



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 104 016<sup>(13)</sup> C1  
(51) МПК<sup>6</sup> А 61 К 35/78, 9/08

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

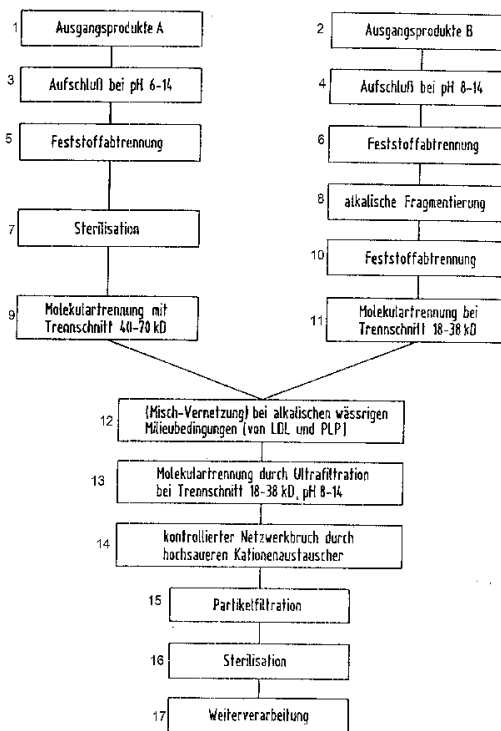
(21), (22) Заявка: 92016546/14, 27.05.1991  
(30) Приоритет: 27.05.1990 DE Р 4017091.8  
(46) Дата публикации: 10.02.1998  
(56) Ссылки: US, патент, 4784853, кл. А 61К 35/78, 1988.  
(86) Заявка РСТ:  
DE 91/00450 (27.05.91)

(71) Заявитель:  
Шантал Мах (DE)  
(72) Изобретатель: Вальтер Мах[DE]  
(73) Патентообладатель:  
Шантал Мах (DE)

### (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДНОГО РАСТВОРА, СОДЕРЖАЩЕГО АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА АНТИВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ

#### (57) Реферат:

Использование: в медицине для восстановительной химиотерапии при инфекционных заболеваниях вирусного характера. Сущность изобретения: способ получения водного раствора противовирусного действия экстракцией лигноцеллюлозного сырья. Осуществляют водные экстракции сырья, обогащенного полисахаридами, при рН 4-14, и сырья, обедненного полисахаридами, при рН 8-14. Экстракты отделяют от твердых частиц, смешивают, доводят рН смеси до 8-14. Образующиеся в смеси продукты реакции разделяют по молекулярным массам при степени разделения 18-40 КД, а целевой раствор, содержащий низкомолекулярные фракции продуктов реакции, обрабатывают Н<sup>+</sup> катионообменником до установления стабильной величины рН в диапазоне 3-7, отделяют от твердых частиц и стерилизуют. 17 з.п. ф-лы, 7 табл., 9 ил.



Фиг. 1

RU 2 104 016 C1

RU 2 104 016 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 104 016** <sup>(13)</sup> **C1**  
 (51) Int. Cl.<sup>6</sup> **A 61 K 35/78, 9/08**

RUSSIAN AGENCY  
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

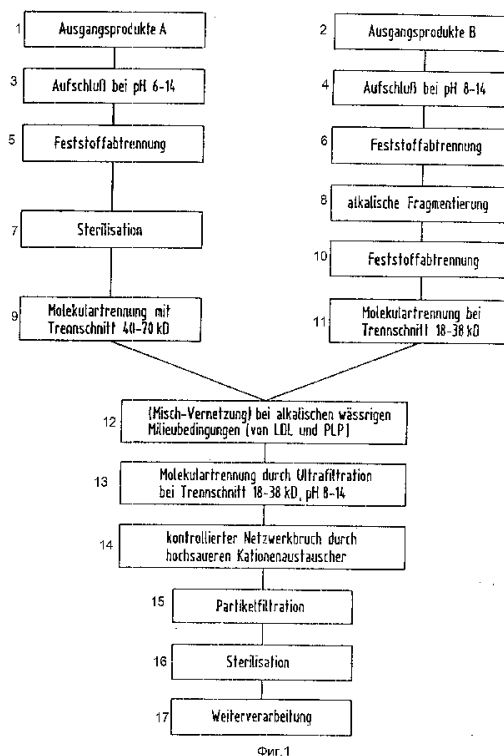
(21), (22) Application: 92016546/14, 27.05.1991  
 (30) Priority: 27.05.1990 DE P 4017091.8  
 (46) Date of publication: 10.02.1998  
 (86) PCT application:  
 DE 91/00450 (27.05.91)

(71) Applicant:  
**Shantal Makh (DE)**  
 (72) Inventor: **Val'ter Makh[DE]**  
 (73) Proprietor:  
**Shantal Makh (DE)**

(54) **METHOD OF PREPARING AN AQUEOUS SOLUTION CONTAINING ACTIVE ANTIVIRAL SUBSTANCES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, virology. SUBSTANCE: method involves extraction of lignocellulose raw enriched with polysaccharides at pH 4-14 and raw depleted with polysaccharides at pH 8-14. Extracts were separated from solid particles, mixed, pH value is brought about to 8-14 and formed reaction products were separated by molecular mass at separation degree 18-40 kDa. The end solution containing low-molecular fractions of reaction products is treated with \$\$\$-cation exchange resin up to stable pH value at the range 3-7, separated from solid particles and sterilized. Product is used for recovery chemotherapy at viral infectious diseases. EFFECT: improved method of preparing. 18 cl, 7 tbl, 9 dwg



RU 2 104 016 C1

RU 2 104 016 C1

Изобретение относится к способу получения водного раствора, содержащего активные вещества антивирусного действия.

Борьбу против вирусных инфекций до сих пор нельзя считать полностью решенной проблемой. Одна из нерешенных проблем это быстрая мутация вирусов, частично или полностью блокирующая действие антител, вырабатываемых лекарственными веществами антивирусного характера или организмом человека. Метод, обеспечивающий способность антител к сопротивлению, многовирусным инфекциям самого различного характера, состоит в том, чтобы ввести так называемый "коктейль из активных веществ", причем одно из активных веществ должно быть эффективным. Этот принцип лег в основу при производстве фирмой Сандос гаммаглобулинового препарата, известного под торговой маркой "сандоглобулин". Речь идет о смеси антител, выделенных из крови более 2000 доноров, проживающих на территории Центральной Европы, содержащий большую часть антител, способных противостоять заболеваниям, распространенным на территории этого региона, на основании чего можно сделать вывод, что этот состав эффективен против самых различных инфекций вследствие большого количества самых различных антител.

Проводимые до сих пор опыты по борьбе с вирусными инфекциями были направлены на воздействие на различные точки вирусной модели. Так существуют медикаменты типа азидотимидина (АЗТ), тормозящие обратную транскрипцию за счет обрыва цепей, однако эти медикаменты приводят также нежелательным образом к значительным побочным явлениям у пациентов.

Всемирные исследования с декстрансульфатом (соединения с  $\approx 10$  кД), выделенным из пенициллюлоз растительного происхождения показали, что эта группа веществ также мало эффективна и не дает практического прогресса при лечении ВИЧ-инфицированных пациентов.

Кроме того, лекарственные средства, содержащие декстрансульфат, и предназначенные для орального применения, имеют один существенный недостаток, а именно: способы проникновения декстрана в кровь и концентрация его в месте контакта с вирусами были не очень эффективны, а кроме того, сопровождались сильнейшим побочным действием (невропатия, диарея).

Были также предприняты попытки геннотехнологическим путем получить изолированные СД4-рецепторные протеины, способные прочно связываться с вирусом др 120, и вследствие насыщения последних нейтрализовать вирус и сделать его неактивным. Однако для того, чтобы это искусственное образование СД4 использовать в качестве терапевтического средства, искусственный протеин необходимо было бы вводить в высоких дозах искусственные избыточные концентрации клеточного сенсора, который обычно лежит за пределами оболочки здоровых клеток, служат для организма источником постоянного раздражения, иммунологические и прочие, реакции которого невозможно предусмотреть. Растворимый СД4 может связываться также с МНС-11-гликопротеинами и оказывать

негативное влияние на их нормальную функцию, что например, еще больше усилит иммунодефицит у больных СПИДом. Кроме того, растворимый СД4 должен был бы вводиться повторно в высокой дозировке парентеральным способом (Spectrum Wissenschaft декабрь 88, стр. 116).

В качестве выхода из этой проблемы было предложено получить небольшие фрагменты СД4, протеиновые мостики, структурирование таким образом, чтобы их можно было бы распознать еще на стадии др. 120. Если бы это оказалось возможным, то осталось бы еще решить вопрос, не приведет ли этот протеиновый фрагмент в иммунологическом отношении к обратной регуляции *in vivo* и не вызовет ли это каких-либо до сих пор неизвестных нарушений и расстройств в состоянии здоровья очень неустойчивых больных СПИДом.

В 1990 году М.Ланге (США, *Arztliche Praxis* 15, стр. 28, Верк-Ферлаг,  $\Delta$ -8032 Грэфельфинг) удалось однозначно доказать, что у пациентов, страдающих синдромом приобретенного иммунодефицита и аналогичными ему заболеваниями, единственный путь возвращения к нормальной жизни - это вопрос производства вируса. Можно предположить, вич-инфицирование стимулирует иммунологический патомеханизм, который имеет склонность к эскалации. Аналогия с заболеваниями аутоиммунной системы (например, красной волчанкой) показывает, что иногда недостаточно проводить только химиотерапию для лечения анти-(нм-вич-инфицирования). По-видимому, более целесообразно сочетать химиотерапию с включением в нее собственной иммунологической системы, т.е. применять и развивать новую форму антиэскалационной химиотерапии.

По данным Ланге, при ВИЧ-инфекции речь идет о крайней комплемент-активации, анафилактический фактор С5а индуцирует производство тумор-некроза фактора и интерлейкина 1. ВИЧ может привести этот каскад к действию для эскалации. Это обстоятельство было доказано несколькими рабочими группами. Уже из одного этого можно свободно сделать вывод, что эффективная антиВИЧ химиотерапия не должна ограничиваться только торможением самой ВИЧ инфекции, но должна по меньшей мере прерывать, частично, "порочный круг" такого рода собственного аутоиммунологического механизма.

Индивидуальное эскалативное взаимодействие различных патогенных факторов (ВИЧ, возбуждающая определенная инфекция, аутоиммунные каскады и т.д.), должно быть понято еще лучше для того, чтобы прийти действительно к полезной куративной химиотерапии. Только так можно получить новый компонент в химиотерапии.

Достаточно оптимистические данные современной терапии (например, средняя продолжительность жизни после инфицирования 13-18 месяцев, 5-летний срок жизни в дальнейшем 3,4% (Сан-Франциско 1981-87, 4000 пациентов) опубликованы в J. Am Med. Ass 263 (1990), 402) убедительно доказывают, что практикуемые в настоящее время чисто химиотерапевтические методы

не дают полностью удовлетворительных результатов. W.J.Mach совместно с Wittich'em и Stuhlfauth'em еще в 1961 году удалось доказать, что полученные натуральные красители типа неопенихромина в небольших количествах при парэнтеральном введении выполняют роль "эндогенных регуляторов" в организме человека повышая, например, активность коры надпочечников.

Предположительно этот факт можно рассматривать как первое доказательство того, что окислительно-восстановительные пигменты с хиноидным компонентом способны возбуждать "анти-эскалативный" механизм человека, не являясь при этом протеином или гормоном.

Таким образом в будущем химиотерапия должна (из иммунологических соображений) включать в себя антиэскалативный компонент, чтобы тормозить процесс "к точке возвращения".

Целью настоящего изобретения является, по-возможности, нахождение способа получения наиболее легко вводимого парэнтерально активного вещества, способного к нейтрализации вирусов, не обладающего при этом цитотоксическим эффектом и не вызывающего нежелательных иммунологических реакций в организме пациента, которому проводится курс лечения.

Кроме того, в задачу изобретения входит нахождение способа получения активного вещества, обладающего активностью к измененным/мутированным формам вирусов.

В соответствии с изобретением эта задача решается способом получения водного раствора, содержащего активные вещества антивирусного действия, включающему экстракцию лигноцеллюлозного сырья, характеризующийся тем, что осуществляют водные экстракции сырья, обогащенного полисахаридами, при pH 4-14 и сырья, обедненного полисахаридами, при pH 8-14, экстракты отделяют от твердых частиц, смешивают, доводят pH полученной реакционной смеси до 8-14, образующиеся в ней продукты реакции разделяют по молекулярным массам при степени разделения 18-40 кД, а целевой раствор, содержащий низкомолекулярные фракции продуктов реакции обрабатывают  $H^+$ -катионообменником до установления стабильной величины pH в диапазоне 3-7, отделяют от твердых частиц и стерилизуют.

