



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 098 114** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК⁶ **A 61 K 35/78, 31/715**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95101449/14, 03.02.1995

(46) Дата публикации: 10.12.1997

(71) Заявитель:

**Музыка Владислав Иванович,
Колонина Ирина Владимировна**

(72) Изобретатель: Музыка В.И.,

Колонина И.В., Курапов П.Б., Ванчиков А.Н.

(73) Патентообладатель:

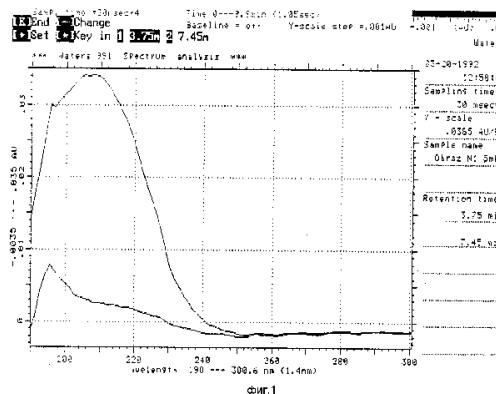
**Музыка Владислав Иванович,
Колонина Ирина Владимировна**

(54) ПРЕПАРАТ, ВОЗДЕЙСТВУЮЩИЙ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ И ПРОКАРИОТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии. Предложен полисахарид общей формулы $(C_6H_{12}O_6)_3-12 \bullet K_{0,2-5}$, имеющий характеристический максимум в ультрафиолетовой области при 267-276 нм, способный воздействовать на функциональную активность клеток и клеточных структур. Полисахарид оказался перспективным в качестве лечебно-профилактического или стимулирующего препарата для применения в медицине, ветеринарии, прикладной биотехнологии. Полисахарид выделен из растения Унгерния Виктора, содержится в ряде других растений. Может быть получен водной экстракцией биомассы каллусной ткани при ее культивировании (каллус

получается из растений рода Унгерния (Унгерния Виктора, Унгерния Северцева). 2 з.п.ф-лы, 4 ил.



RU 2 098 114 C1

RU 2 098 114 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 098 114** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 35/78, 31/715**

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95101449/14, 03.02.1995

(46) Date of publication: 10.12.1997

(71) Applicant:

**Muzyka Vladislav Ivanovich,
 Kolonina Irina Vladimirovna**

(72) Inventor:

**Muzyka V.I.,
 Kolonina I.V., Kurapov P.B., Vanchikov A.N.**

(73) Proprietor:

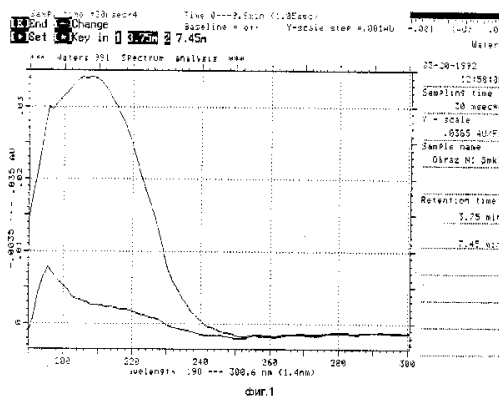
**Muzyka Vladislav Ivanovich,
 Kolonina Irina Vladimirovna**

(54) **PREPARATION EFFECTING THE EUCARYOTIC AND PROCARYOTIC CELL FUNCTIONAL ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry. SUBSTANCE: invention proposes polysaccharide of the general formula $(C_6H_{12}O_6)_{3-12} \cdot K_{0,2-5}$ exhibiting characteristic maximum in UV-region (at 267-276 nm). Polysaccharide is isolated from the plant Ungernia Victor and can be prepared by an aqueous extraction of callus tissue biomass at its culturing (callus was obtained from plants of genus Ungernia). Polysaccharide shows capability to effect on functional activity of cells and cellular structures and can be used in medicine, veterinary science and applied biotechnology as a curative-prophylaxis and stimulating preparation. EFFECT: enhanced effectiveness

of the preparation. 3 cl, 4 dwg



RU 2 098 114 C1

RU 2 098 114 C1

Изобретение относится к биохимии, а именно к препаратам, воздействующим на функциональную активность клеток и клеточных систем, в частности, в условиях неблагоприятных внешних воздействий, в частности в фазе роста в условиях нехватки питательных веществ, а также оказывающим на клетку оздоровительное или лечебно-профилактическое воздействие.

