

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042160**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.19

(21) Номер заявки
201991659

(22) Дата подачи заявки
2018.02.12

(51) Int. Cl. *A61K 36/68* (2006.01)
A61K 36/739 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КАШЛЯ**

(31) **102017000016964**

(32) **2017.02.15**

(33) **IT**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/IB2018/050837**

(87) **WO 2018/150309 2018.08.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АБОКА С.П.А. СОСИЕТА'
АГРИКОЛА (IT)**

(72) Изобретатель:
**Меркати Валентино, Полензани
Паола, Маттоли Луиса (IT)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О. (RU)**

(56) WO-A2-2010003472
WO-A1-2015097640
WO-A1-2010052568
WO-A1-2015059683

(57) Изобретение относится к новой композиции для лечения кашля, содержащей одну или несколько полисахаридных фракций *Plantago lanceolata*, одну или несколько полисахаридных фракций *Althaea officinalis*, мёд, коричневый сахар, одну или несколько полифенольных фракций *Plantago lanceolata*, причем указанная одна или несколько полисахаридных фракций *Plantago lanceolata* содержит полисахариды, имеющие молекулярную массу более чем 20000 Да, с процентным содержанием по массе 3-50% и причем указанная одна или несколько полисахаридных фракций *Althaea officinalis* содержит полисахариды, имеющие молекулярную массу более чем 20000 Да, с процентным содержанием по массе 5-50% и причем указанная одна или несколько полифенольных фракций *Agrimonia eupatoria*, содержащих танины, содержит полифенолы с процентным содержанием по массе 3-50%.

B1

042160

042160

B1

Настоящее изобретение относится к новой композиции для применения при лечении кашля, содержащей одну или несколько полисахаридных фракций подорожника, одну или несколько полисахаридных фракций алтея, мёд, коричневый сахар, одну или несколько полифенольных фракций репешка, содержащих танины.

Предшествующий уровень техники

Классическая фармакологическая терапия, по существу, основана на подавлении кашля химическими и фармакологическими механизмами. По своему механизму действия противокашлевые лекарственные средства можно разделить на 3 категории.

Муколитические средства: увеличивают текучесть слизи с помощью механизмов деполимеризации мукопротеиновых комплексов и нуклеиновых кислот.

Отхаркивающие средства: увеличивают секрецию бронхов и косвенно уменьшают вязкость слизи.

Успокаивающие средства: подавляют кашлевые центры, устраняют симптомы.

Недостатки противокашлевых лекарственных средств заключаются в их специфичности действия и побочных эффектах: муколитические средства действуют только при влажном кашле; успокаивающие средства показаны только при сухом кашле, препятствуя его физиологическому действию; отхаркивающие средства имеют едва ли рациональный механизм действия, так что фактически их не прописывают.

Более того, противокашлевые лекарственные средства едва ли адекватны в детском возрасте: на самом деле, муколитические средства и центральные успокаивающие средства противопоказаны в возрасте до 2 лет.

Следовательно, лечение кашля нераздражающими композициями, эффективными, стабильными и свободными от лекарственных средств, таких как, например, лекарственные средства на основе кортизона или антибиотики, которые благодаря этому могут применяться без противопоказаний, связанных с передозировкой таких типологий лекарств, и, следовательно, также пригодны для педиатрического применения, представляет очевидный интерес в уровне техники.

Краткое описание изобретения

Таким образом, настоящее изобретение относится к составу для лечения кашля, компоненты которого способны синергически взаимодействовать таким образом, чтобы локально вмешиваться в механико-физические эффекты его физиопатогенетических механизмов, и совместно с мукоадгезивным эффектом защиты слизистой оболочки также имеют мощный антиокислительный эффект.

Состав по изобретению способен действовать, в основном, механически:

I) на воспаление (которое является фактором, вызывающим кашель) - посредством косвенного действия, осуществляемого через формирование защитного слоя, который, с одной стороны, предотвращает дальнейший контакт с внешними раздражающими агентами и сохраняет гидратацию слизистой оболочки, а с другой стороны, благодаря вмешательству антиокислительных веществ, смягчает вредное воздействие свободных радикалов, продуцируемых при инфекциях;

II) на слизь - делая ее более жидкой и, следовательно, легче удаляемой с помощью физиологических механизмов очистки путем ее гидратации благодаря привлекающим воду гидрофильным веществам.

Таким образом, симптомы кашля могут быть смягчены, не сводя на нет его физиологическую роль и способствуя восстановлению нормальных состояний слизи и слизистой оболочки.

Авторы настоящего изобретения создали композицию, обладающую хорошими мукоадгезивными и барьерными эффектами на слизистую оболочку, в сочетании с антиокислительными свойствами, сопоставимыми со свойствами доз витамина С, обычно используемых в противокашлевых составах, стабильную в течение времени, поэтому не требующую присутствия стабилизаторов, обычно используемых для стабилизации аскорбиновой кислоты.

Авторы фактически создали композицию, в которой один ингредиент, представленный репешком (*Agripónia*), отвечает как за сильные мукоадгезивные свойства состава, так и за его антиокислительные свойства, причем такие антиокислительные свойства сопоставимы со свойствами витамина С, но является гораздо более стабильным, чем указанный витамин.

Фактически, известно, что быстрое разложение аскорбиновой кислоты в водных продуктах является до настоящего времени очень важным фактором, учитываемым при разработке продуктов, ее содержащих. Также известно, что окисление аскорбиновой кислоты происходит быстро в щелочной среде. Разложение аскорбиновой кислоты происходит как аэробно, так и анаэробно, и зависит от многих факторов, таких как кислород, температура, свет, pH и условия хранения.

Композиция, являющаяся предметом изобретения, в отличие от этого продемонстрировала превосходные способности к мукоадгезии и барьерному эффекту, антиокислительную активность, сравнимую с той, которую проявляют обычно используемые дозы витамина С, наряду с превосходной стабильностью в течение времени. Фактически, композиция по изобретению, даже в жидкой форме, оказалась стабильной при хранении анализируемых образцов в экстремальных условиях, при 40°C и 75% относительной влажности. Полученные данные представлены в анализе стабильности в разделе Примеры.

Как и ожидалось из литературных источников, а также, как отмечают изобретатели, витамин С оказался заметно нестабильным в такой же жидкой форме (с теми же эксципиентами).

Таким образом, настоящее изобретение относится к композиции, оптимизированной для лечения кашля, выбранные компоненты которой проявляют барьерный эффект, мукоадгезивный и антиокислительный эффект наряду с превосходной стабильностью в течение времени.

Таким образом, настоящее изобретение относится к композиции для применения при лечении кашля, содержащей одну или несколько полисахаридных фракций подорожника, одну или несколько полисахаридных фракций алтея, одну или несколько полифенольных фракций репешка, содержащих танины, коричневый сахар, мёд.

Настоящее изобретение также относится к способу приготовления указанной композиции с одной или несколькими полисахаридными фракциями подорожника, одной или несколькими полисахаридными фракциями алтея, одной или несколькими полифенольными фракциями Agrimony, содержащими танины, смешиваемыми с мёдом, коричневым сахаром и одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или наполнителями.

Терминология

Для целей настоящего изобретения под "Подорожником" (Plantain) подразумевается *Plantago lanceolata*, под "Репешком" (Agrimony) - *Agrimonia eupatoria* и под "Алтеем" (Marshmallow) - *Althaea officinalis*.

Под головками или цветущими головками подразумевается термин, обычно используемый в траволечении и в ботанических трактатах, поэтому надземные концы растения содержат листья, стебли (подразумеваются ветви, а не основной стебель растения) и цветы или хотя бы один из этих компонентов.