Предпочтительным является вариант когда экстракцию сырья, обогащенного полисахаридами, осуществляют при pH 6-14, а после отделения от экстракта твердых частиц его стерилизуют и производят ультрафильтрацию при степени разделения 40-70 кД, отбирая для дальнейшей обработки раствор, содержащий вещества с низкой молекулярной массой, что после отделения твердых частиц экстракт, полученный из сырья, обедненного полисахаридами, обрабатывают щелочным агентом до pH выше 8, отделяют от твердых частиц и подвергают ультрафильтрации при степени разделения 18-38 кД, отбирая для дальнейшей обработки раствор, содержащий вещества с низкой молекулярной массой, что разделение по молекулярным массам продуктов реакционной смеси осуществляют при степени разделения 18-38 кД, что после отделения твердых частиц целевой раствор

фильтруют от пирогенов, что сырье, обогащенное полисахаридами, выбирают из группы, включающей: натуральное древесное сырье, древесные вещества, полученные с применением биотехнологий при использовании культивирования растительных клеточных культур, синтетические древесные аналоги, полученные методом Фрейденберга из продуктов полимеризации с применением дегидрирования моно- и/или дилигнолов с последующим нанесением их на полисахариды, лигнин-полисахаридные комплексы, полученные щелочной экстракцией хлорит-древесной целлюлозы, и их смеси, что сырье, обедненное полисахаридами, выбирают из группы, включающей: натуральные продукты науглероживания, лигнолитически активные микроорганизмы, белую плесень, биоконвертируемое древесное сырье биоконвертированное воздействием выделенных лигнолитических ферментов, например, феноксидазы, древесное сырье и их смеси, что в качестве щелочных агентов для создания pH экстрактов выше 8 используют KOH, NaOH, NOH и аммиак, что при экстракции сырья, обогащенного полисахаридами, получают раствор, имеющий концентрацию извлеченных продуктов 0,05-10 мас.%, предпочтительно 2 или 0,1 мас.%, что экстракцию сырья, обогащенного полисахаридами, осуществляют при pH 12-14 водным раствором KOH, 1-10 дней, при комнатной температуре, что экстракцию сырья, обогащенного полисахаридами, проводят при повышенной температуре, не превышающей 120°C, причем при 100-120°C экстракцию осуществляют в автоклаве, что в качестве сырья, обедненного полисахаридами, используют продукты науглероживания древесного сырья, выбранные из группы, включающей лигниты, "цветные угли" и бурый уголь, что экстракцию сырья, обедненного полисахаридами, проводят в растворе KOH при концентрации KOH 0,1-0,8 моль/л, предпочтительно 0,4 моль/л, при комнатной температуре, что после смешивания двух экстрактов и доведения pH полученной реакционной смеси до 8-14, ее выдерживают 7-10 дней при комнатной температуре, причем создание pH = 8-14 осуществляют с помощью KOH, что экстракцию сырья, обедненного полисахаридами, проводят при температуре от комнатной до 120°C, предпочтительно, при pH 10-12, что разделение продуктов реакции по молекулярным массам в целевом растворе осуществляют ультрафильтрацией при низком давлении на устойчивых к щелочам мембранах, что для обработки целевого раствора на  $H^+$ -катионообменнике используют катионообменники из искусственных смол, при этом обработку проводят в токе водорода до установления стабильного значения pH в диапазоне 4-6,8, предпочтительно, 5-6, что стерилизацию целевого раствора осуществляют в автоклаве, при 121 °C, в течение 14 мин.

Предпочтительно, если подлежащие экстрагированию древесные материалы выбирают из группы, состоящей из:

A1: натуральное дерево, например, сердцевидную древесину в форме "молотой древесины", древесину мягких и твердых

пород. PLP-системы, которая встречается например ореховой коже и коже косточковых плодов, все части древесных растений, преимущественно в виде исходных продуктов, из которых выделена смола, различные виды трав, типа эспарто и т.д.

A2: древесные аналоги, например, полученные с применением биотехнологий древесные вещества путем выращивания растительных клеточных культур.

A3: синтетические аналоги дерева, полученные путем полимеризации продуктов с применением дегидрирования (ДНП) моно- и/или дилигнолов по методу Фрейденберга и нанесением на полисахариды ДНР.

A4: лигнин-полисахаридные комплексы, полученные путем щелочной экстракции хлорит-древесной целлюлозы, а также смеси (A1, A2, A3, A4) этих веществ.

Предпочтительно, если применяемые исходные вещества растительного происхождения выбирают из группы, состоящей из

V1: природные продукты науглероживания;

V2: при использовании лигнолитически активных микроорганизмов, например, грибка белой гнили, биоконвертируемое дерево;

V3: биоконвертируемое дерево, обработанное при действии выделенных лигнолитических ферментов/типа фенолоксидазы, а также смеси этих продуктов (V1, V2, V3).

В качестве оснований целесообразнее всего применять такие основания как КОН, NaOH, ZrOH в аммиак.

При типичном примере исполнения представляемого изобретением метода богатые полисахаридами лигнинные единицы находятся в концентрации 0,05-10 мас.%, предпочтительно до 2 мас.%, оптимально порядка 0,1 мас.%.  
35

Например, экстрагирование продукта (PLP) производится при значении pH от 12 до 14, предпочтительно в КОН в течение 1-10 дней при комнатной температуре (20°C). Экстрагирование PLP можно проводить при повышенной температуре до 120°C, причем при температурах свыше 100°C работы проводятся в автоклаве.

Предпочтительно также, чтобы продукты надугливания дерева выбирались из группы, состоящей из лигнитена, "цветного" и бурого углей.

Щелочная экстракция при использовании 0,1-0,8 молей КОН при предпочтительной форме исполнения предмета изобретения проводится с 0,4М КОН при комнатной температуре. Например, щелочная ферментация может протекать в течение 7-10 дней при pH П(КОН) при комнатной температуре.

Реакция с образованием группы активных веществ может проводиться, например, при температуре от комнатной до 120°C при pH от 8 до 14, предпочтительно от 10 до 12.

Оптимальным считается вариант, когда ЛД (PLP = LPL) продукт взаимодействия при комнатной температуре подвергают молекулярному разделению с получением ЛД-фракции, предпочтительно методом ультрафильтрации при низком давлении на устойчивых к щелочам ультрафильтрационных мембранах с номинальным разделением от 18-38 к.

Кроме того, продукт взаимодействия ЛД (PLP = LPL) подвергают обмену с помощью катионообменника с применением искусственных смол в форме водорода, до стабильного pH в диапазоне от 4 до 6,8, предпочтительно 5-6, причем в последующем кислая ЛД (ПЛС=ЛПС) - фракция очищается методом фильтрации от пирогенов и в дальнейшем при обработке в автоклаве, например, при 121°C стерилизуется в течение 14 мин.

Водный раствор группы активных веществ (PLP = LPL) обрабатывают по известному методу с помощью вспомогательных веществ с образованием жидкого фармацевтического состава, который в зависимости от формы применения или вводится в мазевую основу и выпускается в форме мази для наружного применения или же вводится в раствор и выпускается в форме раствора для инъекций или также для наружного применения. При этом водный раствор группы активных веществ ЛД (PLP = LPL) известным способом перерабатывают в ампулы для инъекций. Предпочтительно, введение группы активных веществ для борьбы с вирусными инфекциями, может быть или парэнтерально или локально терапевтическое средство для борьбы вирусных инфекционных заболеваний, причем речь идет о вирусах и ретровирусах, в частности типа ВИЧ-вируса.

Представляемую изобретением группу активных веществ целесообразно применять в форме хелатов благородных металлов, типа платина, золото, платина.

Многолетние опыты на добровольцах показали, что парэнтеральная дневная доза 2-7 ампул по 2 кг терапевтического средства, принимаемого в течение 24 ч, способна купировать тяжелые инфекции гриппа (а также смешанные вирусно-бактериальные инфекции) в течение 24-48 ч без заметных побочных явлений. Даже пациенты, страдающие тяжелыми формами астмы, при сильном инфицировании вирусом гриппа при введении 10 мг/80 кг веса тела в течение 24 ч без применения кортикостероидных доз свыше 5 мг могут избежать тяжелых астматических явлений.

При экспериментальном бронхоспазме на животных была установлена гарантированная активность атоксических доз (парэнтерально), способных воздействовать на брадикининовый спазм (ингибирование серотонина и торможение синтеза простагландина).

Такая активность, между прочим, абсолютно нетипична для этой группы активных веществ и является свидетельством того, что эта система активных веществ более соответствует требованиям Ланге (см. выше), чем прочие известные ингибирующие средства для борьбы с вирусными инфекциями, в частности вирусом ВИЧ (Спид).

Преимущества изобретения состоят в следующем:

в ВИЧ-инфицированных клеточных культурах (лимфоцитах человека) (тест см. ниже) в области не цитотоксических концентраций происходит ярко выраженное торможение синцитиальных образований (Анти-ВИЧ-активность) - система клеточных культур из центральных нейронов (из гиппокампуса, или кортекса) при строго

определенных условиях проведения испытаний как на искусственно дополнительно пораженных нейронах, так и не пораженных нейронах отмечается ярко выраженный рост способности к выживанию (эффект "выживания"), что биологически равноценно ингибированию эскалативных клеточных процессов (фланкированное восстановительное действие).

Поскольку нейроны, очевидно, представляют собой предпочтительный для ВИЧ-инфекций целевой орган, но речь идет о традиционных вирусах (in Situ пациента) это свойство имеет особое куративное значение.

Ориентирующие тесты из специальной области исследований причин М.Паркинсона показывает, что среди прочего является очень вероятным, что группа активных веществ обладает способностью к прохождению через кровь мозговой коробки.

Также при длительном медикаментозном лечении, которое может иногда растягиваться на годы, не отмечено случаев повышенной чувствительности, не усновлено какой-либо общей реакции на медикаменты, например, озноба, лихорадки и т. д., применение медикаментов такого типа не сказывается отрицательным образом на картине крови.

При инфекционных заболеваниях, вызванных обычными традиционными формами вирусов/грипп, ветряная оспа и т.д.) происходит быстрое и полное восстановление организма со снижением повышенной температуры нежелательных побочных явлений, влияющих на кровообращение,

- поскольку речь идет о непротеиновом активном веществе, оно не действует ни как СО-антиген, ни как средство, вызывающее повышение температуры,

- парэнтеральное введение медикаментозного средства чрезвычайно просто и решается без проблем,

- куративные дозы для ARC-пациентов составляют 20-40 мг/неделю,

- даже при сильнейших передозировках (например, 48 мг/24 ч с повторением) ни острых, ни хронических последствий локального или систематического происхождения не установлено.

Основные области назначения новой системы активных веществ без каких-либо ограничений - это в первую очередь,

- ВИЧ-инфекции,

- случаи ARC-заболеваний, вызванных определенными инфекциями,

- поражение клеток, вызванное хроническими вирусными инфекциями,

- куративное воздействие на отсутствие мультиустойчивости раковых клеток к традиционным противоопухолевым химиотерапевтическим средствам,

- заболевания центральной нервной системы.

Ниже приведены используемые в тексте сокращения и аббревиатуры:

LD- низкий по Дальтону

(низкомолекулярный, здесь макс. 3000 Д),

L/D - высокий по Дальтону

(высокомолекулярный, здесь 3000 Д),

P - полисахаридные цепи, естественно связанные с лигниновыми единицами или полиозами как промежуточными членами между лигнином и целлюлозой,

L - "нативные" лигниновые единицы во всех натуральных вариантах,

LD-L - низкие по Дальтону лигниновые единицы, макс. 3000 Д,

HD-L - высокие по Дальтону лигниновые единицы,

(PLP) - обогащенные сахарами (полисахариды) полиозы лигниновые единицы, например, единицы,

экстрагируемые в виде лигнина из размельченной древесины или древесных спилок водой при щелочном значении среды,

а также его разновидностях, полученных путем биосинтеза древесины, (LPL) - обедненные сахарами лигноидные единицы,

экстрагируемые из продуктов обезуглероживания ксилема, например, лигнит, "цветные угли" (до бурого) при использовании полярной (водной) среды

щелочного характера, а также через процесс обезуглероживания сильно обедненных ассимилированных энергоносителей типа полисахаридом (микробиологическое

разложение перед процессом обезуглероживания),

LD (L-PL) - обедненные сахарами лигноидные единицы, получаемые из процессов обезуглероживания,

экстрагируемые с применением щелочных водных сред, но сильно обедненные в процессе

ассимилированными энергоносителями типа полисахаридов, с низкими значениями по Дальтону/растворимые в воде даже при pH

ниже 7,0,

LD(PLP) - фракция обогащенных сахарами лигниновых единиц с низкими значениями по Дальтону,

HD(LDP = PLP) - продукт взаимодействия из ЛД-единиц, состоящий из богатых сахарами систем и ЛД-единиц из обедненных сахарами Л-единиц,

LD (PLP = LPL) - фракция указанного выше продукта взаимодействия с низкими значениями по Дальтону, пригодная в соответствии с изобретением для биологического применения.

Представляемый изобретением продукт взаимодействия (ЛПС-ПЛС) в соответствии с проведенными исследованиями проявляет, с одной стороны антивирусную активность, а, с другой стороны, практически не имеет побочного действия. Преимущество

представляемой изобретением активной группы, содержащей цепи сахаров, состоит в том, что речь идет не о протеине, что не раздражает иммунную защиту от чужеродных белковых веществ и поэтому может быть

использовано для длительного медикаментозного лечения.