Среди биологически-активных веществ, обладающих воздействием на функционирование биоэнергетических систем клеток и нашедших практическое применение, известны такие препараты как цитохром С, убихинон, ионол.

В частности, убихинон (коэнзим Q) в дозе 200 мг/кг веса оказывает нормализующее воздействие на клетки в условиях некоторых гипоксий, являясь природным переносчиком электронов и занимая центральное место в цепи ферментов электронного транспорта, реагируя с тремя ферментными системами: НАД Н₂-оксидазой, сукцинат-СоО-редуктазой и системой цитохромов (Микробиология, 1979, 48, N 6, М. Г.И.Андреева "Влияние убихинонов и их аналогов на активность ферментов дыхательной цепи", с. 969-974). Однако узкая область использования, сложная технология получения (многостадийный химический синтез или экстракция из микроорганизмов с последующим концентрированием и очисткой), относительно невысокая эффективность затрудняют использование убихинона.

Ионол (2,6-ди-(трет-бутил-4-метилфенол) является антиоксидантом, это ингибитор синтеза RNK и свободно-радикальных процессов.

Препарат цитохром С выделен биологическим путем, структура не установлена. Препарат воздействует не процессы тканевого дыхания.

Применение названных препаратов ограничено относительно невысокими защитными возможностями при воздействии на клетку стрессовых воздействий, а также недостаточно нормализующими гомеостатическими свойствами при наличии в клетке негативных отклонений, вызванных указанными воздействиями, сложной технологией получения, высокой себестоимостью.

Известно применение для подобных целей препаратов, как правило экстрактов и настоек растительного происхождения настойки лимонника, женьшеня, левзеи, радиолы розовой, аралии, элеутерококка (Машковский М.Д. Лекарственные средства, М. Медицина, 1985, т. 1, с. 137-143).

Недостатком указанных соединений является то, что они обладают возбуждающим действием, имеют ограниченный спектр применения, достаточно дефицитны и относительно малоэффективны в связи с низкими концентрациями активного начала в получаемых растворах.

Среди препаратов, получаемых из растительного сырья, воздействующих на функциональную активность клеток, известен, в частности, и галактомин, выделяемый из клубней подснежника Воронова, амарилисов, а также содержащийся в листьях Ungernia Victoris. Препарат является ингибитором холинэстеразы, способствует

нервно-мышечной проводимости, показан при двигательных и чувствительных нарушениях (Шарков П.Л. и др. Вестник рентгенологии и радиологии, 1974, N 2, с. 41-45. Авдусалатов А. Алкалоиды Pediculari, Ungernia, Galanthus, Авт.дисс.д.х.н. Ташкент, 1972).

Недостатком препарата является относительно высокая токсичность, узкий спектр действия.

Наиболее близкими по структуре к заявляемому является препарат полисахаридов полиглиукин, имеющий молекулярную массу 60000 ± 10000 , получаемый гидролизом декстрана из сахарозы с использованием *L.mesenteroides*. Препарат имеет общую формулу $(C_6H_{12}O_6)_n$, где n 300-400, и используется в качестве плазмозаменителя, в частности при шоке и кровопотере (Машковский М.Д. Лекарственные средства. М. 1985, т.2, с.100).

Недостатком указанных полисахаридов является недостаточное по эффективности воздействие и узкое по спектру воздействие на функциональную активность клеток.

В основу изобретения положена задача нахождения вещества, обладающего более эффективным воздействием, в первую очередь стимулирующим и регуляторным, на функционирование клеток эукариот и прокариот и сочетающего высокую эффективность, широкий спектр действия и минимум побочных отрицательных эффектов при введении в организм эффективных количеств препарата.

Эта задача решается использованием полисахарида общей формулы $(C_6H_{12}O_6)_nK_m$, где n 3-12, m 0,2-5. Полисахарид является порошком, хорошо растворимым в воде и спирте, имеет характеристические пики в ультрафиолете в области 267-276 нм.

Данное соединение было получено из экстракта каллусной ткани *Ungernia Victoria* (растения третичного периода, эндемического для Гиссарской долины (Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР, М. 1976, с.317)), однако в микроколичествах содержится в различных частях этого растения, а также некоторых других растений, например подорожнике, унгернии Северцева, амарилисе. Наряду с природным сырьем полисахарид получают культивированием с использованием биотехнологических методов ткани указанных растений.