Под полисахаридными фракциями алтея и подорожника подразумеваются фракции экстрактов, предпочтительно водно-спиртовых или водных, из корней алтея и фракции экстрактов, водно-спиртовых или водных, из листьев подорожника, содержащие полисахариды.

Под полифенольными фракциями репешка, содержащими танины, подразумеваются фракции экстрактов, предпочтительно водно-спиртовых или водных, из головок или цветущих головок репешка, содержащие полифенолы, в частности, содержащие полифенольный подкласс - танины.

Подробное описание чертежей

На фиг. 1 представлен процент мукоадгезивности продукта в статических условиях при различных разведениях по отношению к буккальным клеткам человека, измеренный путем оценки способности продукта прилипнуть к клеткам путем ингибирования связывания лектина с мембранными гликопротеинами, как проиллюстрировано в подробном описании и в примерах ниже. На фиг. 1 такой процент показан для композиции по изобретению в форме сиропа со следующими разведениями: неразбавленный, разведенный 1:2 и разведенный 1:5.

На фиг. 2 показана устойчивость мукоадгезивного слоя в динамических условиях, т.е. оценка способности продукта оставаться прилипшим к слизистой оболочке с течением времени путем воздействия на систему потока искусственной слюны 2 мл/мин в ячейке Франца, как проиллюстрировано в подробном описании и в примерах ниже. На фиг. 2 показано сопротивление мукоадгезивного слоя, полученного с продуктом в форме сиропа, разведенного 1:2 в разные моменты времени - 0,5 ч, 1 ч и 2 ч - по отношению к смоделированному раствору слюны (0,9% физиологический раствор NaCl).

На фиг. 3 показана оценка барьерного эффекта, оказываемого продуктом в виде сиропа, который образует защитную пленку, способную защитить клетки от воспалительных агентов (LPS).

На фиг. 4 показаны данные, полученные при выполнении тех же этапов Барьерного анализа, что и на фиг. 3, однако с инвертированием порядка стрессирования клеток, т.е. сначала стимулируют клетки LPS, а затем подвергая их воздействию образца (композиции по изобретению и положительного контроля), полученные данные показывают, что противовоспалительную активность композиции по изобретению следует отнести к барьерному эффекту, и что она не является прямой противовоспалительной активностью.

На фиг. 5 и 6 показаны результаты, выраженные соответственно в виде графика, показывающего развитие свободных радикалов во времени, и гистограммы, показывающей действие поглотителя во времени при различных концентрациях композиции. Эксперименты проводили с 1 граммом композиции по изобретению, довели до конечного объема 10 мл в физиологическом растворе и анализировали при максимальной концентрации 0,5 мг/мл и при минимальной концентрации 0,03 мг/мл композиции.

Подробное описание изобретения

Кашель представляет собой внезапный маневр выдоха, который может возникать как рефлекс или как произвольное действие и имеет целью освобождение дыхательных путей от любого присутствующего вещества (отхаркиваемого вещества), тем самым выполняя роль, необходимую для физиологического функционирования дыхательной системы.

Однако эта система защиты дыхательных путей становится патологическим состоянием при затягивании во времени вследствие повторяющихся раздражающих раздражителей (инфекционных агентов, раздражающих веществ), вызывающих чрезмерную выработку секретов и слизи, которые накапливаются в дыхательных путях и становятся сопутствующей причиной, стимулирующей кашель.

Слизистая оболочка дыхательных путей играет защитную роль функционального барьера между внешней средой и тканями:

а) представляет собой реальный физический барьер, защищающий соответствующие ткани от контакта с внешней средой;

б) из-за присутствия ресничных клеток при синхронизированных и однонаправленных движениях выталкивает захваченную слизью инородную материю к пищеводу;

в) производит секреты и слизь;

г) выполняет иммунологические функции и в присутствии вируса задействует ряд эффективных защитных механизмов, имеющих решающее значение для противовирусного ответа.

Часть ее защитной функции выполняется покрывающей ее слизью, которая представляет собой адгезивный вязкоупругий гель, продуцируемый бокаловидными клетками, и основными макромолекулами которого являются гликопротеины.

Следует принимать во внимание, что слизь, которая при нормальных условиях играет защитную роль в случае инфекции или другого типа раздражения, сама становится причиной кашля: фактически, наблюдается ее перепроизводство и более высокая вязкость.

Основные механизмы, которые возникают в результате инфекционного и/или раздражающего события, вызывающего воспаление уха и горла, могут быть описаны следующим образом.

1. Прямое вовлечение гортани и трахеи из-за их близости и тесных связей со ртом, глоткой и носом.

2. Перенос медиаторов воспаления, возникающих в месте заражения, через кровоток в нижние дыхательные пути, где они инициируют воспалительный ответ; исследования на морских свинках и людях показали, что сенсорные раздражители химического типа, чувствительные к носу или пищеводу, могут повышать чувствительность к кашлю центральных нервных путей, способствуя "гипертоническому" состоянию, сопровождающему воспалительные заболевания дыхательных путей, носа и пищевода.

3. При стекании слизи из носоглотки постоянно присутствует слизь, часто в виде вязких нитей, которые трудно удалить из носоглотки, которые, спускаясь вдоль глотки, раздражают ее. Это раздражение вызывает потерю координации между нервами и мышцами трахеи и пищевода так, что часть избыточных выделений попадает в гортань, вызывая ее механическую стимуляцию, которая приводит к настойчивому, постоянному и раздражающему кашлю, очень часто встречающемуся у детей.

Важную роль в механизмах кашля играют различные типы рецепторов, локализованных на уровне пищевода, стимуляция которых может вызывать кашель с помощью различных механизмов:

стимуляция натяжения механосенсоров путем повторных попыток глотания обильной и вязкой слизи в случае инфекционных явлений;

стимуляция рецепторов слизистой оболочки, чувствительных к стимулам легкого давления, создаваемым слизистыми нитями, застаивающимися между гортанной частью глотки и пищеводом;

стимуляция ноцицепторов медиаторами воспаления, продуцируемыми локально и переносимыми слизью в другие места (аналогичные механизмы стимуляции были продемонстрированы у морской свинки даже при использовании кислотных химических стимулов).

На основании того факта, что как физиологические механизмы защиты слизистых оболочек дыхательных путей, так и патогенетические процессы кашля фактически основаны на механических механизмах (слизь и интактная слизистая оболочка с одной стороны, перепроизводство слизи и механическая стимуляция с другой стороны), Изобретатели предположили, что вмешательство в действие защиты слизистой оболочки может быть единственным действительно эффективным подходом. Более того, изобретатели искали и выделяли стабильный в течение времени состав на основе веществ природного происхождения, который обладал бы высокой мукоадгезивной способностью, эффективным барьерным эффектом против раздражающих агентов в сочетании с высоким антиокислительным действием.

Это потребовало разработки состава, который был бы активен в комплексе, т.е. чтобы его компоненты могли взаимодействовать синергетически, для того чтобы вмешиваться локально с механико-физическими эффектами в физиопатогенные механизмы и одновременно обеспечивать антиокислительный эффект, обеспечивающий эффективную защиту от свободных радикалов.

С учетом этой цели была приготовлена композиция для лечения кашля, содержащая одну или несколько полисахаридных фракций подорожника, одну или несколько полисахаридных фракций алтея, одну или несколько полифенольных фракций репешка, содержащих танины, коричневый сахар и мёд, наряду с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или эксципиентами.

