній температурі, при загальному співвідношенні сировина:екстрагент - 1:10, тричі по 24 години, потім об'єднують зливи і концентрують під вакуумом до співвідношення сировина-готовий продукт 1:1.

**UA 145703 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 сполуками 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, згідно з корисною моделлю, додатково містить 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 витяжку з суміші лікарських рослин - листя ліщини звичайної, коренів шипшини коричневої чи шипшини травневої, коренів лопуха великого, трави споришу, трави золотушника канадського, квіток нагідок лікарських, кореневища з коренями оману високого у співвідношенні 2:2:2:1:1:1:1. Екстракт отримують з суміші лікарських рослин на 70 % етиловому спирті при співвідношенні сировини і екстрагенту - 1:1 або настойку з суміші лікарських рослин на 70 % етиловому спирті при співвідношенні сировини і екстрагенту - 1:10.

35 До недоліків способу можна віднести складність, багатокомпонентність.

Відомий спосіб комплексної переробки рослинної сировини [3] для отримання засобу з імуномодулюючою дією шляхом попередньої багаторазової послідовної обробки трави маренки восьмилистої хлороформом, сумішшю етилацетат:спирт (8:2) та водою; екстракцію хлороформом здійснюють при загальному співвідношенні сировина:екстрагент - 1:8-1:10, етилацетатно-спиртовою 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 водна витяжка:96 % етанол - 1:3 та упарювання отриманого фільтрату до видалення екстрагенту.

45 До недоліків способу можна віднести його трудомісткість, багато стадійність та довго тривалість. Спосіб потребує додаткових енергозатрат і використання різних органічних розчинників, що не завжди економічно доцільно та шкідливо при виробництві.

Задачею корисної моделі є створення способу одержання засобу з імуномодулюючою дією, який, завдяки використанню як рослинної сировини плодів малини звичайної (*Rubus idaeus* L.) і проведенню екстракції спиртом етиловим 96 %, 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 метою.

55 Поставлена задача вирішується завдяки тому, що у способі одержання засобу з імуномодулюючою дією шляхом екстракції рослинної сировини спиртом етиловим 96 %, згідно з корисною моделлю, як сировину використовують плоди малини звичайної (*Rubus idaeus* L.), екстракцію здійснюють при загальному співвідношенні сировина:екстрагент - 1:10, тричі протягом доби, потім об'єднують зливи і концентрують під вакуумом до співвідношення сировина-готовий продукт - 1:1.

Корисною моделлю передбачено, що як рослинна сировина використовується плоди малини звичайної. Малина звичайна (*Rubus idaeus* L.) - квіткова рослина родини Розові (*Rosaceae*), що використовується у народній медицині з лікувальною метою. Малина звичайна широко поширена в Україні як дикоросла рослина, а також культивується.

5 Заявлений спосіб дозволяє вилучити з плодів малини звичайної 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.

10 Експериментальним шляхом встановлено, що доцільним при здійсненні заявленого способу є використання трикратної екстракції сировини спиртом етиловим 96 %, за співвідношення сировина:екстрагент - 1:10 та концентрування витяжки 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.

20 Корисну модель здійснюють наступним чином: висушені до повітряно-сухого стану, плоди малини звичайної поміщають у екстрактор, заливають спиртом етиловим 96 % при загальному співвідношенні сировина:екстрагент - 1:10 і екстрагують методом настоювання протягом 24 год. Одержаний екстракт зливають, а сировину ще двічі екстрагують за аналогічних умов. Екстракти об'єднують і концентрують під вакуумом до співвідношення сировина-готовий продукт - 1:1.

Отримана субстанція являє собою густу темно-червону рідину.

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

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1

30 1,0 кг висушених плодів малини у екстрактор, заливали 10,0 л спиртом етиловим 96 % та настоювали протягом 24 годин. Одержаний екстракт зливали. Сировину ще двічі заливали по 10,0 л 96 % етанолу та проводили екстракцію у тих же умовах. Зливи об'єднували і концентрували на роторно-вакуумному апараті до 1 кг.

Вихід екстракту плодів малини звичайної склав 1 кг, або 100 %.

Приклад 2

35 Імуномодулюючу дію субстанції з плодів малини звичайної, одержаного за заявленим способом, вивчали *in vitro* шляхом вивчення їх впливу на функціональну активність лімфоцитів в реакції баластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) [4-8].