Проведенные эксперименты, в частности, с помощью методов масс-спектропии показали, что полученный активный препарат содержит смесь полисахаридов различной мол. м. (540-2200), имеющих по данным количественного анализа содержание С, Н и О, соответствующее моносахаридному звену при одновременном наличии в препарате в зависимости от источника получения полисахарида 1,3-10% К, что соответствует заявленному соотношению ингредиентов в формуле.

Выделение отдельных фрагментов полисахаридной смеси и их более детальный анализ не проводился из-за низкого содержания активного начала в получаемом экстракте, характеризуемом долями процента. Вместе с тем, как показали эксперименты, обработка клеточных систем водными или водно-спиртовыми растворами, содержащими 10^{-5} - 10^{-12} г/л, оказывает эффективное

воздействии на их функционирование.

Изучение свойств препарата, получившего условное наименование "Влаирин", проводилось на клетках бактерий, человека, тканях и клеточных системах, а также живом организме в целом.

Препарат "Влаирин" выделялся как экстракцией (условия) биомассы *Ungernia victoris* (нативный препарат), так и экстракцией каллусной растительной ткани растений рода *Ungernia* (*Ung. victoris*, *Ung. Sewerzawoe*).

Для нативного препарата характеристичным являлась общая формула $(C_6H_{12}O_6)_nK_m$ при n 3-8, m 0,2-1,0, для препарата, полученного культивированием, как правило, n 3-12, m 2,0-5,0.

Сопоставление хроматограмм УФ-спектров, масс-спектров и данных электрофореза (фиг. 1-3) показало сходность набора компонентов смесей при различии соотношений входящих в них ингредиентов.

Сопоставление биологической активности фракций различного происхождения показало идентичность воздействия на клеточные системы в таких тестах, как радиозащитное действие, заживляющее воздействие на раневую поверхность, стимулирующее воздействие на рост клеток и привес молодняка птиц, что позволяет рассматривать препарат независимо от источника его происхождения как единое изобретение.

Механизм воздействия препарата "Влаирин" на клетку в настоящее время окончательно не установлен, однако полученные данные позволяют предположить, что воздействие на клетку обусловлено сочетанием репарационного воздействия на клеточные мембраны с ускорением осмотических процессов, включая K-Na обмен через стенку клетки вследствие появления дополнительной поляризации ее фрагментов. Одновременно можно предполагать, что вводимый полисахарид способен ингибировать радикальные и перекисные процессы в тканях и связывать некоторые токсические метаболиты.

Опыты, проведенные на животных, показали, что препарат характеризуется полной безвредностью, отсутствием мутагенного, канцерогенного, генотоксического действия.

В частности, LD₅₀ при пероральном применении установить не удалось, т.к. введение препарата в дозах, превышающих эффективную в 20 тысяч раз, не оказало негативного действия на животных.

Генотоксичность препарата была изучена с помощью SOS-хромотеста (Quillardet P. Huisman O. Hofnung M. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, 79, p. 5971-5975. Quillardet P. Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins; procedures. Mutat. Res. 1985 147, p.67-68. Labsystems Oy (1988). Bio SOS. Software User's Guide.)

Тест включал в себя ДНК-повреждающую и SOS-индуцирующую активность, УФ-мутагенез, индукцию профагов и т.д.

Тест проводился на микробиологическом анализаторе "Bioscreen" (Labsystems) с использованием штамма *E.coli* PQ 37.

В результате проведенных экспериментов было показано, что препарат не является генотоксичным в концентрациях по крайней мере до 3,8 мг/мл, что более чем в 5000 раз превышает эффективную дозу.

Способ получения и области применения вещества иллюстрируются примерами.

Пример 1. Получение нативного препарата.

1 кг растения Унгерния Виктора, собранного в Гиссарской долине, промывали 4 л воды водопроводной, после чего ополаскивали 300 мл дистиллированной воды, после чего измельчали на части размером 3-5 мм и экстрагировали в течении 6 ч 1 л дистиллированной воды при комнатной температуре.

Полученный после экстракции нерастворимый осадок шрот отделяли, а экстракт поступал на стадию очистки от органических кислот и фенольных соединений.