Как указано выше, под полисахаридными фракциями растения x или y или полифенольными фракциями растения z, содержащими танины, подразумеваются фракции экстрактов указанных растений, содержащие указанные классы соединений и свободные от других классов соединений, обычно присутствующих в частях этого растения. В частности, вышеупомянутые фракции могут быть получены методами водно-спиртовой или водной экстракции. Эти фракции могут быть в форме водно-спиртовых или водных экстрактов, сухих экстрактов, экстрактов, высушенных методом распылительной сушки (отличающимся от лиофилизации), густых экстрактов или их смесей.

Лиофилизированные экстракты или экстракты, высушенные методом распылительной сушки, согласно изобретению могут быть лиофилизированными или высушенными водно-спиртовыми или водными экстрактами.

Согласно изобретению, вышеупомянутые фракции предпочтительно стандартизированы по содер-

жанию характеристических маркеров.

В одном варианте выполнения изобретения полисахаридная фракция подорожника представляет собой фракцию (или набор фракций), содержащую полисахариды, имеющие молекулярную массу, превышающую 20000 Дальтон (Да), с процентным содержанием по массе, превышающим или равным 3%. Например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50%. В соответствии с дополнительным вариантом выполнения изобретения полисахаридная фракция алтея представляет собой фракцию (или набор фракций), содержащую полисахариды, имеющие молекулярную массу более 20000 Да, с процентным содержанием по массе, превышающим или равным 5%. Например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50%.

Согласно одному варианту выполнения изобретения полисахаридная фракция алтея представляет собой слизистую фракцию, извлеченную из указанного растения.

В соответствии с еще другим вариантом выполнения изобретения полифенольная фракция репешка представляет собой полифенольную фракцию (или набор фракций) (т.е. содержащую полифенолы), содержащую танины, содержащую полифенолы, с процентным содержанием по массе, превышающим или равным 3%. Например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50%.

В одном предпочтительном варианте выполнения изобретения композиция содержит полисахаридную фракцию подорожника, содержащую полисахариды с молекулярной массой более 20000 Да с процентным содержанием по массе, превышающим или равным 3%; полисахаридную фракцию алтея, представляющую собой фракцию, содержащую полисахариды с молекулярной массой более 20000 Да, с процентным содержанием по массе, превышающим или равным 5%, и полифенольную фракцию репешка, содержащую танины, содержащую полифенолы с процентным содержанием по массе, превышающим или равным до 3%.

В случае подорожника и Алтея предпочтительны лиофилизированные экстракты или экстракты, высушенные распылительной сушкой, поскольку для экстракции полисахаридов обычно используются растворы с низким процентным содержанием спирта или воды, и такие методы сушки являются лучшими для получения фракций с подходящими характеристиками для хранения. Приготовление фракций такого типа может быть осуществлено с использованием хорошо известных методологий, поэтому специалисту в данной области не требуется никаких дополнительных указаний для осуществления настоящего изобретения. Тем не менее в разделе примеры описаны подходящие способы, не ограничивающие изобретение, для получения фракций, подходящих для композиции по изобретению.

Композиция по изобретению подходит для применения у взрослых, пожилых, вынашивающих, подростков и детей. Приготовление экстрактов, как уже упоминалось, может быть осуществлено в соответствии с любой методикой, известной специалисту в данной области, в конкретном варианте выполнения изобретения указанные экстракты могут быть лиофилизированными экстрактами.

Мёд может представлять собой пчелиный мёд, падевый мёд или их смесь, и его можно использовать также в лиофилизированной форме или в любой форме.

Затем состав может содержать рецептурные агенты, такие как загущающие агенты, ароматизаторы и консерванты (консервирующие агенты) природного или синтетического происхождения или другие технологические адъюванты, которые специалист в данной области может выбрать в соответствии с уровнем техники. В качестве примера, могут быть выбраны соки (такие как лимонный сок или другие фруктовые ароматизаторы (например, натуральный апельсиновый ароматизатор, натуральный лимонный ароматизатор, натуральный персиковый ароматизатор, натуральный миртовый ароматизатор, натуральный ежевичный ароматизатор), загустители (такие как ксантановая камедь, гуммиарабик).

Таким образом, вышеописанная композиция может состоять из одной или нескольких полисахаридных фракций подорожника, одной или нескольких полисахаридных фракций алтея, одной или нескольких полифенольных фракций репешка, содержащих танины, коричневого сахара, мёда и подходящих эксципиентов, ароматизаторов, консервантов.

В одном предпочтительном варианте выполнения изобретения единственные активные компоненты, содержащиеся в композиции, будут представлены одной или несколькими полисахаридными фракциями подорожника, одной или несколькими полисахаридными фракциями алтея, одной или несколькими полифенольными фракциями репешка, содержащими танины, коричневым сахаром, мёдом.

Таким образом, композицию по изобретению также можно определить как композицию, состоящую из одной или нескольких полисахаридных фракций подорожника, одной или нескольких полисахаридных фракций алтея, одной или нескольких полифенольных фракций репешка, содержащих танины, коричневого сахара, мёда и фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов.

В соответствии с одним вариантом выполнения изобретения композиция может содержать 30-60% мас./мас. коричневого сахара; 20-50% мас./мас. мёда; 0,1-2% мас./мас. полисахаридной фракции подорожника; 0,1-2% полисахаридной фракции алтея; 0,1-2% полифенольной фракции репешка, содержащей танины, и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент,

q.s. 100%.

Таким образом, массовые проценты вблизи верхнего предела диапазона значений для мёда будут соответствовать массовым процентам вблизи нижнего предела диапазона значений для коричневого сахара и наоборот, поскольку общая сумма массовых частей ингредиентов, включая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент, составляет 100.

В вышеуказанные диапазоны входят нижний и верхний пределы, все значения, содержащиеся между такими пределами, и все возможные комбинации массовых частей ингредиентов, попадающие в такие интервалы, и сумма которых равна 100.

Далее представлены неограничивающие примеры возможных вариантов выполнения в соответствии с изобретением.

В соответствии с одним вариантом выполнения изобретения композиция по изобретению может содержать 30-50% мас./мас. коричневого сахара; 30-50% мас./мас. мёда; 0,1-1% мас./мас. полисахаридной фракции подорожника; 0,1-1% полисахаридной фракции алтея; 0,4-2% полифенольной фракции репешка, содержащей танины, и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов так, чтобы общее содержание достигло 100% (т.е. q.s. 100%).

В соответствии с другим вариантом выполнения композиция по изобретению может содержать 35-55% мас./мас. коричневого сахара; 30-50% мас./мас. мёда; 0,1-1% мас./мас. полисахаридной фракции подорожника; 0,1-5% полисахаридной фракции алтея; 0,2-2% полифенольной фракции репешка, содержащей танины, и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов, q.s. 100%.

В соответствии с дополнительным вариантом выполнения композиция по изобретению может содержать 40-60% мас./мас. коричневого сахара; 20-30% мас./мас. мёда; 0,1-1% мас./мас. полисахаридной фракции подорожника; 0,1-5% полисахаридной фракции алтея; 0,2-2% полифенольной фракции репешка, содержащей танины, и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов, q.s. 100%.

В соответствии с еще одним вариантом выполнения композиция по изобретению может содержать 40-60% мас./мас. коричневого сахара; 20-30% мас./мас. мёда; 0,1-1% мас./мас. полисахаридной фракции подорожника; 0,1-1,7% полисахаридной фракции алтея; 0,2-1% полифенольной фракции репешка, содержащей танины, и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов, q.s. 100%.