40 Як матеріал для тестування субстанцій використовували мононуклеарні клітини (лімфоцити), які були вилучені з венозної гепаринізованої крові шляхом центрифугування з використанням градієнта щільності фіколл-верографіну (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 (1 млн. 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.

45 Інтенсивність проліферативної реакції оцінювали за показниками активації синтезу ДНК, яка фіксувалася шляхом обробки зразків моноклональними антитілами до білка S-періоду клітинного мітотичного циклу - бромдеоксіридин (*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 дані загальної кількості клітин та відсоток баластних 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 баластна трансформація). Одержані показники статистично обробляли за допомогою програми "Microsoft Excel" [8].

Результати досліджень наведено в таблиці.

Вплив субстанцій *Rubus idaeus* L. на показники баластної трансформації лімфоцитів ( $X \pm m$ ), n=5

Субстанції	Розведення екстракту	РБТЛ, (%)
Екстракт	1/200	40,0±2,6*
	1/20	53,6±3,1*
	1/10	58,5±3,2*
Контроль (ФГА)	-	48,1±2,1
Спонтанна РБТЛ	-	8,5±0,7

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

Аналіз результатів дослідження свідчить, що одержаний за заявленим способом екстракт плодів малини звичайної значною мірою стимулює трансформаційну активацію мононуклеарних клітин периферичної крові. При використанні 100 мкл досліджуваної субстанції в розведенні 1/10 відзначається максимальна стимуляція трансформаційної активації імункомпетентних клітин. Так, екстракт *Rubus idaeus* у розведенні 1/10 збільшив трансформаційну активацію мононуклеарів на 50,0 % у порівнянні з інтактним контролем (спонтанною баластною трансформацією) та на 10,4 % у порівнянні з ФГА. При розведенні 1/20 отриманий екстракт збільшує трансформаційну активацію мононуклеарів на 45,1 % у порівнянні з інтактним контролем та на 5,5 % у порівнянні з ФГА. Навіть при розведенні 1/200 отриманий за заявленим способом екстракт збільшує трансформаційну активацію мононуклеарів на 31,5 % у порівнянні з інтактним контролем. Таким чином екстракт плодів малини звичайної проявляє дозозалежну стимулюючу дію на трансформаційну активацію мононуклеарних клітин периферичної крові.

Отже, заявлено спосіб отримання імунomodуючого засобу з плодів малини звичайної шляхом екстракції рослинної сировини спиртом етиловим 96 %. Заявлений спосіб простий, економічний, екологічно безпечний і може бути здійснений на будь-якому фармацевтичному підприємстві зі стандартним обладнанням.

Комплекс БАР з плодів малини звичайної, одержаний за заявленим способом, виявляє виражену імунomodуючу дію, є практично нетоксичним і може бути використаний як лікарська субстанція при створенні лікарських засобів зазначеної дії.

Джерела інформації:

1. Пат. 39766, Україна. 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. Пат. 98083, Україна. МПК (2015.01) А61К 36/00. Протизапальний, імуностимулюючий засіб на рослинній основі. - з. № u201413306, заявл. 11.12.2014, опубл. 10.04.2015, бюл. № 7.

3. Пат. 100292, Україна. МПК А61К 36/74 (2006.01) А61Р 37/04. Спосіб комплексної переробки трави маренки восьмилістової для отримання засобу з імунomodуючою дією. - з. № u201412603, заявл. 24.11.14., опубл. 27.07.2015, бюл. № 14.

4. Пат. 120554, Україна. МПК А61К 36/74 (2006.01) А61Р 37/02 (2006.01). Спосіб отримання засобу імуностимулюючої дії з трави підмаренника справжнього. - з. № u201704409, 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 UA 105324 України на корисну модель, МПК G01N 21/00. Спосіб оцінки функціональної активності лімфоцитів за допомогою біоаналізатора Agilent 2100 / ДУ "ІМІ НАМН". - № у 201509727; заявл. 07.10.2015; опубл. 10.03.2016. Бюл. № 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

5 Спосіб одержання засобу з імуномодулюючою дією шляхом екстракції рослинної сировини спиртом етиловим 96 %, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують плоди малини звичайної (*Rubus idaeus* L.), екстракцію здійснюють настоюванням при кімнатній температурі, при загальному співвідношенні сировина:екстрагент - 1:10, тричі по 24 години, потім об'єднують зливи і концентрують під вакуумом до співвідношення сировина-готовий продукт - 1:1.