На стадии очистки 0,8 л экстракта обрабатывали в сепараторе 0,5 л этилацетата при pH 2,0 и скорости перемешивания 1-3 об/мин 0,6 л органического слоя отделяли и отправляли на регенерацию этилацетата, а 0,5 л водного остатка смешивали с 0,5 л этанола.

Полученный раствор содержал 0,2 мг активного вещества и использовался для проведения испытаний.

Активное вещество, выделенное методом вакуумного упаривания нескольких порций концентрата, представляло собой смесь полисахаридов общей формулы $(C_6H_{12}O_6)_{3-8} \cdot K_{0,8}$

Ультрафиолетовый спектр, имеющий максимум при 267-276 нм и масс-спектрокопия полимера приведены на фиг. 1, 2.

Также обработка, проведенная с использованием в качестве источника сырья растение Унгерния Северцева, позволила получить 0,05 мг активного начала, содержащего 65% полисахарида общей формулы $(C_6H_{12}O_6)_{4-10} \cdot K_{0,2}$ имеющего аналогичный спектр.

Пример 2. 1 кг каллусной ткани Унгерния, здоровой и неповрежденной грибами или бактериями, промывался 5 объемами воды для удаления остатков культуральной среды, а затем обрабатывался по методике примера 1. Полученный экстракт содержал 0,05 мг полисахарида общей формулы $(C_6H_{12}O_6)_{3-12} \cdot K_5$.

Характеристический спектр и результаты масс-спектрокопии приведены на фиг. 3-4.

Пример 3. воздействие препарата "Влаирин" на функциональную активность клеток.

Эксперименты по воздействию препарата "Влаирин" проводились на системах перевиваемых клеток человека Hela и бласттрансформированных лимфоцитах по методике (Засухина Г. Д. и др. Вопросы вирусологии, 1981, N 1. с. 94-96; Hangerfort D.A. Stein. Techn. 1965, v. 40, p. 333-338).

Клетки Hela выращивали в стационарных условиях (Засухина) в течение 48-72 ч, после чего в среду вносили препарат в различных разведениях и считывали количество клеток, выросших в матрасах через 48 ч. Было установлено, что добавка 10^{-4} препарата

повышает количество клеток на $10 \pm 5\%$
 10^{-5} на $30 \pm 7\%$ 10^{-7} на $3 \pm 3\%$

Дальнейшие эксперименты проводили с концентрацией препарата 10^{-5} на матрасах объемом 100 мл по 100 клеток на матрасе. Количество клеточных колоний определяли через 14 дней прокрашиванием красителем Гимза. В результате было установлено, что число колоний возросло с 66 ± 5 до 87 ± 7 (на 32%), причем число колоний, содержащих более 50 клеток увеличилось с 4 до 10.

Лимфоциты культивировали по обычной методике (Hangerfort). Через 1 ч после стимуляции клеток ФГА в среду вводили препарат в концентрации 10 мкл/л (разведение 10^{-5}). На 66 часу роста число клеток по сравнению с контролем возросло на $25 \pm 7\%$

Полученные эксперименты показали, что применение препарата "Влаирин" стимулирует рост клеток человека, в частности, повышая их пролиферативную активность.

Пример 4. Влияние препарата "Влаирин" (культ.) на активность ферментов дыхательной цепи изучали на кроликах массой 1,5-3,5 кг по оценке состояния ферментов цепи передачи электронов мозговой ткани кроликов при гипоксии и в ранний восстановительный период. Гипоксическое состояние достигалось забором крови. На стадии трансфузии контрольной группы вводили кровь, обогащенную кислородом.

В табл. 1 представлены данные по отношению концентраций окисленной формы флавопротеинов к восстановительной форме NADH (K), парциальному давлению кислорода (P_{O_2}) окислительно-восстановительному потенциалу крови (E_{MB}) при введении водного раствора 10^{-5} г/мл названного препарата в дозе 35 мг/кг, а также по потреблению глюкозы ($C_{гп}$) и содержанию молочной кислоты ($C_{мк}$) при введении 10 мг/кг указанного раствора.

Полученные данные показали, что введение препарата вызывает немедленный запуск ферментов дыхательной цепи.

Пример 5. Противовирусную активность препарата "Влаирин" и ремантадина исследовали на развивающихся куриных эмбрионах.