В соответствии с еще одним вариантом выполнения композиция по изобретению может содержать 40-60% мас./мас. коричневого сахара; 20-30% мас./мас. мёда; 0,1-1% мас./мас. полисахаридной фракции подорожника; 0,1-1,6% полисахаридной фракции алтея; 0,3-1% полифенольной фракции репешка, содержащей танины, и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов, q.s. 100%.

В соответствии с еще одним вариантом выполнения изобретения композиция по изобретению может содержать 40-60% мас./мас. коричневого сахара; 20-30% мас./мас. мёда; 0,2-1% мас./мас. полисахаридной фракции подорожника; 0,1-1,6% полисахаридной фракции алтея; 0,3-1% полифенольной фракции репешка, содержащей танины, и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов, q.s. 100%.

Во всех вариантах выполнения изобретения термин "полисахаридная фракция" включает также набор фракций, как и термин "полифенольная фракция" включает также набор фракций, если присутствуют классы вышеуказанных соединений, предпочтительно в концентрациях, указанных в настоящем описании.

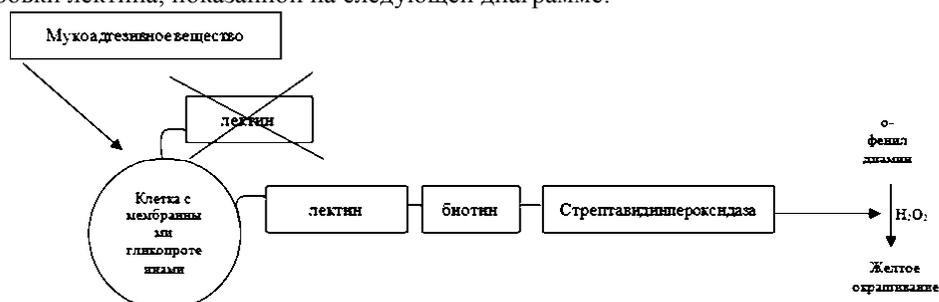
Композиции по изобретению, следовательно, состоят из набора функциональных веществ, обладающих химико-физическими свойствами, такими как общее слизисто-разжижающее действие и эффект защиты слизистой оболочки на уровне области применения, представленной верхними дыхательными путями.

Как видно из экспериментов, представленных в настоящем описании, композиция по настоящему изобретению имеет процент мукоадгезии от 85 до 50%, измеряемый путем оценки способности продукта, неразбавленного или разбавленного до 1:5, прилипнуть к клеткам буккальной слизистой оболочки в культуре, ингибируя связывание лектина с мембранными белками. Указанную способность измеряют путем обработки клеток буккальной слизистой оболочки веществом, подлежащим анализу (в данном случае композицией по изобретению), а затем биотинилированным лектином с обнаружением подходящей системой (например, стрептавидинпероксидазой-о-фенилаланином) связывания лектина с указанными клетками, сравнивая количество связанного лектина в образце, обработанном интересующей композицией, с количеством связанного лектина в контроле, в котором клетки не обрабатывают интересующей композицией.

Схема используемого метода представлена ниже.

Степень мукоадгезии может быть измерена, например, с помощью колориметрической реакции, позволяющей количественно определить сайты на гликопротеинах, не вовлеченных в действие лектина, как вовлеченные мукоадгезивным продуктом. Колориметрическая реакция возможна благодаря особой сис-

теме маркировки лектина, показанной на следующей диаграмме:



Уменьшение величины абсорбции пропорционально способности продукта прилипнуть ("мукоадгезивировать") к клеткам. Мукоадгезивная способность выражается в процентах от ингибирования связывания гликопротеин/лектин и представляет собой процентное содержание сайтов слизистой оболочки, занимаемых продуктом, в соответствии с уравнением:

$$\text{Процент мукоадгезии продукта} = (1 - \text{абс. образец} / \text{абс. контроль}) \times 100$$

где абс. означает абсорбцию, измеренную с помощью спектрофотометра при $\lambda = 450$ нм.

Продукт наносят после разбавления, принимая во внимание тот факт, что в реальном использовании сразу после доставки происходит смешение со слюной, присутствующей в орофарингеальной полости.

Согласно настоящему изобретению композиция, неразбавленная или разбавленная до 1:5 подходящим разбавителем, может иметь процент мукоадгезии, измеренный с помощью анализа связывания лектина, от 85 до 50%, предпочтительно от 82 до 52% (см. фиг. 1).

Под выражением от 85 до 50% подразумевается любое целое число, которое может составлять 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50% и любой десятичный разряд числа для вышеуказанных целых чисел ниже 85% и выше 50% (следовательно, от 84,9 до 50,1%).

Любой интервал мукоадгезивной способности, как измерено выше, заключенный между этими двумя пределами, входит в объем изобретения.

Более того, композиция по изобретению, как видно из проведенных анализов, обладает хорошей устойчивостью мукоадгезии к промыванию физиологическим раствором, путем воздействия на систему потока искусственной слюны 2 мл/мин в ячейке Франца. Эта обработка, имитирующая устойчивость композиции к течению слюны *in situ*, демонстрирует, что композиция по изобретению характеризуется высокой мукоадгезией, сохраняющейся во времени, как видно из данных, представленных на фиг. 2.

Кроме того, композиция может быть дополнительно или альтернативно охарактеризована тем, что она оказывает защитный барьерный эффект, оцениваемый путем расчета процента снижения выработки цитокина в экспериментах, проводимых на клетках в присутствии продукта по изобретению, относительно положительного контроля без продукта после контакта с подходящим воспалительным агентом, способным индуцировать выработку указанного цитокина.

В качестве измерительной системы можно использовать любой известный воспалительный агент и соответствующий цитокин, активированный таким образом. Пример возможной системы воспалительных агентов иллюстрируется липополисахаридом (LPS) и IL-6.

Анализ барьерного эффекта представляет собой анализ *in vitro* биологического типа, используемый для оценки способности готовых продуктов и/или сырья защищать посредством образования тонкого "изолирующего" слоя слизистые оболочки и кожу от контакта с загрязнителями окружающей среды (пылью, пылью, микроорганизмами и т.д.)

Анализ был разработан для имитации *in vitro* действия, оказываемого продуктами, которые наносятся на кожу и/или слизистые оболочки с целью создания защитной пленки от внешних агентов.

В модели используется преимущество принципа, согласно которому клетки, подвергшиеся контакту с воспалительным агентом, продуцируют и секретируют провоспалительные медиаторы (цитокины) во внеклеточной среде в количестве, связанном со степенью вызванного воспаления; в пределах определенного диапазона существует прямая пропорциональность между концентрацией и временем воздействия воспалительного агента и количеством высвобождаемых цитокинов.

В принятой экспериментальной модели используются две камеры, физически разделенные полупроницаемой мембраной (поры 0,4 мкм). Клетки высевают в нижнюю камеру, тогда как в верхней камере находится воспалительный агент; на полупроницаемой мембране, разделяющей две камеры, тонкая пленка анализируемого образца расслоена, чтобы подчеркнуть, если присутствует, барьерный эффект для свободного прохождения воспалительного агента.

Полупроницаемая мембрана обеспечивает прохождение воспалительного агента в нижнюю камеру и представляет собой основу, на которой анализируемый образец расслоен. В зависимости от "изолирующей" способности образца будет иметь место уменьшение миграции LPS из верхней камеры в нижнюю (следовательно, меньшая стимуляция клеток к выработке цитокинов).

Проведенные анализы показали, что барьерный эффект, оказываемый композицией по изобретению, снижает продукцию маркера IL-6 в клетках, подвергаемых действию воспалительного агента в присутствии указанной композиции, примерно на 65-75% по отношению к контрольным клеткам, подвергаемым воздействию того же воспалительного агента в отсутствие указанной композиции.