Можно предположить, что представляемая изобретением группа активных веществ препятствует размножению вируса, в частности здесь ВИЧ-вируса в клетке-хозяине.

Наиболее вероятно, что она представляет собой циклопротеиновое образование, которое, не являясь протеином, не может вызывать иммунных реакций в отрицательном их проявлении, и способен даже действовать на самые чувствительные тестовые системы,

в частности на выделенные мозговые клетки, выполняя роль "фактора выживания".

В лечебных дозах (0,1 мг/кг веса тела человека) группа активных веществ даже при длительном применении не дает повышенной чувствительности, не является токсичной и не обладает побочными действиями.

Представляемая изобретением группа активных веществ обладает липофильной доминантной, определяющей ее хорошую растворимость.

Подводя итоги установлено, что группа активных веществ согласно изобретению вследствие своей непротеиновой структуры и нетоксичности вполне пригодна для длительного применения.

Особое преимущество этой группы активных веществ состоит в том, что может быть использована для защиты нервных клеток, выполняя роль фактора выживания.

И совершенно особым преимуществом группы активных веществ согласно изобретению можно отнести их разнообразие, постоянно обеспечивающее самые различные конформации активного вещества и распределителей его в отношении вирусов.

О многих вирусах, в частности, о ВИЧ-вирусах известно, что они чрезвычайно быстро изменяются и приспосабливаются к обстоятельствам, поэтому одна единственная конформация для мутированных вирусов не становится более эффективной.

Применяемые согласно изобретению глико-лигнинные единицы представляют собой сложные системы, содержащие полисахариды-полиозы и лигнин и вследствие своего сферического разнообразия в отношении распределения зарядов способны насыщать самые различные гликорцепторы. Представляемая изобретением группа активных веществ (не протеинов) (низкомолекулярная и растворимая в воде) состоит, в основном из фенилпропановых единиц, обедненных цепями сахаров (полисахаридными цепями) с хиноидными доменами/орто-или парахиноид).

Лигноидные молекулярные домены, имеющие сродство с боковыми цепями сахаров и частично обедненные в сферическо-специфическом отношении глюкомолекулами, в природе находят распространение в продуктах науглероживания, и так в "цветных углях", лигнитах и в небольших количествах в каменных углях, в ходе многих миллионов лет вследствие науглероживания происходит обеднение полисахаридных цепей или полиозов, осуществляющих биологическое связывание между лигнинными единицами и целлюлозой, последнее происходит за счет микробиологического разложения, долговременных окислительных процессов, вследствие чего и образуются обедненные углеводами продукты обезуглероживания.

Кроме того, преимущество изобретения состоит в том, что система молекул способна биологически проходить через оболочку клетки, что удалось однозначно доказать в ходе экспериментальных опытов *in situ* в процессе измерений на нервных клетках и клетках печени. В ходе научных исследований удалось установить, что группа активных веществ согласно изобретению оказывает неожиданно сильное действие на инфицированную клеточную культуру, причем никакого, сколько-нибудь значительного, побочного действия токсического характера не обнаружено.

Вследствие этого представляемая изобретением активная группа подходит для длительного медикаментозного лечения. Какой-либо потери активности при

длительном употреблении не отмечено, его можно, ничем не рискуя, применять при подозрении на то или иное заболевание, комбинируя с подходящими активными веществами неспецифического характера. В целом система обладает восстановительным действием и инъецируется без проблем.

Ниже приводится более детальное описание предмета изобретения на примерах конкретного исполнения и сопровождающих его чертежах, причем только этими примерами предмет изобретения не ограничивается.

На фиг. 1 - схема получения группы активных веществ согласно изобретению; на фиг. 2 - продолжение схемы получения группы активных веществ согласно изобретению; на фиг. 3 - другие варианты получения группы активных веществ согласно изобретению; на фиг. 4-5 - спектр флуоресценции растворов групп активных веществ согласно изобретению или их предварительных фракций в соответствии с примером 1 в воде; на фиг. 6 - C13-спектр группы активных веществ согласно изобретению; на фиг. 7 - графическое изображение ЛДН-активности, при недостатке глюкозы в культуре кортекса крыс; на фиг. 8 - графическое изображение жизненного места с нейронами из гиппокампуса через 48 ч *in vitro*; на фиг. 9 - запись измерения экстинкции в зависимости от продолжительности облучения раствора активного вещества.

Пример 1. Получение группы активных веществ согласно изобретению.

Получение обогащенных сахаром лигнинных фракций PLP 300 г размельченной сердцевины дерева (сибирской лиственницы) диспергировали в 6000 мл деминерализированной воды при перемешивании и добавляли 150 г КОН. Смесь выдерживали при перемешивании в течение 3 дней при температуре 46-66°C (нагревание с облучением). Затем твердые вещества отделяли на нутч-фильтре, остаток сбрасывали, фильтрат обрабатывали на центрифуге и при порционном добавлении высококислого ионообменника из искусственной смолы (амберлит ИК 120) в форме водорода при постоянном контроле pH через калиброванную стеклянную трубку медленно доводили pH до 11,5. Ионообменник отделяли и сбрасывали. Блестящий золотистожелтый раствор через молекулярное разделение на устойчивой к щелочам ультрафильтрационной мембране с номинальной степенью разделения 100000 ед. по Дальтону очищали от пирогенных веществ и прочих частиц. Из полученного блестящего золотистожелтого раствора отбирали пробу 20 мкл, разбавляли ее в кварцевой кюветте (1 см) 3 мл воды для проведения спектрального анализа, перемешивали, снимали с последующей регистрацией серию спектров флуоресцентного возбуждения при следующих длинах волн: 450 нм, 490 нм, 520 нм.

Чувствительность флуориметра регулировали таким образом, чтобы относительная флуоресцентная эмиссия при длине волны 450 нм/самописец 2 см/мин, скорость подачи длины волны возбуждения 100 нм/мин. Работы производились при

использовании прибора системы "КОНТРОН" (Швейцария), тип SFM-23 с регистрацией.

Для контроля снимались также спектры возбуждения при 490 нм и 520 нм. Получали желтый ПЛП-матричный раствор.

Получение обедненной сахарами лигноилной фракции LPL.

600 г "размельченного" (мелко размолотого/лигнита диспергировали при комнатной температуре (20°C) в 10000 мл, 1,68 мас.% КОН раствора при перемешивании. Частями растворяли и обрабатывали на центрифуге с целью удаления твердых веществ. Осадок отделяли и сбрасывали. Через 24 ч производили дальнейшее отделение твердых веществ с помощью скоростной центрифуги и твердые вещества сбрасывали. После щелочной ферментации в течение 5 дней при 20°C еще раз производили отделение твердых веществ из полученного ранее продукта центрифугирования, после чего пропускали через ультрафильтрационную установку с устойчивыми к щелочам ультрафильтрационными мембранами с номинальной степенью молекулярного разделения 30000 ед по Далтону. После того как собиралось 6,7 литров фильтрата ультрафильтрацию прерывали. Ультрафильтрат доводили до pH 5,5, используя для этой цели свежеективированный высококислый ионообменник (амберлит ИК 120) под контролем калибровочного стеклянного электрода.

Полученный слабокислый раствор тотчас же фильтровали на ультрафильтре с целью осаждения пирогенов. После этого производили термическую стерилизацию в автоклаве при 121°C в течение 15 мин. Для определения концентрации твердых веществ производили отбор проб, которые концентрировали при температуре 85°C до установления постоянного веса (ИК-излучатель). Полученный таким образом фильтрат после установления желаемой концентрации в виде ЛПС или бедной сахарами лигноидной фракции использовали для реакции с продуктом стадии 1 (см. выше).

После этого исследовали и обсуждали C13-спектр указанной фракции (продукт стадии 2).

13C-ЯМР-спектры.

По данным 13C-ЯМР-спектра эта проба отличается от натурального лигнина большим числом карбоксильных групп, которые дают средний мультиплетт при 168-180 частях на миллион. При этом C-атомы карбоксила вследствие отсутствия эффекта Керна-Оверхойзера и спин-спинового переменного действия со связанными непосредственно ядрами водорода дают особенно слабые сигналы, вследствие чего можно сделать вывод, что их концентрация лежит выше относительной интенсивности их сигналов. То же самое относится и к C-атомам альфа-карбонильной группировки, которые поглощают в диапазоне от 190,5 до 198, однако дают при этом значительно более слабую интенсивность. Резкий синглет при 158,2 частях на миллион лучше всего соотносить C-атому 4 в п-гидроксифенильных группах (описание C-атомов см. Н.Людеманн и Х.Нимц, Makromol Chem 1975, 2409 (1974)). Однако поскольку измерения на

соответствующих моделях веществ проводились в гексадегтероацетоне в качестве растворителя при использовании внутреннего стандарта (Л.Людеманн и Х.Нимц, Makromol Chem 1975, 2393 (1974)) для этого сигнала должны были рассматриваться также весьма вероятные C-атомы 3 и 5 в скрингил-радикалах.

Широкий мультиплет (7) в области 98-145 частей на миллион следует соотносить атомам углерода 1,2,5 и 6 в гуациле, а также 1,2,4 и 6 в серингил-радикале. Слабое разрешение спектра в этой области свидетельствует о сильной конденсации в лигнине, обусловленной его предварительной обработкой.

В области алифатических углеводородных атомов сигналы (8), (9) и (15) как типовые лигниновые сигналы следует соотносить арилглицерин-В-арилэфирным связям, представляющим собой важнейший тип связи во всех лигнинах. Негарантированность соотношения может произтекать в данном случае от растворителя и внешнего стандарта. Относительно слабый метоксил-сигнал при 58,6 частях на миллион свидетельствует о частичном деметоксилировании во время предварительной обработки пробы. Появляющиеся в этом диапазоне хорошо структурированные сигналы, (10), (1) и (12) не обнаружены в типичных спектрах лигнина (Х. Людеманн и Х.Нимц, Makromol Chem 175, 2409 (1974)) и указывают на конденсированные углеводные компоненты.

Труднообъяснимым можно считать появление широкого мультиплета (17) в области от 0 до 55 частей на миллион. Предположительно здесь должны адсорбироваться предпочтительно алифатические углеродные атомы, непосредственно несвязанные с кислородом. Однако в лигнине существует очень немного атомов этого типа, например, В-углеродные атомы в цинорезинолевых единицах и альфа-углеродные атомы в дибензил-тетрагидрофурановых единицах (литература: 1.Х. Людеманн и Х.Нимц, Makromol Chem 175, 2393, 1974, Х.Людеманн и Х.Нимц, Makromol Chem 175, 2409, 1974). Поэтому во время окислительных и прочих предварительных обработках лигнина подобные C-атомы (например, CO-CH<sub>3</sub>, -СНОН-СН<sub>3</sub> или -СН<sub>2</sub>-С) должны возникать из лигнина, или при получении лигнина из дерева.

Суммируя можно сделать вывод, что, как свидетельствует анализ пробы, речь идет о структурно сильно измененном лигнине, лигниновый характер которого не удалось доказать однозначно. Соотношение сигналов значительно осложняется применением D<sub>2</sub>O в качестве растворителя, поскольку он не растворяется в ацетоне (гексадегтероацетоне), в котором проводилось измерение сравнительных лигнинов (Х. Людеманн и Х.Нимц, Makromol Chem 175, 2409 (1974)). Кроме того, применение внешнего стандарта вместо внутреннего оказывает незначительное влияние на химический сдвиг, вследствие чего разница в химическом смещении может составлять до 2 частей на миллион.

13C-химические сдвиги в частях на миллион TMS в качестве внешнего стандарта

в D<sub>2</sub>O при использовании спектрометра системы Вариан X1-100-15. (см. табл. 1)

Дальнейшая обработка

При постадийном добавлении обедненной сахарами лигноидной фракции в определенных концентрациях 2 мг/мл вводили по 5 мкл в 3-мл-кварцевую кювету ("флуоресцентное титрование") и регистрировали спектр возбуждения при 520 нм, пока при соответствующем возрастании добавления не наступал ярко выраженный пик эмиссии при 465 нм. При этом во всем диапазоне длин волн эмиссии отмечалось резкое повышение значений, а при эмиссии 394-396 нм они достигали 80% относительной эмиссии. Количество лигноидной фракции обедненной сахарами, необходимое для такого повышения флуоресценции, определялось (здесь, например, 10 мкл 0,2%-ного раствора) в ходе анализа с последующим умножением на коэффициент 2,5.

Установленные таким образом добавляемые количества обедненной сахарами лигноидной фракции ЛПС-раствора к матричному раствору рассматривались в дальнейшем как существующие на настоящий момент количества матричного раствора: например, к 4000 мг матричного раствора данной смеси в соответствии с рекомендациями добавляли 5000 мл 0,2%-ной обедненной сахарами лигноидной фракции указанного раствора 120 мкл матричного раствора потребовали 10 мкл 0,2%-ной обедненной сахарами лигноидной фракции раствора, т.е. после умножения на коэффициент 2,5 получали на 4000 мл матрицы 2000 умноженное на 2,5. При 45-65 °С производили интенсивное перемешивание и после 4-часовой реакции при данной температуре молекулярное разделение на ультрафильтрационной установке с применением устойчивой к щелочам ультрафильтрационной мембраны с номинальной степенью разделения 30 КД. После этого ретентат сбрасывали, а фильтрат подвергали дальнейшей переработке, с помощью высококислотного катионообменника в H<sup>+</sup>-форме устанавливали значение pH в фильтрате на уровне 5,5 и после фильтрования тотчас же подвергали термической стерилизации с целью отделения пирогенов.