В аллантаисную полость одиннадцатидневных куриных эмбрионов вводили по 0,2 мл раствора нативного препарата в дистиллированной воде (доза препарата 10^{-6} мг/кг). Второй партии эмбрионов вводили препарат сравнения - ремантадин в оптимально рекомендуемой дозе 4 мг/кг. Объем вводимого препарата также 0,2 мл. Контрольной серии эмбрионов вводили равный объем воды. Затем эмбрионы инкубировали в термостате при 37°C в течение 2 ч, вводили вирус болезни Ньюкастла NDV штамм Н в дозе 10 ИД/0,1 мл. Инфицированные эмбрионы дополнительно инкубировали в термостате 48 ч и определяли наличие в них вируса по реакции агглютинации. Результаты представлены в табл. 2.

Пример 6. Препарат "Влаирин" (культуральный) был испытан в опытах по

откармливанию бройлеров на Братцевской птицефабрике Московской области.

5 Препарат задавался цыплятам с кормовой смесью с 5 по 360-ые сутки из расчета 0,085 г/кг веса в стаде из 500 голов молодняка кур породы Ломен Браун. На 35-е сутки вскармливания средний вес курицы составил 350 ± 9 (контроль 335 ± 11), петушка 430 ± 12 (410 ± 9).

10 Отмечалось, что количество птиц с поврежденным оперением в опыте на 20% ниже, чем в контроле.

Падеж в опытном стаде отсутствовал, в контроле он составил 0,5%

15 Пример 7. Воздействие препарата "Влаирин" на функциональную деятельность организма.

20 а) Больная К. возраст 23 г. обратилась в поликлинику с жалобами на нерегулярные менструации с болевым синдромом, отсутствие беременности на протяжении двух лет супружества. Диагноз лечащего врача: дисфункция яичников. Лечение препаратом "Влаирин" (нативный) проводилось в течение двух месяцев перорально по 5 капель 3 раза в день. По прошествии курса лечения у пациентки наступила беременность, проходившая в последующем без существенных осложнений и завершившаяся нормальными родами.

25 б) Больная Н. 71 лет обратилась в июле 1993 г в поликлинику по поводу возрастной депрессии, общего упадка сил (невозможность передвигаться), расстройств сна, отсутствие аппетита. Лечение препаратом "Влаирин" перорально 3 раза в день по 4 капли проводилось в течение 1,5 мес. Уже через 2 недели лечения больная почувствовала значительное улучшение состояния. По окончании лечения у пациентки 30 наблюдалось полное восстановление функций (нормализовался сон и аппетит, способность к передвижению). Она способна полностью обслуживать себя, включая обеспечение продуктами и уборку дома. До настоящего времени осложнения и жалобы отсутствуют.

35 в) Больной К. обратился с просьбой о помощи по поводу неоперабельного рака печени и желудка (диагноз поставлен после операции). Состояние больного: расстройство 40 пищеварения, острые боли в области печени и всего живота. Прогноз отрицательный.

45 Лечение препаратом "Влаирин" проводится периодически повторяющимися курсами по 2 мес приема препарата по 8 50 капель экстракта 3 раза в день перорально, затем 1 мес перерыв, на протяжении 1,5 лет. В настоящее время пациент трудоспособен (режим труда общий), жалобы отсутствуют.

55 Пример 9. Воздействие препарата "Влаирин" (культуральный) на микроорганизмы на примере бактерий.

60 Эксперимент проводили на клетках микроорганизма рода *Escherichia coli* штамм М-17, выращенных на глюкозо-минеральной питательной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 1,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1,0; NaCl 5,0; Na_2CO_3 2,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; цитрат аммония 4,4; никотиновая кислота 0,005; глюкоза 0,3.

Было проведено изучение электрокинетического потенциала клеточной популяции до и после введения заявляемого препарата для живых и мертвых клеток

названных микроорганизмов.

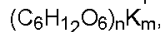
Результаты проведенного испытания показали, что при введении в культуру препарата в дозе 10^{-8} мг/л подвижность клеток микроорганизма *Escherichia coli* возрастает на 2,4 мв (по сравнению с контрольной клеточной популяцией, не испытывающей влияния препарата).

При дозе 10^{-5} мг/л подвижность клеток возрастает на 7,3 мв (по сравнению с контрольной популяцией).