Этот анализ был разработан для моделирования *in vitro* защитного действия веществ и составов, которые при нанесении на кожу и слизистые оболочки образуют "изолирующую" пленку по отношению к внешним агентам. В модели используется преимущество принципа, согласно которому клетки, подвергшиеся контакту с воспалительным агентом, продуцируют и секретируют провоспалительные медиаторы (цитокины) во внеклеточной среде в количестве, связанном со степенью вызванного воспаления. В анализе используются две камеры, физически разделенные полупроницаемой мембраной, обеспечивающей транзит достаточно малых растворенных веществ.

В нижней камере, состоящей из лунки, содержащей чашки для клеточных культур, выращивают клетки (первичная клеточная линия фибробластов человека -HUDE), тогда как верхняя камера состоит из вставки (трансвелл) и содержит воспалительный агент LPS.

На внутренней поверхности трансвелльной мембраны, разделяющей две камеры, тонкая пленка исследуемого образца расслоена для оценки любого барьерного эффекта (BE) при свободном прохождении воспалительного агента.

Степень воспалительной реакции оценивают по полуколичественной дозе цитокинов, высвобождаемых в культуральной среде нижней камеры, в частности, интерлейкина 6 (IL-6), типичного для поздней фазы воспалительной реакции.

В приведенной ниже таблице представлены результаты, полученные с помощью вышеописанного эксперимента, суммированные на фиг. 3.

ОБРАЗЕЦ	IL-6 (пг/мкл)	СРЕДНЕЕ	S.D.
Композиция в соответствии с Таблицей 4 + LPS	325,53	332,97	10,00
Композиция в соответствии с Таблицей 4 + LPS	344,33		
Композиция в соответствии с Таблицей 4 + LPS	329,05		
Контроль + 1 (LPS)	1274,47	1145,56	150,73
Контроль + 2 (LPS)	979,83		
Контроль + 3 (LPS)	1182,39		
Контроль - 1 (MEM)	72,03	63,28	8,82
Контроль - 2 (MEM)	54,40		
Контроль - 3 (MEM)	63,41		

Из результатов очевидно, что наблюдается заметное снижение концентрации IL-6, полученного в экспериментах, в которых присутствует анализируемый продукт.

Значение IL-6, равное 63,28 пг/мкл, обнаруженное для Отрицательного Контроля, сопоставимо с нормальным базальным значением, т.е. невоспалительным состоянием.

На следующем графике четко показана защита, оказываемая продуктами на клетки.

Данные выражены в единицах Наложения (Fold Over) (F.O.) по сравнению с Контролем C- с использованием следующей формулы:

$$\text{FOLD OVER (C-)} = [\text{измеренный IL-6}]/[\text{C-IL-6}]$$

Из средних значений IL-6, измеренных в барьерном анализе и в положительном контроле, рассчитывают процент снижения высвобождения IL-6:

$$100 - [(\text{IL-6 ОБРАЗЕЦ}) / (\text{IL-6 C+}) \times 100]$$

Таким образом, применяя формулу, получают значение снижения продукции IL-6 в экспериментах, проводимых в присутствии анализируемых образцов. Среднее значение, полученное при проведении анализа с композицией по изобретению, составило 70,93% по сравнению с положительным контролем, как показано на фиг. 3.

Для того чтобы убедиться, что результаты зависят только от барьерного эффекта анализируемых образцов и исключают любые помехи синтезу цитокинов (противовоспалительному эффекту), одновременно с барьерным анализом (B.A.) на каждом образце также был выполнен анализ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ (IC), в котором были выполнены те же этапы вышеописанного барьерного анализа, однако инвертирован порядок стрессирования клеток: клетки сначала стимулировали LPS, а затем подвергали воздействию образца.

В этом случае на продукцию интерлейкина не влияет присутствие образцов, как показано на графиче-

ке, представленном на фиг. 4, что указывает на то, что продукты не обладают прямой противовоспалительной активностью. Наконец, анализ жизнеспособности клеток показывает, что ни одна из проведенных операций и проведенных обработок не оказалась цитотоксической для клеток.

Полученные результаты, о которых не сообщается, показывают хорошую способность таблеток образовывать защитный барьер, препятствующий прохождению воспалительного агента LPS.

Авторы изобретения провели эксперименты по оценке антиокислительной активности композиции по изобретению при различных разведениях с помощью эксперимента, проведенного параллельно с композицией по изобретению в отношении холостого раствора и в отношении солюбилизированного витамина С в указанном холостом растворе.

Таким образом, приведенные ниже данные показывают, что композиция по изобретению также обладает превосходной антиокислительной активностью и что указанная композиция остается стабильной также в жидкой форме по сравнению с витамином С, суспендированном в тех же эксципиентах.

Полученные данные показали, что композиция по изобретению обладает действием по поглощению свободных радикалов, сравнимым с действием, которое оказывает витамин С при введении в качестве замены полифенольной фракции респешка в композиции по изобретению. На фиг. 5 и 6 показаны результаты, выраженные соответственно в виде графика, иллюстрирующего развитие свободных радикалов с течением времени, и гистограммы, иллюстрирующей действие поглотителя с течением времени при различных концентрациях композиции. Эксперименты проводили на 1 грамме композиции по изобретению, доводили до конечного объема 10 мл в физиологическом растворе и анализировали при максимальной концентрации 0,5 мг/мл и при минимальной концентрации 0,03 мг/мл композиции.

Эксперимент проводился путем оценки эффективности анализируемого образца для нейтрализации свободных радикалов, образующихся при обработке культивируемых клеток 500 мкМ раствора H_2O_2 . Защита от вызванного H_2O_2 окислительного стресса была выражена в процентах защиты от развития свободных радикалов, измеренных с помощью анализа, описанного в экспериментальном примере 2, в момент времени 100 мин.

В экспериментальном разделе подробно описаны эксперименты, проведенные для оценки поглощающей активности композиции по изобретению.

Проведенные эксперименты показали, что композиция по настоящему изобретению обладает хорошим акцепторным действием, способным нейтрализовать вызванные H_2O_2 свободные радикалы (FR): первая проанализированная доза (0,5 мг/мл) снижает образование FR 39-50-53-53-55 и 56% соответственно после каждого раза воздействия; вторая анализируемая доза (0,25 мг/мл) снижает образование FR 40-50-51-49-48 и 47% соответственно после каждого раза воздействия; третья доза (0,125 мг/мл) снижает образование FR 41-43-42-35-32 и 30% соответственно после каждого раз воздействия; четвертая доза (0,0625 мг/мл) снижает образование FR 31-32-30-27-25 и 23% соответственно после каждого раза воздействия, а пятая доза (0,0313 мг/мл) значительно ингибирует образование FR 30-26-24-23-22 и 19% соответственно после каждого раза воздействия.

Аскорбиновая кислота (0,05 мг/мл) обладает поглотительным действием, способным снизить FR 45-57-60-60-63 и 61% соответственно после шести раз воздействия стресса, следовательно, со значениями, сопоставимыми со значениями первой дозы исследованной композиции.

Согласно настоящему изобретению композиция может быть приготовлена для перорального введения и может быть приготовлена в форме таблетки, пилюли, гранул, порошка, сиропа, жидкости, эликсира, спрея, суспензии, эмульсии, раствора.