Из загрузки отбирали пробы для биологических и аналитических целей и после проверки на идентичность с помощью флуоресцентной спектроскопии и очищения от пирогенов перерабатывали в ампулы. В качестве растворителя для ампул, предназначенных для парентерального применения, использовали, 9,0-ный NaCl, стерильный, для инъекций.

На фиг.4-5 представлены спектры флуоресцентного возбуждения при 450, 490 и 520 нм длинах волн возбуждения для ЛПС-раствора (группа веществ А). там же -представлены результаты влияния определенных добавок (здесь двустадийно) ЛПС в 5 мкл количествах по принципу флуоресцентного титрования при 520 нм: решающим здесь можно считать появление и высоту пика эмиссии при длине волны возбуждения 466 нм.

На фиг. 1 еще раз дается схема реакции для наглядности.

На фиг. 2 и 3 представлены возможные модификации метода.

Пример 2. Получение группы активных веществ согласно изобретению.

Получение обогащенной сахарами лигниновой фракции PLP.

180 г размолотой сердцевинки сибирской лиственницы, размельченной до размера частиц 0,05-0,315 мм в специальной мельнице, работающей по принципу перекрестных ударов, которую перед экстракцией в водной среде очищали методом экстракции при использовании смеси этанол/бензол и этанол от экстракционных веществ (TAPP-стандарт T12M, 1959) и 120 г древесины красного бука обрабатывали описанным выше методом в то время как в сердцевине сибирской лиственницы содержался арабогалантан (4 части галактозы: 1 часть арабинозы), в буке отмечалось наличие ксилановых цепей, замещенных оксиметилглюконовой кислотой и 1-арабинозы, вследствие чего стало возможным получение конечного продукта с модифицированными свойствами.

Модификация метода с измельченной древесиной, переработанной в соответствии с примером 1, при проведении экстракции по методу Бекмана и Лише Angewandte Chemie 34, 285 (1921), характеризовалась "тем, что экстракция осуществлялась с 1М КОН в автоклаве при 121°С в течение 3,5 ч.

Пример 3. Получение группы активных веществ согласно изобретению.

(I) Получение обедненной сахарами лигниновой фракции. Получение ЛПС производилось в соответствии с примером 2. ЛПС получали из размельченного бурого угля, используемого вместо лигнита, как описано в примере 1.

В остальном получение производилось по аналогии с примером 1.

Пример 4. Получение группы активных веществ согласно изобретению.

(I) Получение обогащенной сахарами лигниновой фракции 210 г сердцевинки лиственницы, 60 г сердцевинки бука и 30 г шкурок косточковых плодов prunus avium перерабатывали в ЛПС, как указано в примере 2.

(II) Получение обедненной сахарами лигноидной фракции. Миоценовый бурый уголь, очищенный обычным способом путем экстракции смол, жиров и восков бензолом, перерабатывали по методу, описанному в примере 1.

Пример 5. Получение группы активных веществ согласно изобретению.

(I) Получение обогащенной сахарами лигниновой фракции 210 г сердцевинки сибирской лиственницы, 90 г дерева, синтезированного по методу Фрейденберга (К. Фрейденберг, Д.Херкин, 1960, Модели для связывания лигнина с углеродами, Chem. Ber. 93, 2814-2819) перерабатывали в ЛПС по методике, описанному в примере 2.

Дальнейшую переработку производили по аналогии с примером 1.

Пример 6. Получение группы активных веществ согласно изобретению.

Щелочной экстракт (A5), выделенный из хлорита голоцеллюлозы, полученный из буковых опилок (буковой муки), делигнизировали с применением NaCl<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по методу Фекля, 1981, Diss Universital Мюнхен)

и подвергали щелочной экстракции 4%-ным КОН-раствором по методике Фенгеля (1976, Holzforschung 30, стр. 73-78) после чего отделяли твердые вещества и к началу третьего дня в количестве 900 мл/концентрация 0,12% твердого вещества, остаточное содержание лигнина, 2,3% вводили в раствор ПЛС из лигнита (полученного по методу, представленному в примере 1). Объем 2,1%-раствора (pH 11,4) составил 9100 мл продолжительность процесса ферментации составила 9 дней. Затем раствор перерабатывали, как показано на фиг. 2, производили отделение твердых веществ, оставшийся раствор подвергали молекулярной фильтрации с использованием ультрафильтрации на устойчивых к щелочам мембранах с номинальной степенью разделения 18-38 КД и pH 8-14. Затем раствор подкисляли  $H^+$ -ионообменником, после чего производили асептическую фильтрацию частиц. Полученный фильтрат подвергали термической стерилизации при 121°C в автоклаве, а затем производили дальнейшую переработку по аналогии с примером 1.

Пример 7. Получение группы активных веществ согласно изобретению.

100 г мелко размельченной древесной коры экстрагировали в течение 6 дней 10000 раствора КОН в деминерализированной воде при 60°C, поддерживая с помощью КОН значение pH на уровне 8-9. При этом путем пропускания кислорода производили циркуляцию (перекачивание) смеси. Затем с применением центрифуги твердые вещества отделяли и сбрасывали. Полученный таким образом раствор ПЛС подвергали термической стерилизации в автоклаве. После этого происходила реакция раствора с ПЛС-продуктом стадии II примера 1 в щелочной среде при нагревании. Дальнейшая переработка проводилась в соответствии с примером 1.

Процесс получения представлен еще раз на фиг.3.

Пример 8. 600 г "цветных углей". Веоцен, идентичных в отношении размельчения продукта из примера 3, обрабатывали при комнатной температуре в 10 л раствора 110 г КОН и 60 г аОН в деминерализированной воде в течение 2-5 ч при перемешивании, исключая щелочную реакцию. Перед растворением гидроокиси добавляли 20 г активированного угля в мелко размельченном виде. Компонент активированного угля отделяли в последующем вместе с осаждающимися частями посредством центрифугирования, что само по себе можно рассматривать как стадию предварительной очистки продукта, предназначенного для щелочной ферментации.

Проводили центрифугирование на крупномасштабной установке, а в случае необходимости ковшовое центрифугирование при 4000-5000 об/мин, так как осаждение твердого вещества (следующая стадия процесса) при максимальной силе тяжести в процессе ультрацентрифугирования даже при использовании скоростной центрифуги с вертикальными осадительными цилиндрами и скорости 40 об/мин/тотчас не привело к тому, что количество осадка настолько понизило бы степень эффективности отстойника, что любое промышленное производство стало бы

невозможным. Продукт предварительного центрифугирования собирали, добавляли 8 г активированного угля на 8 л воды и обрабатывали на ультрацентрифуге, в случае необходимости по циркуляционному методу, пока отстойник, да и сама ультрацентрифуга не становились практически чистыми с минимальными следами лакообразного осадка. После этого продукт, подвергнутый интенсивной предварительной очистке/щелочной раствор групп активного вещества/хранили при комнатной температуре, подвергая щелочной самофрагментации. Процессы фрагментации контролировали путем постоянного измерения значений pH. В дальнейшем проводили, по крайней мере дважды, пробные процессы дальнейшего ультрацентрифугирования по описанному выше методу с целью осаждения образующихся осадков, способных, но из фармакологических соображений неприемлемых продуктов конденсации, не отличающихся должной растворимостью и реакционной способностью молекул.

После щелочной самофрагментации, т. е. примерно через 9 дней, еще раз проводили самую тонкую очистку методом центрифугирования, подвергая все еще высокощелочной раствор ультрафильтрации при номинальной степени молекулярного разделения 30000 единиц в условиях щадящего разделения по фракциям, а именно таким образом, чтобы при загрузочной смеси (например, описанного здесь типа) в 10 л процесс ультрацентрифугирования заканчивался при получении около 74000 мл ультрафильтрата и объеме ретентата соответственно 2000 мл.

Ретентат сбрасывали, ультрафильтрационную установку тщательно промывали с применением щелочи, а фильтрат подавали на следующую стадию обработки. Следующий контакт солей щелочных металлов ультрафильтрата с высококислыми катионообменными смолами (в форме водорода) представляет собой процесс, оказывающий влияние на качество конечного продукта.

"Подкисление" щелочного фильтрата при использовании, например, кислот или даже применения ионообменных колонок совершенно непригодно в данном случае, поскольку в последнем случае колонка легко забивается и становится совершенно непригодной для получения качественного фильтрата.

В соответствии с изобретением обмен катионов (обмен ионов  $Na$  и  $K^+$  на  $H^+$ ) проводится в реакционной емкости по методу периодического процесса, а процесс деионизации прослеживается в динамике с помощью калибровочного стеклянного электрода.

Следует тщательно следить за значением pH, добиваясь установления pH 5.1 и после достижения этого значения добавление ионообменника следует тотчас же прервать. В соответствии с изобретением деионизация должна проводиться при постоянном перекачивании еще частично щелочного продукта или образования турбулентных потоков, обеспечивая невозможность образования областей с высокой концентрацией ионообменников.

Поскольку группа активных веществ еще не может быть измерена в полном объеме, в соответствии с изобретением существует много возможностей, т.е. установленных экспериментальным путем реакционных стадий, которые можно рассматривать как самый точный метод, для получения группы активных веществ, абсолютно идентичных по фармацевтическим характеристикам.

Подвергнутый катионообмену раствор активного вещества очищается от частиц, которые могут попадать туда во время контакта с ионообменниками по известной методике при использовании стерильного фильтра и тотчас же стерилизуют в автоклаве, например, 121°C в течение 20 мин. Раствор активного вещества может храниться без какой-либо потери его качества при температуре от +4 до 20°C в течение 18 мес и применять для растворов для ампул (растворитель, например, 0,9%-ный раствор поваренной соли).

Проведенное здесь введение активированного угля не следует рассматривать как неспецифическую стадию очистки. Речь идет лишь о реагировании на определенные условия в ходе направленной фрагментации. В принципе при работах используется уголь типа "порошкообразный активированный уголь, чистый для анализа" возможны характеристики следующего порядка: рН 5%-ного раствора такого угля, 20 °С фильтрат (4,0-7,0), адсорбционная способность метиленового голубого: 0,15%-раствор: более 12 мл (0,1 г).

Большое значение имеет разносторонняя функция активированного угля, например, содержание его в окисях поверхностного слоя, которые под влиянием угля могут приобретать кислые или основные свойства. Чистые углеродистые поверхности, как, например, в случае с графитом, гидрофобны, однако в ходе реакции образуются поверхностные оксиды, которые могут давать гидрофильные участки, вследствие чего активированный уголь смачивается водой, оказывая при этом влияние на реакционную ситуацию в ходе фрагментации. Важное значение имеет и величина зерен используемого активированного угля: 50% зерен должны иметь размер менее 40 микрон. При таком распределении зерен активированный уголь без добавления вспомогательных фильтрующих средств обеспечивает достаточно чистое технологическое разделение.

Пример 9. Продукт, уже многократно очищенный методом ультрацентрифугирования от оседающих частиц и полученный в соответствии с изложенным в примере 8 "одно- или многоионному принципу", с помощью микроволновой печи, быстро нагревали на 46 °С, а затем постепенно охлаждали до комнатной температуры. Щелочную реакционную смесь после последней тончайшей очистки обрабатывали методом центрифугирования по аналогии с примером 8.

Такое физически вынужденное изменение процесса фрагментации дает возможность получать модифицированную группу активных веществ.

Пример 10. Фотометрические исследования реакционного процесса

показали, что лечение по принципу изобретения, изложенному, например, в примере 8, может быть интенсивно модифицировано в процессе фотомного активирования при 388-378 нм. При таком преобразовании группы активных веществ протекают процессы по механизму фотохромии: под этим следует понимать обратимые фотохимические реакции, при которых вещество А переходит в другую форму (конформацию) или соединение В, и эта прямая или обратная реакция может быть вызвана адсорбцией УФ- и видимого света. В соответствии с изобретением терапевтические характеристики при длине волны 388 нм изменяются до тех пор, пока под контролем экстинкции например, через 90 мин не будет достигнут максимум экстинкции, что можно зарегистрировать монохроматическим путем при 388 нм с помощью излучения в двухлучевом фотометре (фиг.9) (ширина полосы, например, 5 нм).

Наряду с измерениями максимума экстинкции (фиг.9) изменение (модуляцию конформации) можно дополнительно определить путем измерения флуоресценции (регистрация спектра возбуждения): влияние фотохромного воздействия на группу активных веществ проявляется во всех диапазонах флуорометрического спектра возбуждения, давая ход кривой, существенно отличающийся от нулевой пробы. Под влиянием УФ-индуцирующих систем химиотерапевтическая активность изменяется.