Таким образом, введение препарата повышает фототрофическую подвижность живых клеток, что связано с изменением их биоэнергетических функций.

Формула изобретения:

1. Полисахарид общей формулы



где $n \geq 12$;

$m \geq 0,25$,

имеющий характеристический максимум в ультрафиолетовой области при 267 - 276 нм, в качестве препарата, оказывающего воздействие на функциональную активность клеток и клеточных структур.

2. Полисахарид по п. 1, отличающийся тем, что он выделен из биомассы *Ungernia victoris*.

3. Полисахарид по п.1, отличающийся тем, что выделен из каллусной ткани растений рода *Ungernia*.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-6-

RU 2098114 C1

RU 2098114 C1

Таблица 1

Влияние препарата на активность ферментов в мозговой ткани кроликов
после трансфузии (через дробь дается контроль)

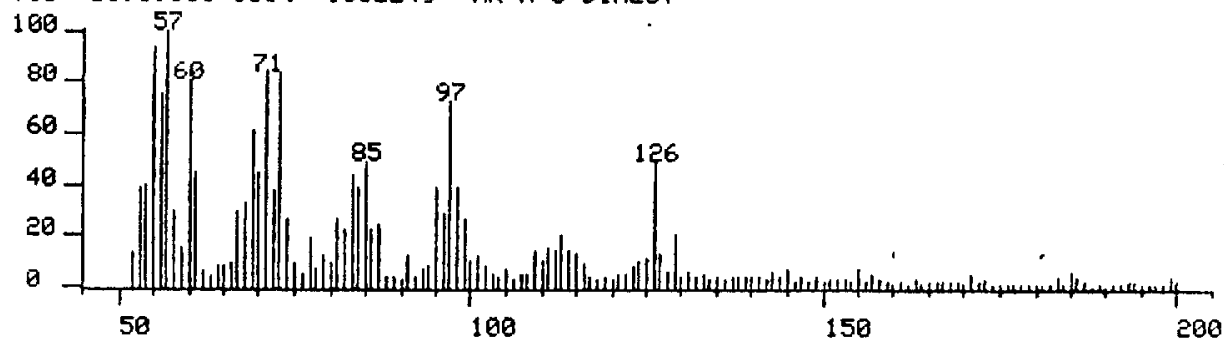
Время	К	Р _{о2}	Е _{мв}	сгл	смк
гипоксия	0,135/0,135	20/20	-183/-183	-	25/27
сразу после трансфузии	0,21/0,12	100/21	-160/-173	8/10	38/42
через 30 минут после трансфузии	0,20/0,11	260/24	-152/-160	16/3	30/32
через 60 минут после трансфузии	0,34/0,12	230/64	-144/-163	24/4	22/28
Норма	0,275	100	-91		

Таблица 2

Сравнительная противовирусная активность заявляемого соединения
и ремантадина

Препарат		Кол-во эмбрионов в опыте	Кол-во вирусосодержащих эмбрионов		Кратность защиты/ титр вируса
тип	доза, мг/кг		штуки	%	
заявляемый препарат	10 ⁻⁶	25	3	12	7,8/1,5
ремантадин	4	25	8	32	2,9/4,0
контроль	-	25	23	92	-/194

EXACT NOMINAL MULTIPLET REF / LOCK EXC / HALF SIGNIFICANT SATURATED
DS90 qwerty3.100 RT= 10:10 +EI SLRP 11/06/91 00:52 SUB
TIC= 36909060 100%= 1802240 МК N 3 DIRECT