Для перорального введения композиция может быть приготовлена в форме суточных единичных доз или фракций суточных единичных доз (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более таблеток, пилюль, гранул или порошков однократных доз, сироп, эликсир, спрей или жидкость могут приниматься в течение дня в соответствии с решением лечащего врача) и могут содержать обычные эксципиенты, включая, например, связующие агенты, загустители, такие как камеди (трагакантовая камедь, гуммиарабик), желатин животного происхождения и поливинилпирролидон; разбавители, такие как сахар, полиспирты (сорбит, маннит, ксилит), мальтодекстрины, неорганические соли (двухосновный фосфат кальция, карбонат кальция); дезинтегранты, такие как рисовый крахмал, кукурузный крахмал и картофельный крахмал; смазывающие вещества, такие как стеарат магния, полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой; глицеролы, такие как коллоидный кремнезем; антиадгезивные агенты, такие как, например, тальк; смачивающие агенты, такие как лаурилсульфат натрия. Таблетки могут быть покрыты оболочкой в соответствии со способами, хорошо известными в стандартной фармацевтической практике.

Композиция также может быть приготовлена в жидкой или полужидкой форме в виде суспензии, эмульсии, раствора для перорального введения и может необязательно содержать натуральные ароматизаторы, придающие ей приятный вкус.

Композицию в форме порошка или гранулы можно предварительно дозировать в подходящие емкости, и она может быть готова к употреблению либо путем приема внутрь как таковой, либо предназначаться для ресуспендирования в соответствующей жидкости, такой как вода, чай и т.д. В этом случае композиция также может содержать натуральные ароматизаторы, придающие ей приятный вкус.

Очевидно, что все вышеуказанные эксципиенты могут быть использованы с фармацевтически при-

емлемой степенью чистоты.

В одном варианте выполнения изобретения композиция, описанная в настоящем документе в любом из вышеупомянутых вариантов выполнения, может быть в форме фармацевтической композиции, т.е. содержать ингредиенты фармацевтической степени чистоты, или она может являться или может быть введена в пищу медицинского назначения или в медицинское устройство.

Композиция в соответствии с настоящим описанием может быть приготовлена в форме фармацевтической композиции или медицинского устройства в соответствии с любым из классов, описанных в Директиве 93/42/ЕЕС для медицинских устройств (включая также вещества, а не только "устройства" в смысле объектов).

В случае сиропа могут быть использованы помимо вышеописанных активных компонентов и один или несколько из ранее описанных агентов (консерванты, загустители, наполнители, ароматизаторы и т.д.).

Таким образом, в конкретном варианте выполнения настоящего изобретения композиция может состоять из или содержать следующие компоненты.

Таблица 1

КОРИЧНЕВЫЙ САХАР
МЁД
ЭКСЦИПИЕНТЫ И/ИЛИ НОСИТЕЛИ
Полисахаридная фракция алтея (напр, лиофилизированный или высушенный распылением экстракт)
Полисахаридная фракция подорожника (напр, лиофилизированный или высушенный распылением экстракт)
Полифенольная фракция репешка (напр, лиофилизированный или высушенный распылением экстракт)
Необязательно НОСИТЕЛИ, НАТУРАЛЬНЫЕ АРОМАТИЗАТОРЫ, ЭКСЦИПИЕНТЫ

Которые могут быть, например, в следующих пропорциях.

Таблица 2

Общий состав	%мас./мас.
КОРИЧНЕВЫЙ САХАР	40-60
МЁД	20-30
ВОДНЫЙ НОСИТЕЛЬ	10-40
Полисахаридная фракция ЛИСТЬЕВ подорожника	0,1-1
Полисахаридная фракция АЛТЕЯ	0,1-1
Полифенольная фракция РЕПЕШКА	0,1-1

Настоящее изобретение также относится к способу приготовления указанной композиции, в котором экстракты подорожника, алтея и репешка, как описано выше, смешивают с мёдом, коричневым сахаром и одним или несколькими натуральными ароматизаторами, консервантами, загустителями и, необязательно, фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Наконец, настоящее изобретение также относится к способу лечения сухого кашля, продуктивного кашля, кашля, связанного с URTI (инфекциями верхних дыхательных путей), и кашля из-за стекания слизи из носоглотки, включающего введение терапевтически активной дозы композиции по изобретению пациенту, нуждающемуся в этом, где указанный пациент также может быть в педиатрическом возрасте, в гериатрическом возрасте, в периоде вынашивания.

Примеры составов

Далее приведены некоторые конкретные примеры жидких составов, которые не следует понимать как ограничение применения.

Таблица 3

ПРИМЕР СОСТАВА 1	%мас./мас.
КОРИЧНЕВЫЙ САХАР	30-50
МЁД	30-50
ДЕИОНИЗИРОВАННАЯ ВОДА и/или другой подходящий носитель или эксципиент	40-60
Полисахаридная фракция подорожника	0,1-1
Полисахаридная фракция алтея	0,1-1
Полифенольная фракция репешка	0,4-2

Таблица 4

ПРИМЕР СОСТАВА 2	%мас./мас.
КОРИЧНЕВЫЙ САХАР	35-55
МЁД	30-50
СОРБИТНЫЙ СИРОП	40-60
Полисахаридная фракция ЛИСТЬЕВ подорожника	0,1-1
Полисахаридная фракция алтея	0,1-1,5
Полифенольная фракция РЕПЕШКА	0,2-2

Таблица 5

ПРИМЕР СОСТАВА 3	%мас./мас.
КОРИЧНЕВЫЙ САХАР	40-60
МЁД	20-30
эксципиент МАННИТНЫЙ СИРОП	10-40
Полисахаридная фракция ЛИСТЬЕВ подорожника	0,1-1
Полисахаридная фракция АЛТЕЯ	0,1-1,5
Полифенольная фракция РЕПЕШКА	0,2-2

Таблица 6

ПРИМЕР СОСТАВА 4	%мас./мас.
КОРИЧНЕВЫЙ САХАР	40-60
МЁД	20-30
эксципиент КСИЛИТНЫЙ СИРОП	10-40
Полисахаридная фракция ЛИСТЬЕВ подорожника	0,1-1
Полисахаридная фракция АЛТЕЯ	0,1-1,7
Полифенольная фракция РЕПЕШКА	0,2-1

Таблица 7

ПРИМЕР СОСТАВА 5	%мас./мас.
КОРИЧНЕВЫЙ САХАР	40-60
МЁД	20-30
эксципиент КСИЛИТНЫЙ СИРОП	10-20
МАННИТНЫЙ СИРОП	10-20
Полисахаридная фракция ЛИСТЬЕВ подорожника	0,1-1
Полисахаридная фракция АЛТЕЯ	0,1-1,6
Полифенольная фракция РЕПЕШКА	0,3-1

Таблица 8

ПРИМЕР СОСТАВА 6	%мас./мас.
КОРИЧНЕВЫЙ САХАР	40-60
МЁД	20-30
ДЕИОНИЗИРОВАННАЯ ВОДА и/или другой подходящий носитель или эксципиент	10-20
ГЛЮКОЗНЫЙ СИРОП	10-20
МАЛЬТИТНЫЙ СИРОП	10-20
Полисахаридная фракция ПОДОРОЖНИКА	0,2-1
Полисахаридная фракция АЛТЕЯ	0,1-1,6
Полифенольная фракция РЕПЕШКА	0,3-1

В одном предпочтительном варианте выполнения изобретения во всех приведенных выше примерах полисахаридные и полифенольные фракции лиофилизируют или сушат распылительной сушкой.

Экспериментальные примеры

Следующие экспериментальные примеры имеют цель проиллюстрировать некоторые анализы, выполненные для композиции по настоящему изобретению.

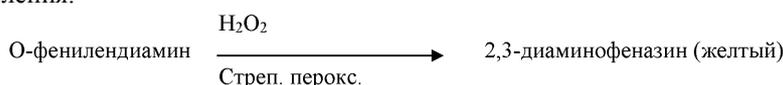
1. Анализ мукоадгезии.