Активированные УФ-излучением растворы активного вещества, как показали клинические эксперименты, становятся непригодны не только для ВИЧ-инфицированных пациентов, но и в случае Т-клеточной лимфомы не способен влиять на Т-лимфоциты. Известно, что под влиянием активирования ультрафиолетом 8-МОР, состоящего из фумарового кольца и кумарина, оказывается воздействие на ТСГ1. Правда за это приходится платить дорогой ценой (лейкаферез), в то время как при использовании представляемого изобретением метода с применением УФ-активированного соединения необходимо только провести обычное парентеральное медикаментозное лечение.

Таким образом можно сделать вывод, что условия проведения экстракции из дерева оказывают большое влияние на молекулярную структуру растворимых полисахаридных лигниновых единиц. При этом молекулярная структура матрицы существенным образом зависит от исходного материала, т.е. от того, какой тип древесной структуры применяется, является ли это сердцевина, опилки, солома или травы. Чтобы исключить влияние следов средств защиты растений, следует использовать старые деревья.

При этом имеет значение тип древесины (идет ли речь о хвойных или лиственных породах), а также часть используемого в качестве исходного материала дерева/шелуха орехов, шкурки косточковых плодов, например, персика, мягкие части древесины, так, например, в случае использования ореховых шкурок связь между Р и 1 значительно крепче, чем в случае

применения мягких частей дерева/.

Кроме того, на продукт существенно влияет метод производства экстракции, при этом, в частности, применяются щелочная экстракция, обработка горячей водой в смеси с водяным паром под давлением (автоклав) или электролиз при использовании NaCl в качестве электролита.

Представляемая изобретением группа активных веществ содержит очень много структурных единиц естественного происхождения (арены и углеводы).

Далее приводятся результаты проведенных исследований на различных клеточных структурах с применением материала из примера 1.

Исследование группы активных веществ на ВИЧ-инфицированных лимфоцитах человека.

В качестве системы для испытаний были выбраны лимфоциты пробы крови из пуповины новорожденных, которые в течение 2 дней предварительно активировались 10 мкг/мл фито-гемагглютинином. Это клеточное образование представляет собой очень чувствительную лимфоцитную систему для исследований при ВИЧ-инфицирования. 200.00 активированных фитоагглютинином лимфоцитов крови из пуповины новорожденных инфицировались в 1 мл культуры в присутствии опытного вещества с ВИЧ-2-изолятом ВИЧ-2-РОД (конечная концентрация -около 200 синцитий-образующих единиц).

Светомикроскопическая оценка инфицированных культур производилась на третий день после инфицирования (исследование на возникновение вирус-индуцирующих слияний клеток, так называемых синцитий).

Группа активных веществ растворялась в культурной среде без последующей стерильной фильтрации. Были испытаны концентрации 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 20 мкг/мл, 2 мкг/мл и 0,2 мкг/мл. Исследования проводились в два варианта, а именно А88-1 и А88-4.

Исследование варианта А88-4 на плато с 24-перфорацией на ингибирование образования синцитий, представлено в табл. 3.

Исследование варианта А88-4 на плато с 24-перфорацией на ингибирование образования синцитий, представлено в табл.3.

Оценка торможения образования синцитий при использовании смеси варианта II, представлена в табл.4.

Клетки-объект исследований: периферические лимфоциты (ПЛ)

Вирус HIV-2РОД,  $10^5$ /мл, 1.500.000 конечное разбавление 1:500

Как видно из табл. 4, эта загрузка была активной сверху 10 мг/мл.

Анти-ВИЧ-активность группы активного вещества лабораторные исследования II.

Представляемая изобретением группа активного вещества исследовалась при введении двух концентраций (2 мкг/мл и 16 мг/л). При этом лабораторией 1 испытывался ВИЧ-корепротейн, техникой захвата антигена после первичной инфекции Н9-клетками.

Фосфономуровиная кислота использовалась в качестве положительного контрольного вещества при исследовании

различных концентраций AZT и ddC. В ходе данного эксперимента обе пробы обнаружили антивирусную активность.

В лаборатории 2 образование синцитий после первичной инфекции МТ-2-клеток использовали в качестве конечного продукта.

Результаты испытаний представлены в табл. 5, 6.

Оцененные значения ЕС 50 15 мкг/мл 1-2-мкг/мл более 10 мкг/мл.

Позитивный контроль: А Т и дидеоксицитидин испытывались в концентрациях 1-10 мкг/мл и показали 75%-ное торможение р24-экспрессии без проявления цитотоксичности.

Позитивный контроль: дидеоксицитидин с 0,25/90%-ное торможение/ и 2,5 мкг/мл (100%-ное торможение).

Из всего вышеизложенного очевидно, что представляемая изобретением группа активного вещества тормозит атаку ВИЧ-вирусов на клетки.

В лечебных дозах (0,1 мг/кг веса тела человека) группа активных веществ даже при длительном применении не является ощутимой или токсичной и не отличается побочным действием. Представляемая изобретением группа активных веществ имеет гидрофильные домены, обуславливающие ее хорошую растворимость в воде.

Само собой разумеется, возможны и другие модификации и мероприятия принципа согласно изобретению в рамках возможностей в этой области, известных каждому специалисту, например, применение других мономеров на поверхности матрицы.

Таким образом представляемая изобретением группа активных веществ может быть использована для длительного медикаментозного лечения, никакой потери или снижения активности при длительном введении не отмечается. Группу активных веществ согласно изобретению можно рекомендовать к применению даже в сомнительных случаях без всякого риска для пациента. Вещества отличаются, в основном, восстановительной активностью и введение их не связано с какими-либо проблемами. Как показывают результаты приведенных выше опытов, группа активных веществ, согласно изобретению, обладает ярко выраженной антивирусной активностью.

Серия испытаний I для подтверждения эффекта выживания без вспомогательной клеточной нагрузки.

Группа активных веществ согласно изобретению обладает также противоскалативным (восстановительным) действием, что более подробно иллюстрируется ниже. Острые нарушения механизма действия центральной нервной системы, которые могут наступать вследствие травмы, повреждений мозга, ишемической болезни и т.д., чаще всего сопровождаются дегенерацией или погибанием клеток центральных нейронов. Точно также многочисленные неврологические и нейродегенеративные заболевания центральной нервной системы (например, болезнь Паркинсона, Альцгеймера, синдром Корсакова) характеризуются гибелью селективных популяций нейронов.

Поэтому исследованию причин гибели клеток или наоборот их выживания во внутренних нейтронах придается большое

значение. В последние годы излучение нейротропных факторов и нейрон-нейроглиевого взаимодействия позволило собрать новые данные об условиях выживания нейронов ин-виво и ин-витро. Сюда относятся также новые результаты о значении мембран-липидного включения ганглиозидов и фосфолипидов, для жизнеспособности нервных клеток. Эксперименты на нервных клетках (культурах) показали, что перекиси или кислородные радикалы вследствие атаки мембранных липидов могут играть определенную роль в способности к выживанию или соответственно гибели клеток.

#### Материал и методы

I. Получение культуры нейронов гиппокампуса. Аммонов узел эмбриона крысы в возрасте 17 дней обрабатывали смесью трансина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЕДТА), механический срез разрыхляли и накладывали на покрытую полилизинном пластину. После фазы срачивания в 10%-ной сыворотки клетки размножались в среде, не содержащей сыворотки.

#### II. Тест с применением флуоресценции.

Использовали комбинацию двух флуоресцентных красителей, позволяющих проводить различное окрашивание живых и мертвых клеток. Флуоресцентный диетат (ГДА) как не флуоресцирующая форстадия поглощался только живыми клетками, расщеплялся в процессе гидролиза и вследствие этого преобразовывался в флуоресцирующее соединение (флуоресцин). Этидинийбромид/EIB - международное название

3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридинийброма не воспринимался живыми клетками и проникал только в мертвые клетки, где в флуоресцентном свечении давал красное окрашивание ядра.

#### Среды.

DMEM, серомед, Мюнхен Dulbeccos Modified Eagles Medium

ГК (сыворотка эмбриона теленка), серомед, Мюнхен. 10% в ДМЕЕМ-(1)2 ч при 56 °С, инактивировано НМ (гормонмикс).

инсулин  $8,8 \cdot 10^{-7}$  М

трансферрин  $1,1 \cdot 10^8$

трийодотиронин  $3 \cdot 10^{-10}$  М

шидрокортизон  $2 \cdot 10^{-8}$  М

в DMEM (модифицированная среда, острая на вкус).

Концентрация активного вещества (представлена в табл.7) в ампуле содержится 2 мг/мл раствора.

Растворы добавляются к среде после стадии закрепления в концентрации (1)-(5). Через 48 ч проводится тест на выживание. Из каждых 3 культур для определенных условий выбирается по 15 полей с 50 нейтронами на каждое поле.

#### Результаты.

Тест на выживание показал положительное влияние концентраций в диапазоне от 100 нг/мл среды на выживание нейронов в культуре, в сравнении с контрольной группой. При 10 мкг/мл отмечается незначительный токсический эффект.

При оценке эффекта выживания следует иметь ввиду, что при оптимальных условиях

ведения эксперимента клетки могут расти, т.е. значительного улучшения или повышения эффекта выживания не ожидается. Поэтому напрашивается вывод, что эксперименты следует проводить при субоптимальных условиях (II серия испытаний).

Тест на выживание нейронов аммонова узла через 48 ч.

Соотношение живых/погибших клеток

II серия испытаний

Влияние на выживание нейронов после травмы

При микрокинематографических съемках удалось наблюдать, что клетки, попавшие после длительного освещения под действие света галогеновой лампы, умирали раньше, чем клетки, не подвергшиеся такому воздействию.

При определении причин такого эффекта удалось найти в литературных источниках ссылки на то, что среди клеточных культур, подвергшиеся воздействию света так называемой лампы дневного света/отличающегося большой долей коротковолнового света/, образуют летальные фотопродукты. При облучении триптофан- или триптофан/рибофлавин-содержащих сред УФ-излучением (365 нм) в токсических средах образуется  $H_2O_2$  469 (1976), а также 14, N 191, 468 8, 19, 19-22 (1978).

Перекиси и радикалы кислорода в настоящее время превратились в объект самого пристального внимания в связи с излучением процессов старения (проблем геронтологии, а также различного рода клеточных изменений, вызванных токсическими эффектами (например, гипоксии).

На следующей стадии исследуется влияние активных веществ на эффект клеточного изменения после облучения галогеновой лампой дневного света.

При подготовке к опыту прежде всего определялась продолжительность облучения, которая привела к значительному снижению степени выживания клеток, но не дала полного летального исхода клеточной массы.

#### Методы

Нейроны, выделенные из аммонова узла эмбриона крысы (17 дневного) препарировались по описанному выше способу. Через 3-4 ч выдерживания в шкафу, делали срез культуры, и подвергали ее воздействию света. Затем в культуру вводили активное вещество в виде 3 концентрационных вариантов со свежей средой и продолжали культивирование в течение 20 ч. Выжившие клетки определяли при использовании описанного теста с применением флуоресценций. Для контроля использовали облученные и необлученные светом клетки, в которые вводили в тот же момент свежие среды без активного вещества.

#### Облучение

500 ватт-овую галогеновую лампу с рефлектором, расстояние 40 см (световое значение, измеренное на месте чашки Петри, составило 18,5 продолжительность излучения 20 мин. Чашка с культурой в момент облучения находилась на водяной бане с обогревом, причем температура измерялась непосредственно в среде и не превышала 34 °С.

#### Результаты

Результаты представлены на фиг.7, из которого следует:

Живые клетки в процентах (процесс выживания) через 24 ч:

- 1) выживание без облучения через 24 ч,
- 2) после облучения без активного вещества,
- 3) после облучения и добавления 1 мкг/мл активного вещества,
- 4) после облучения и добавления 0,1 мкг/мл активного вещества,
- 5) после облучения и добавления 0,01 мкг/мл активного вещества.

Отмечается весьма значительный эффект на выживание нейронов в культуре в описанных выше условиях, причем особого внимания заслуживает тот факт, что активной является концентрация 1 мкг/мл, при которой в оптимальных условиях через 48 ч не отмечается никаких признаков выживания (см. сообщение 1). Возможно, при нормальных условиях имеет значение небольшой токсический эффект оказывающий защитное действие, который после повреждения под действием света становится преобладающим.

Определенного внимания заслуживает вопрос о том, какая часть спектра является наиболее эффективной для летального эффекта. Однако совершенно определенно можно заявить, что среда вряд ли нагревается длинноволновой частью спектра, вследствие чего происходит разрушение или поражение клеток.

Надписи и условные обозначения к чертежам

Фиг.1:

1 - исходный продукт А; 2 - исходный продукт В; 3 - обработка при рН 6-14; 4 - обработка при рН 8-14; 5 - отделение твердого вещества; 6 - отделение твердого вещества; 7 - стерилизация; 8 - щелочная фрагментация; 9 - молекулярное разделение со степенью разделения 40-70 кД; 10 - отделение твердого вещества; 11 - молекулярное разделение (18-39 кД); 12 - смешанное смачивание систем при водно-щелочных условиях среды; 13 - молекулярное разделение методом ультрафильтрации (рН 8-14, разделение 18-38 кД); 14 - контролирование механизма смачивания с применением высококислого катионообменника; 15 - фильтрация частиц; 16 - стерилизация; 17 - дальнейшая переработка.