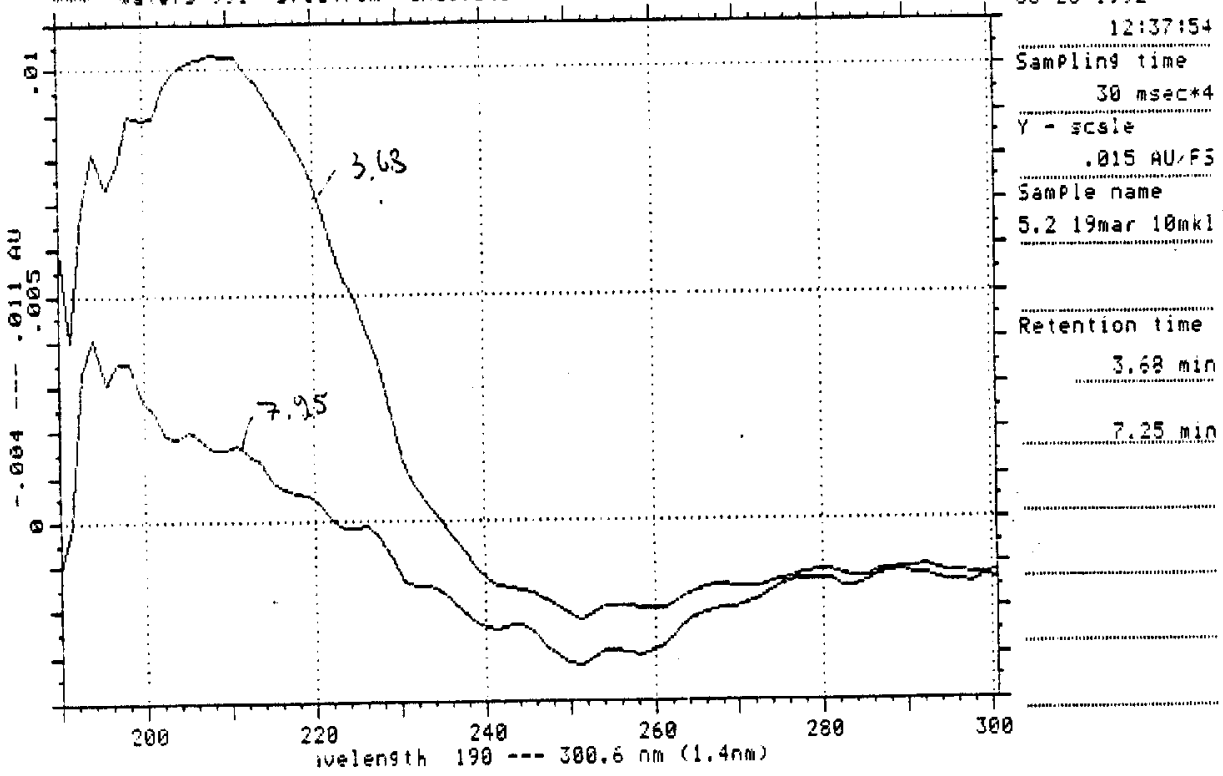


фиг.2

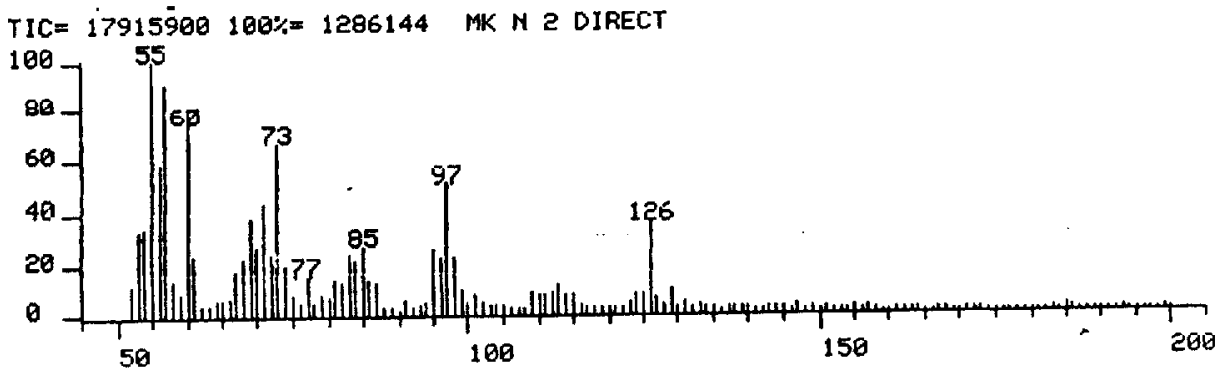
RU 2098114 C1

RU 2098114 C1

Samp time = 30msec*4 Time 0---3.8min (1.05sec)
 End Change Baseline = off Y-scale step = .001AU .01
 Set Key in 1 3.68m 2 7.25m
 *** Waters 991 Spectrum analysis ***



фиг.3



фиг.4

RU 2098114 C1

RU 2098114 C1