Мукоадгезивный эффект продукта, способствующий образованию защитной пленки на слизистых оболочках, можно оценить с помощью подходящих моделей *in vitro*.

Используемая модель демонстрирует, что мукоадгезивность продуктов, предназначенных для лечения слизистых оболочек, может быть определена путем оценки процента ингибирования связывания лектин-гликопротеин. Слизистые буккальные клетки первоначально обрабатывают биотинилированным лектином (Con-A), белком, содержащимся в некоторых бобовых (*Canavalia ensiformis*), обладающим высоким сродством к остаткам глюкозида и маннозида, присутствующим в гликопротеинах мембраны. Таким образом, сайты гликопротеинов слизистых оболочек будут взаимодействовать с биотинилированным лектином (обработанным биотином, т.е. витамином Н). Клетки, обработанные биотинилированным лектином, заряжены стрептавидинпероксидазой, что позволяет образовывать комплекс белок/глюкоза/лектин/биотин/стрептавидинпероксидаза благодаря высокому сродству между биотином и стрептавидином.

В этот момент клетки промывают и количественно оценивают комплекс белок/глюкоза/лектин/биотин/стрептавидинпероксидаза, оценивая активность пероксидазы посредством реакции окисления орто-фенилендиамина (колориметрическая оценка).

Фактически, комплекс белок/глюкоза/лектин/биотин/стрептавидинпероксидаза будет катализировать реакцию окисления:



Интенсивность желтого/оранжевого окрашивания раствора (измеренная с использованием спектрофотометра при $\lambda=450$ нм) пропорциональна количеству гликопротеин-лектиновых связей и, следовательно, количеству доступных сайтов (гликопротеинов) для мукоадгезии.

Определенная таким образом величина абсорбции составляет "контроль".

При определении мукоадгезивности продукта клетки обрабатывают предварительно этим продуктом (инкубирование при 30°C в течение 15 мин перед обработкой лектином).

Если исследуемый продукт содержит мукоадгезивные вещества, они будут связываться с сайтами глюкозида и маннозида, присутствующими в гликопротеинах мембраны.

На следующем этапе при добавлении последовательности биотинилированного лектина, стрептавидинпероксидазы и орто-фенилендиамина будет получена менее интенсивная окраска по сравнению с контролем потому, что часть глюкозидных сайтов, доступных для связывания с Con-A, уже была занята мукоадгезивными веществами, присутствующими в исследуемом продукте. Фактически, первоначальное связывание между мукоадгезивными веществами, содержащимися в исследуемом продукте, и глюкозидными сайтами частично нарушает последующее конъюгирование Con-A с комплексом стрептавидинпероксидазы и последующее развитие цвета после добавления насыщенной кислородом воды.

Уменьшение величины абсорбции пропорционально способности исследуемых веществ "мукоадгезировать" к клеткам слизистой оболочки.

Мукоадгезивная способность выражается в процентах ингибирования связывания гликопротеин/лектин и представляет собой процентное содержание сайтов слизистой оболочки, занимаемых продуктом, в соответствии с уравнением:

$$\text{Процент мукоадгезии продукта} = (1 - \text{абс. образец/абс. контроль}) \times 100$$

Кроме того, помимо мукоадгезивной способности также оценивается устойчивость мукоадгезивного слоя к действию раствора слюны, с которым он вступает в контакт.

С этой целью во второй фазе эксперимента проявляется устойчивость во времени (0,5-2 ч) мукоадгезивности продукта после воздействия непрерывного потока искусственного раствора слюны.

Для выполнения этого анализа используется система ячеек Франца, обычно используемая для оценки чрескожного всасывания вещества или для изучения других процессов проникновения через естественные или искусственные мембраны.

В этом эксперименте буккальные клеточные культуры были депонированы у донора и обработаны составами продукта, как описано в анализе в 2 при разных разведениях, как показано на фиг. 2, (разведение, по всей вероятности, ближе к реальным условиям, что может иметь место *in vivo*). Затем донора питали непрерывным потоком (2 мл/мин) искусственного раствора слюны с помощью перистальтического насоса.

У основания донора в зоне разделения с рецептором была помещена ацетатцеллюлозная мембрана, способная обеспечить отток слюнного раствора от донора к рецептору, сохраняя клетки слизистой оболочки в доноре.

Поток слюны через клетки слизистой оболочки, обработанные исследуемым продуктом, регулярно прекращали через 0,5, 1, 2 часа, и клетки донора переносили в подходящую пробирку для оценки мукоадгезивности.

В свете полученных результатов можно утверждать, что продукт, обладающий хорошей устойчивой мукоадгезивностью, может играть интересную защитную роль на клетках слизистой оболочки полости рта.

Чтобы имитировать естественное разведение сиропа в полости рта, анализ мукоадгезивности проводили на продукте, разведенном 1:2; для большей полноты анализировали также мукоадгезивность продукта, разведенного 1:5.

Процент мукоадгезивности неразбавленного или разбавленного (1:2 и 1:5) продукта по отношению к буккальным клеткам человека показан на фиг. 1.

Устойчивость мукоадгезивного слоя, полученного с помощью продукта, разбавленного 1:2 в разное время - 0,5 ч, 1 ч и 2 ч, - по отношению к моделируемому слюнному раствору (0,9% физиологический раствор NaCl) показано на фиг. 2.

2. Анализ антиокислительной активности поглотительного типа.

Оценка антиокислительной активности образца на клетках человека, подверженных прогрессирующему окислительному стрессу химического типа.

Оценка антиокислительного действия получена из количественного определения образования свободных радикалов в клетках, подвергшихся воздействию образца и окислительному стрессу.

Применяемый метод основан на использовании флуориметрического зонда 2,7-дихлорфлуоресцеинацетат-DCA-: этот зонд проникает в клетки, связывается с белками и макромолекулами клеточной мембраны. В этой форме зонд не флуоресцентный, он становится флуоресцентным только при окислении свободными радикалами. Клетки, предварительно обработанные DCA, подвергаются различным разведениям образца и перекиси водорода. С регулярными интервалами от 20 до 100 мин (5 измерений) образование свободных радикалов оценивают с помощью флуориметра (Victor X4 Perkin Elmer): действие поглотителя получено путем сравнения свободных радикалов, образующихся при воздействии клеток на образец и перекисью водорода, и тех, которые образуются при воздействии только перекиси водорода.

Были приготовлены композиции согласно примерам 2, 4 и 6.

1 г композиции, состоящей из 0,2% мас./мас. полисахаридной фракции алтея, 0,35% полисахаридной фракции подорожника, 0,2% полифенольной фракции Репешка, содержащей танины, 25% мёда (для композиций 4 и 6 и 35% для композиции 2), 46,6% коричневого сахара и фармацевтически приемлемых носителей и эксципиентов (согласно соответствующим примерам), взвешивали и доводили до конечного объема 10 мл (10 мг/мл) в физиологическом растворе. Исследуемый раствор имел pH более 7. Начиная с этого маточного раствора, первое разведение готовили в концентрации 0,5 мг/мл в физиологическом растворе; из чего путем применения коэффициента разведения 1:2 были получены другие четыре разведения.

Другие композиции в соответствии с приведенными выше примерами композиций также были проанализированы, что дало аналогичные результаты. Также было подтверждено отсутствие антиокислительной активности носителей и эксципиентов, используемых в композициях. Одновременно с композицией анализировали также положительный контроль и внутренний контроль.