Фиг.2:

1 и 2- исходные продукты А и В; 3 и 4- обработка при рН 4-14 и соответственно 8-14; 5-6 - отделение твердых веществ; 7 - стерилизация в автоклаве; 8 - щелочная фрагментация и механизм смачивания с проникновением внутрь в водно-щелочных условиях; 9 - отделение твердого вещества; 10 - молекулярное фракционирование в процессе ультрафильтрации при номинальных пределах разделения 18-38 кД при рН 8-14; 11 - контролирование механизма смачивания с применением катионообменников в форме водорода; 12 - азеитическая фильтрация частиц; 13 - термическая стерилизация при 121 °С, 14 - дальнейшая переработка в фармацевтические средства и т.д.

Фиг.3:

1-2 - исходные продукты А и В; 3-4 - обработка при рН 4-14 и соответственно при

рН 8-14; 5-6 - отделение твердого вещества; 7 - стерилизация (термическая); 8 - фрагментация, щелочная; 9 - отделение твердых веществ; 10 - синтез с проникающим смачиванием при рН 8-14; 11 - отделение твердых веществ; 12 - молекулярное фракционирование с применением ультрафильтрации при рН 8-14 и номинальном разделении 18-38 кД; 13 - контроль механизма преобразования с применением катионообменников в Н-форме до рН 7-3,5; 14 - фильтрация частиц; 15 - термическая стерилизация при 121 °С в течение 14 мин; 16 - дальнейшая переработка при азеитических условиях в фармацевтические средства и препараты.

Фиг.7:

1а - живые клетки в процентах через 24 ч в культуре;

- 1) выживание без облучения через 24 ч;
- 2) после облучения без применения активного вещества;
- 3) после облучения при добавлении 1 мкг/мл активного вещества;
- 4) после облучения при добавлении 0,1 мкг/мл активного вещества;
- 5) после облучения при добавлении 0,01 мкг/мл активного вещества.

Фиг.8:

Тест на выживание нейронов аммогова рога через 48 ч.

Соотношение живых и погибших клеток.

Фиг.9:

Методика измерений: двухлучевой спектрофотометр "Шимадзу 210";

Цифровая показания 1 самописец; 1 см - кварцевая кювета, луч 388 нм, скорость 2 см/ч, АВ 0-0,2, стартовое абсолютное значение, 0,505, 8 нм.

Общая продолжительность измерений: 24 ч.

Константа при продолжительных измерениях более 2,0%/24 ч (решетка 1200 линий/мм, модифицированная конструкция Черни-Тернера, температура при проведении измерений 21°С.

### Формула изобретения:

1. Способ получения водного раствора, содержащего активные вещества антивирусного действия, включающий экстракцию лигноцеллюлозного сырья, отличающийся тем, что осуществляют водные экстракции сырья, обогащенного полисахаридами, при рН 4 и 14 и сырья, обедненного полисахаридами, при рН 8 - 14, экстракты отделяют от твердых частиц, смешивают, доводят рН полученной реакционной смеси до 8-14, образующиеся в ней продукты реакции разделяют по молекулярным массам при степени разделения 18-40 кД, а целевой раствор, содержащий низкомолекулярные фракции продуктов реакции, обрабатывают Н<sup>+</sup>-катионообменником до установления стабильной величины рН в диапазоне 3-7, отделяют от твердых частиц и стерилизуют.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что экстракцию сырья, обогащенного полисахаридами, осуществляют при рН 6-14, а после отделения от экстракта твердых частиц его стерилизуют и производят ультрафильтрацию при степени разделения 40-70 кД, отбирая для дальнейшей обработки раствор, содержащий вещества с низкой

молекулярной массой.

3. Способ по пп. 1 и 2, отличающийся тем, что после отделения твердых частиц экстракт, полученный из сырья, обедненного полисахаридами, обрабатывают щелочным агентом до pH выше 8, отделяют от твердых частиц и подвергают ультрафильтрации при степени разделения 18 38 кД, отбирая для дальнейшей обработки раствор, содержащий вещества с низкой молекулярной массой.

4. Способ по пп.1 3, отличающийся тем, что разделение по молекулярным массам продуктов реакционной смеси осуществляют при степени разделения 18 38 кД.

5. Способ по пп.1 4, отличающийся тем, что после отделения твердых частиц целевой раствор фильтруют от пирогенов.

6. Способ по пп.1 5, отличающийся тем, что сырье, обогащенное полисахаридами, выбирают из группы, включающей натуральное древесное сырье, древесные вещества, полученные с применением биотехнологий при использовании культивирования растительных клеточных культур, синтетические древесные аналоги, полученные методом Фрейденберга из продуктов полимеризации с применением дегидрирования моно- и/или дилигнолов с последующим нанесением их на полисахариды, лигнинполисахаридные комплексы, полученные щелочной экстракцией хлоритдревесной целлюлозы, и их смеси.

7. Способ по пп.1 6, отличающийся тем, что сырье, обедненное полисахаридами, выбирают из группы, включающей натуральные продукты обезуглероживания, лигнолитически активные микроорганизмы, белую плесень, биоконвертируемое древесное сырье, древесное сырье, биоконвертированное воздействием выделенных лигнолитических ферментов, например фенолоксидазы, древесное сырье и их смеси.

8. Способ по пп.1 7, отличающийся тем, что в качестве щелочных агентов для создания pH экстрактов выше 8 используют КОН, NaOH, LiOH и аммиак.

9. Способ по пп.1 8, отличающийся тем, что при экстракции сырья, обогащенного полисахаридами, получают раствор, имеющий концентрацию извлеченных продуктов 0,05 10 мас. предпочтительно 2 или

0,1 мас.

10. Способ по пп.1 9, отличающийся тем, что экстракцию сырья, обогащенного полисахаридами, осуществляют при pH 12 14 водным раствором КОН 1 10 дней при комнатной температуре.

11. Способ по пп.1 10, отличающийся тем, что экстракцию сырья, обогащенного полисахаридами, проводят при повышенной температуре, не превышающей 120°C, причем при 100 120°C экстракцию осуществляют в автоклаве.

12. Способ по пп.1 11, отличающийся тем, что в качестве сырья, обедненного полисахаридами, используют продукты обезуглероживания древесного сырья, выбранные из группы, включающей лигниты, "цветные угли" и бурый уголь.

13. Способ по пп.1 12, отличающийся тем, что экстракцию сырья, обедненного полисахаридами, проводят в растворе КОН при концентрации КОН 0,1 - 0,8 моль/л, предпочтительно 0,4 моль/л, при комнатной температуре.

14. Способ по пп.1 13, отличающийся тем, что после смешивания двух экстрактов и доведения pH полученной реакционной смеси до 8 14 ее выдерживают 7 10 дней при комнатной температуре, причем создание pH 8 14 осуществляют с помощью КОН.

15. Способ по пп.1 13, отличающийся тем, что экстракцию сырья, обедненного полисахаридами, проводят при температуре от комнатной до 120°C, предпочтительно при pH 10 12.

16. Способ по пп.1 15, отличающийся тем, что разделение продуктов реакции по молекулярным массам в целевом растворе осуществляют ультрафильтрацией при низком давлении на устойчивых к щелочам мембранах.

17. Способ по пп. 1 16, отличающийся тем, что для обработки целевого раствора на H<sup>+</sup>-катионообменнике используют катионообменники из искусственных смол, при этом обработку проводят в токе водорода до установления стабильного значения pH в диапазоне 4 6,8, предпочтительно 5 - 6.

18. Способ по пп.1 17, отличающийся тем, что стерилизацию целевого раствора осуществляют в автоклаве при 121 °C в течение 14 мин.

50

55

60

Таблица 1

№№	Дельта/част. ppm на мил./	Интенсивность	Соотношение
1	190,5-198	слабый мультиплет	Альфа-карбонил и группы коричневого альдегида
(2)	168-180	слабый мультиплет	Карбоксильные группы
(3)	164,0	слабый	
(4)	158,2	сильный синклет	С-4 в п-гидрокси фениле (С-3/5 в сирингиле)
(5)	150,5	слабый	С-4 в гуаяциле
(6)	148,5	слабый	С-3 в гуаяциле
(7)	93-145	широкий мультиплет	С-1 (2/5/6 в гуаянциле и С-1/2/4/6 в сирингиле)
(8)	88,4	слабый	С-В в арилглицерин-В-этиловых эфирах
(9)	70,0	средний	
(10)	67,9	средний	
(11)	67,4	средний	
(12)	66,2	слабый	
(13)	64,8	сильный	С-гамма в фенилкумаранах и С-гамма и С-В в В-1-диглиголединица
(14)	63,8	средний	С-гамма в коричных спиртах и арилглицерин-В-ариловых эфирах с альфа карбонилем
(15)	60,7	средний	С-гамма в арилглицерин-В-ариловых эфирах
(16)	58,6	средний	ОСН <sub>3</sub>
(17)	0-55	широкий мультиплет	алифатические, преимущественно не связанные с кислородом С-атома

Ср. Х. Людеман и Х. Нимц,  
175, 2409 (1974)

Таблица 2

Исследование варианта А88-1 из примера 1 на плато с 24-перфорацией  
на торможение образования синцитий

Концентрация	Сверхмикроскопическая оценка на 3-4 день после инфекции	
	образование синцитий	совместимость
200	-	хорошие колонии
100	-	хорошие колонии
50	-	хорошие колонии
20	+	хорошие колонии
2	++	хорошие колонии
0,2	++	хорошие колонии
позиционный контроль	+++	хорошие колонии

- синцитий не образуется,

+ отдельные случаи образования синцитий (1-10)

++ значительная степень образования синцитий (10-50)

+++ сильное образование синцитий (менее 50)

Таблица 3

Исследование варианта А88-4 на плато с 24-перфорацией  
на ингибирование образования синцитий

Концентрация мкг/мл	Светомикроскопическая оценка на 3-4 день после инфицирования	
	образование синцитий	жизнеспособность
200	-	хорошие колонии
100	-	хорошие колонии
50	-	хорошие колонии
20	+	хорошие колонии
позиционный контроль	+++	

Таблица 4

Концентрация (мкг)	Образование синцитий на день		
	2	3	4
1	+	+	+
5	+	+	+
10	+/-	+/-	+/-
25	-	-	-
35	-	-	-
50	-	-	-
75	-	-	- <sup>x</sup>
100	-	-	- <sup>x</sup>
150	цитотоксический		

<sup>x</sup> слабая цитотоксичность

Таблица 5

Лаборатория 1

Концентрация активного вещества	% торможения p24		
	Адаптоген 2 мг/мл	Адаптоген 16 мг/мл	
1	более 30	30-50	
4	более 30	50-70	
10			50-70
20	50-70	менее 75	
50			менее 75
100	менее 75.	менее 75	токсич.
500	токсич.	менее 75	токсич.

## Лаборатория 2

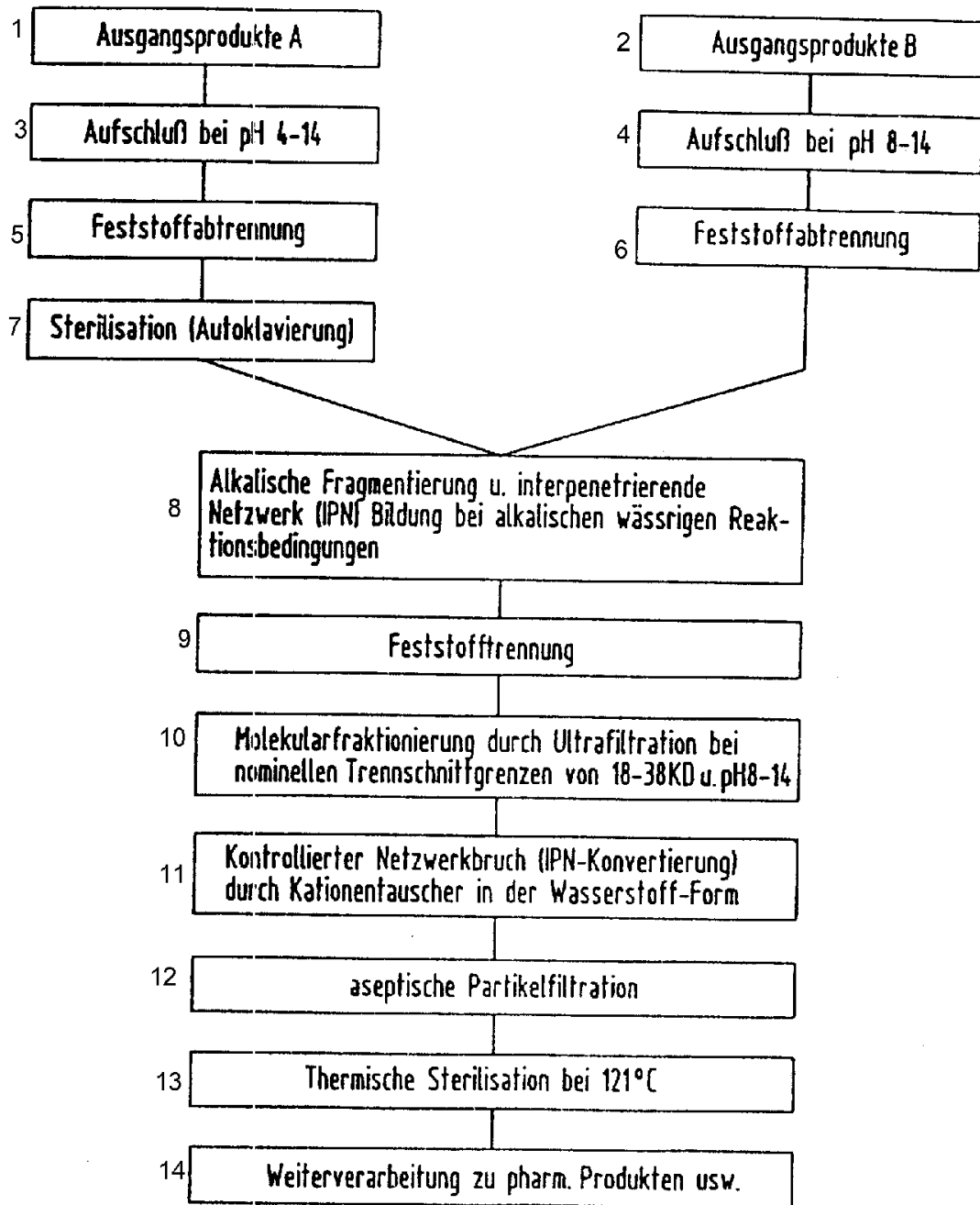
% торможения образования синцитий			
Концентрация активного вещества	Адаптоген 2 мг/мл	Адаптоген 16 мг/мл	
0,1	33		
0,16		14,5	
1	50		
1,6			
10	82		
16		88	
48		100	
100	100		
160		100	
500			
EC 50	1 мг/мл	1 мг/мл	

Таблица 7

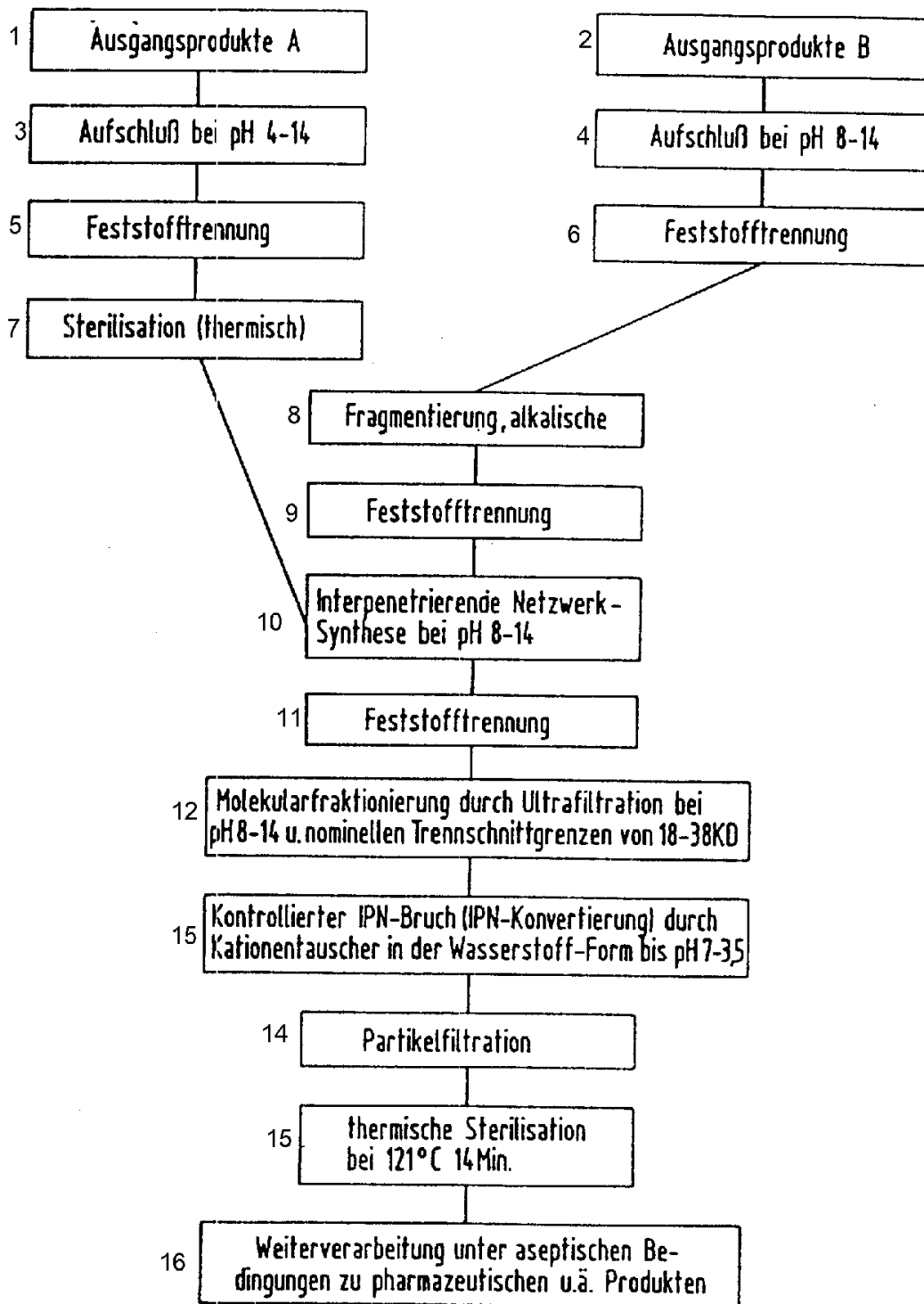
Разбавление	ДМЕМ	Конечная концентрация в среде (100 мкл, мл)	
1:10	200 мкг/мл	10 мкг/мл	(1)
1:100	20 мкг/мл	1 мкг/мл	(2)
1:1000	2 мкг/мл	100 нг/мл	(3)
1:10000	200 нг/мл	10 нг/мл	(4)
1:100000	20 нг/мл	1 нг/мл	(5)

RU 2104016 C1

RU 2104016 C1

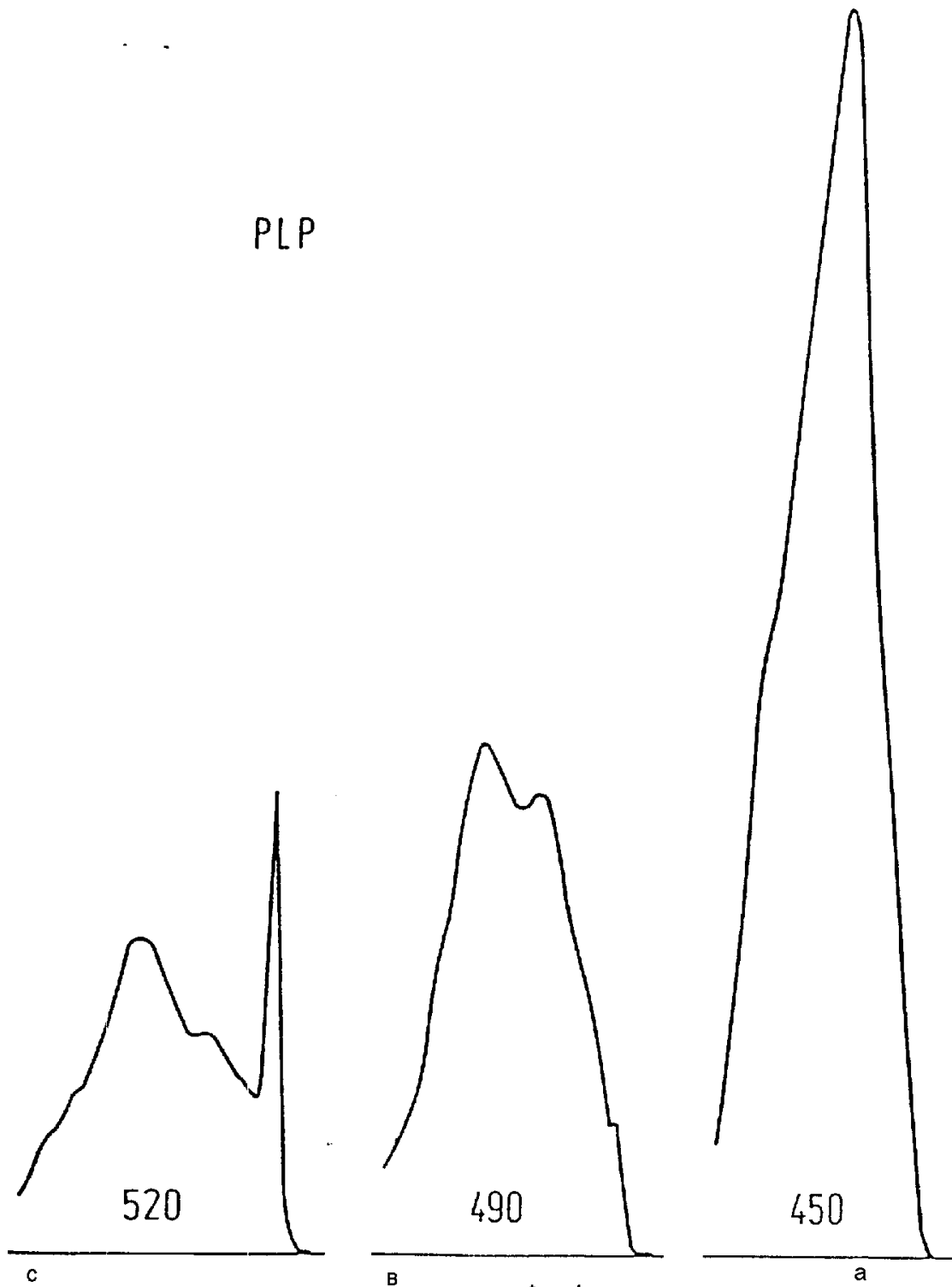


Фиг.2

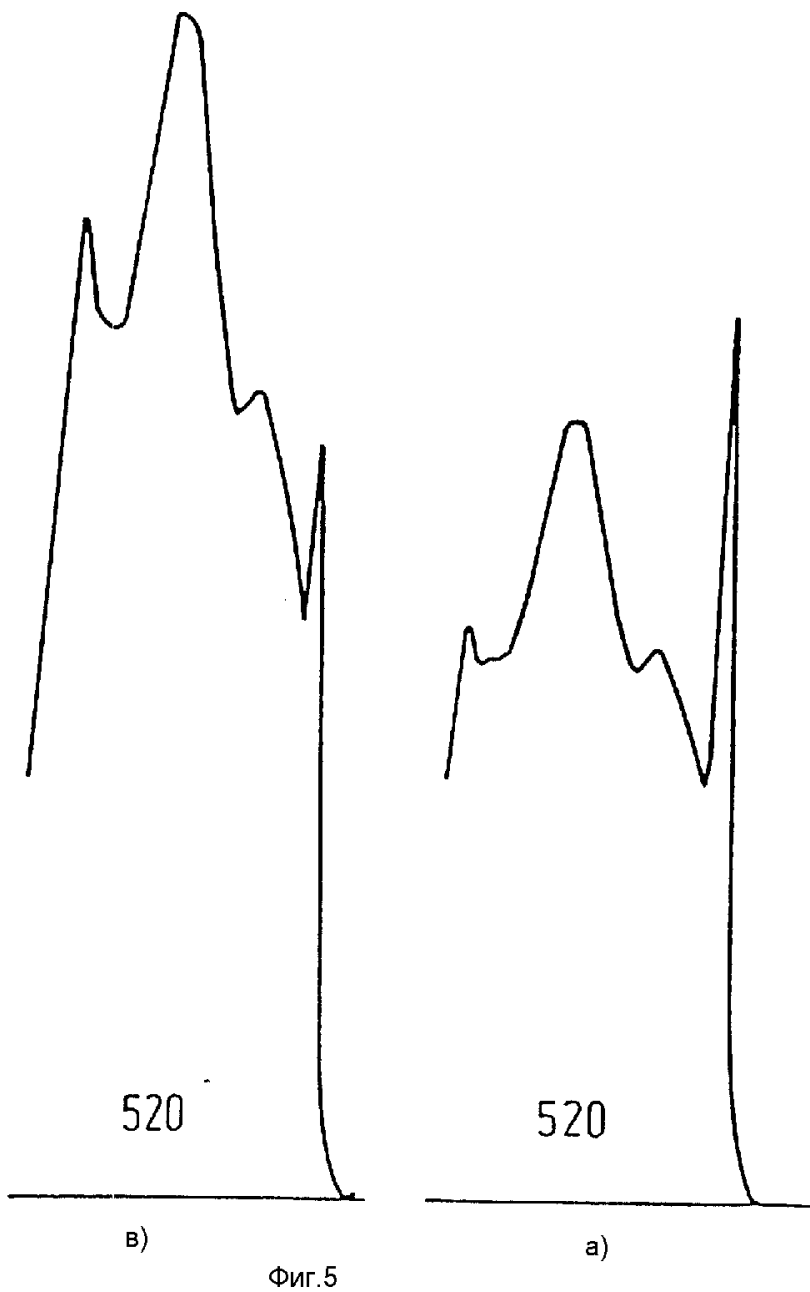


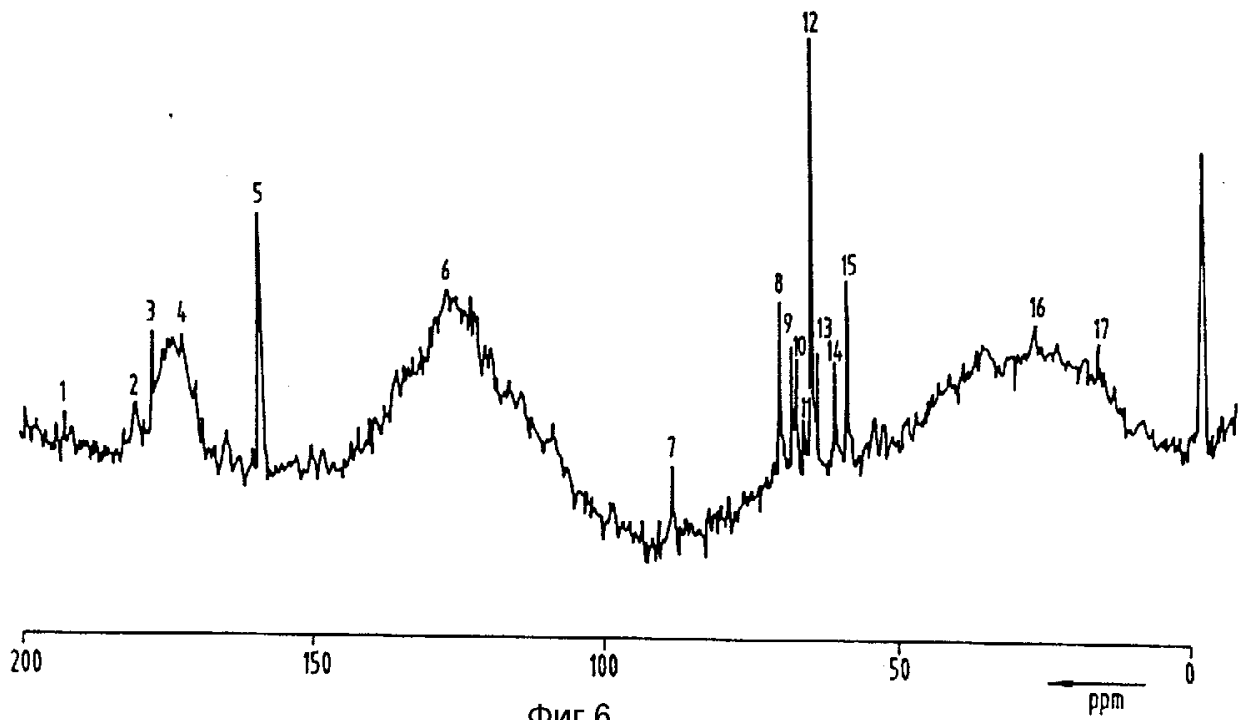
Фиг.3

RU 2104016 C1



RU 2104016 C1



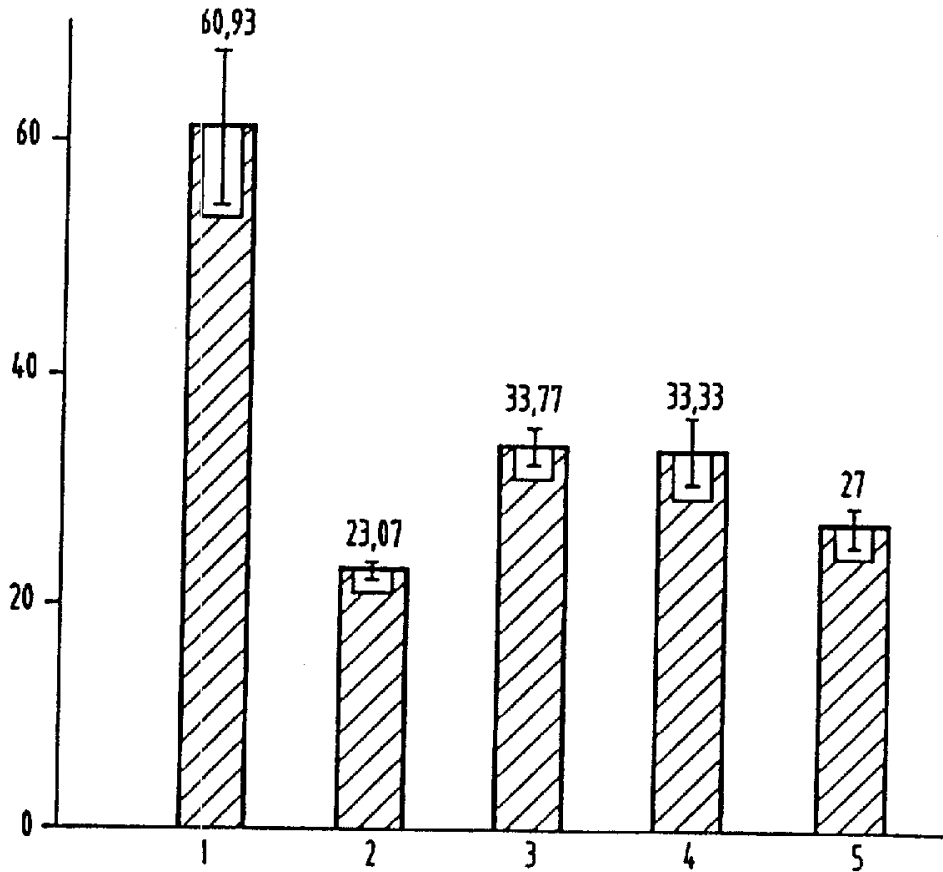


ФИГ.6

RU 2104016 C1

RU 2104016 C1

1a LEBENDE ZELLEN IN PROZENT (SURVIVAL)  
nach 24 Stunden in Kultur



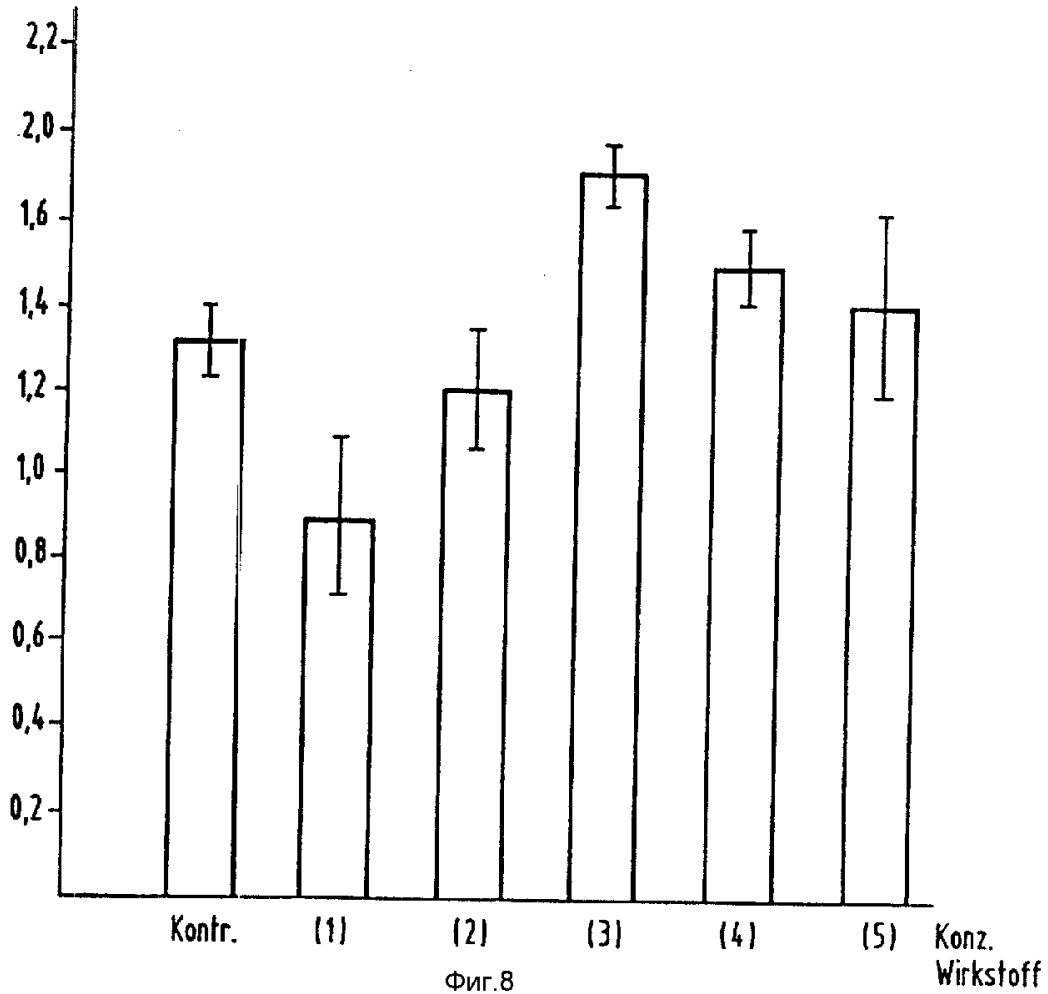
- 1) Survival ohne Belichtung nach 24 Stunden
- 2) nach Belichtung ohne Wirkstoff
- 3) nach Belichtung und nach Zugabe von 1µg/ml Wirkstoff
- 4) nach Belichtung und nach Zugabe von 0,1µg/ml Wirkstoff
- 5) nach Belichtung und nach Zugabe von 0,01µg/ml Wirkstoff

Фиг. 7

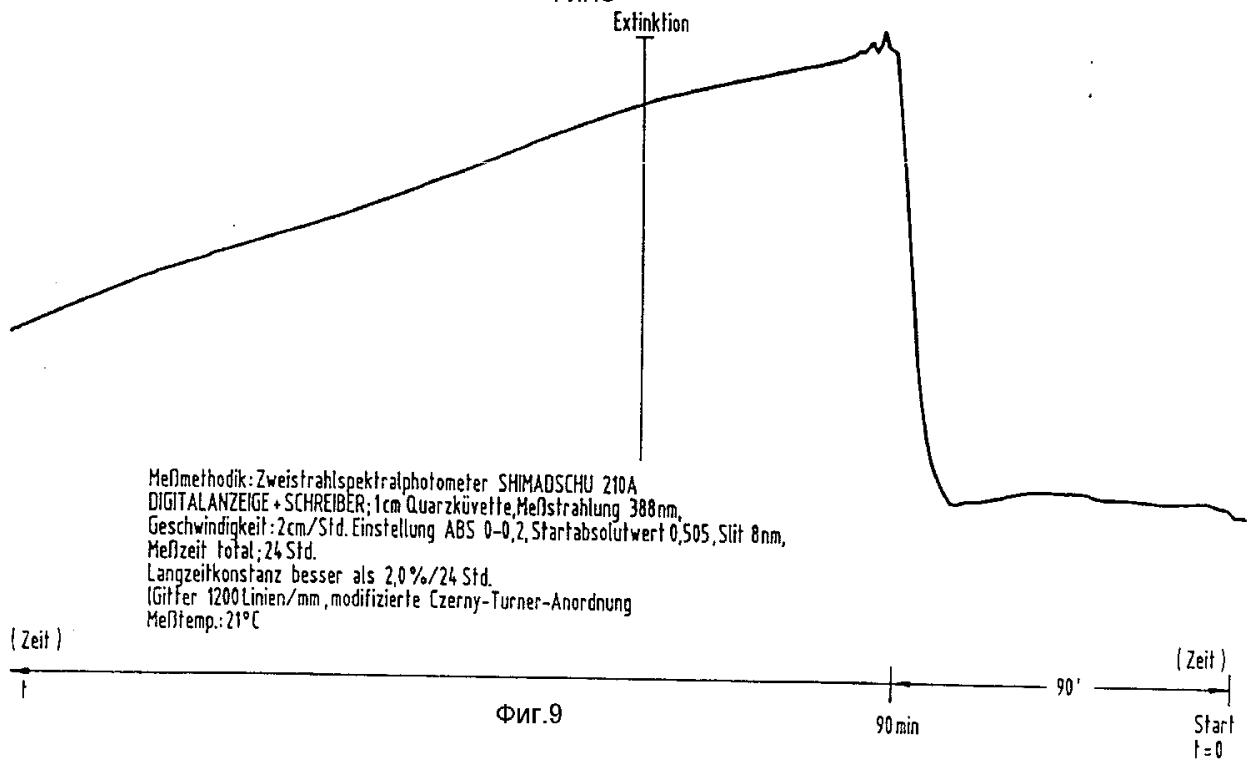
RU 2104016 C1

RU 2104016 C1

VITALTEST HIPPOKAMPUS NEURONEN NACH 48 STUNDEN IN-VITRO  
 VERHÄLTNIS LEBENDE/TOTE ZELLEN



Фиг. 8



Фиг. 9

RU 2104016 C1

RU 2104016 C1