Положительный контроль: клетки подвергали воздействию 500 мкМ раствора H₂O₂.

Внутренний контроль: клетки подвергали воздействию раствора аскорбиновой кислоты (0,05 мг/мл).

Отрицательный контроль: клетки подвергали воздействию инокуляционной среды.

Анализ проводили на простой клеточной модели, состоящей из монослоя стабилизированных кератицитов человека (клетки были приобретены у IZSLER и были гарантированно свободны от любого вирусного/бактериального загрязнения и/или от микоплазмы).

Описание реагентов/растворов и соответствующих сокращений:

Культуральная среда: Дульбекко с высоким содержанием глюкозы (D-MEM) с глутамином (2 мМ), антибиотиками, такими как пенициллин (2000 ЕД/мл), стрептомицин (1000 ЕД/мл)-Фунгизон (2 мкг/мл) и Фетальная Телячья Сыворотка (10%), гидрокортизон 0,5 нг/мл, инсулин 5 мкг/мл, Эпителиальный Фактор Роста 0,01 мкг/мл

DMEM

Среда для инокуляции: Дульбекко с высоким содержанием глюкозы (D-MEM) с глутамином (2 мМ), антибиотиками, такими как пенициллин (2000 ЕД/мл), стрептомицин (1000 ЕД/мл)-Фунгизон (2 мкг/мл) и Фетальная Телячья Сыворотка (5%), гидрокортизон 0,5 нг/мл, инсулин 5 мкг/мл, Эпителиальный Фактор Роста 0,01 мкг/мл

DMEMi

Фосфатный буфер

PBS

Нейтральный Красный рабочий раствор: 0,4% маточный раствор разбавляют в Минимальной Основной Среде (MEM), фильтруют на бумаге непосредственно перед использованием. Используют концентрацию 0,04%

NRw

Нейтральная красная экстракционная жидкость: приготовлена за несколько минут до использования, состоит из 49% дистиллированной воды - 50% Этанол - 1% ледяной уксусной кислоты

ExB

2,7 ДИХЛОРФЛУОРЕСЦЕИНА ДИАЦЕТАТ: 4 мкМ

DCA

Дозировки, способ введения и аналитические копии.

Были созданы две серии (в присутствии и в отсутствие H₂O₂) пяти основных разведений образца 2: 0.5 - 0.25 - 0.125 - 0.0625 и 0.0313 мг/мл. Такую же процедуру проводили для получения тех же пяти разведений в солевом растворе 500 мкМ H₂O₂. 150 мкл на каждое разведение (в физиологическом растворе и в H₂O₂) распределяли в четыре лунки на двух разных планшетах.

День 1.

Посев клеток.

Культивируемые клетки ферментативно отделяли от питательной среды и подсчитывали с помощью электронного счетчика клеток (Scerter); готовили клеточную суспензию (в среде для инокуляции) с плотностью 300000 клеток/мл, которую затем распределяли по 96-луночным планшетам: 100 мкл на лунку, получая плотность посева 30000 клеток на лунку. Наконец, чашки помещали обратно в культуру в инкубаторе при 37°C и 5% обогащенной CO₂ влажной атмосфере на последующие 24 ч.

День 2.

Воздействие зонда DCA.

Среду для инокуляции удаляли, клетки один раз промывали PBS, затем PBS удаляли и в обеих чашках распределяли 150 мкл DCA (4 мкМ). Затем планшеты помещали обратно в инкубатор при 37°C и 5% обогащенной CO₂ атмосфере на 15 мин.

В конце периода инкубации DCA раствор удаляли и клетки промывали один раз PBS, затем 150 мкл вышеописанных разведений образца и контролей распределяли на планшетах. Затем образование свободных радикалов измеряли от T0 (сразу после инокуляции в две чашки) каждые 20 мин вплоть до 100 мин (5 измерений) с помощью флуориметра. В конце измерений через 100 мин инокулят из обеих чашек был удален, и был проведен анализ жизнеспособности Красного связывания.

Клетки оставляли контактировать с 150 мкл NRw в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе с атмосферой, обогащенной 5% CO₂. Нейтральный красный (NR) проникает в клетки и накапливается в лизосомах. Только жизнеспособные клетки, которые сохранили функциональные возможности мембраны, способны удерживать NR. Соответственно, чем больше количество жизнеспособных клеток, тем большее количество NR сохраняется в клетках. В конце 3-часовой инкубации планшеты собирали, раствор NR удаляли и клетки подвергали промывке со 150 мкл PBS для того, чтобы убрать избыточный NR. Затем, извлечение Нейтрального Красного, накопленного в лизосомах, проводили путем введения в каждую лунку 150 мкл ExB. Стадия экстракции продолжалась 15 мин при перемешивании при комнатной температуре. Таким образом, получают красную жидкость, интенсивность которой, пропорциональная количеству присутствующих жизнеспособных клеток, измеряется спектрофотометрически при 570 ± 30 нм.

Интенсивность испускаемой флуоресценции и Нейтрального Красного, экстрагированного на 96-луночных планшетах, измеряли флуориметрически и спектрофотометрически при 540 нм с помощью планшетного ридера Victor X4 (Perkin Elmer).

Оценка результатов и расчет

Выявление уровня выживаемости:

$$\% \text{ Жизнеспособности} = [(O.D. \text{ Образец} \pm H_2O_2 / O.D. \text{ Контроль Полож/Отриц}) \times 100]$$

$$\% \text{ Ингибирования жизнеспособности} = (100\% \text{ Жизнеспособности})$$

O.D.: оптическая плотность;

O.D. Образец \pm H₂O₂: средняя оптическая плотность, полученная для клеток, подвергнутых воздействию образца H₂O₂ и без него;

O.D. Положительного/Отрицательного контроля: среда с оптической плотностью, полученная из клеток, подвергнутых воздействию раствора H₂O₂ или только физиологического раствора (100% Жизнеспособность)

Оценка антиоксидантной активности поглотителя:

F.U.: единица флуоресценции;

F.U. положительного контроля: среднее значение F.U., испускаемой из клеток, подвергшихся воздействию раствора H₂O₂ (максимальное образование свободных радикалов);

F.U. отрицательного контроля: среднее значение F.U., испускаемой из клеток, не подвергшихся окислительному стрессу.

На каждом временном интервале воздействия (T0-T1-T2-T3-T4-T5) проводились:

1) нормализация средняя F.U., испускаемая из клеток, подвергшихся воздействию образца, витамина С без окислительного стресса, вычитается из среднего значения F.U., испускаемой из клеток, подвергшихся воздействию образца, витамину С и окислительному стрессу. Другими словами, средние значения флуоресценции, испускаемой планшетом без стресса, были вычтены из средних значений флуоресценции, испускаемых из планшета со стрессом;

2) расчет процента снижения свободных радикалов:

$$\% \text{ FR ингибирования} = [100 - (F.U. \text{ Образец}_{\text{полож}} - F.U. \text{ Образец}_{\text{отриц}}) / (U.F. \text{ Контроль}_{\text{полож}} - U.F. \text{ Контроль}_{\text{отриц}}) \times 100]$$

F.U. Образец_{полож}: клетки, подвергшиеся воздействию образца и окислительному стрессу;

F.U. Образец_{отриц}: клетки, подвергшиеся воздействию только образца;

F.U. Контроль_{полож}: клетки, подвергшиеся только окислительному стрессу;

F.U. Контроль_{отриц}: клетки, подвергшиеся воздействию физиологического раствора без окислительного стресса.

Критерии приемлемости исследования.

Образец - положительный и отрицательный контроль: коэффициент вариации должен быть <20%.

Коэффициент вариации

$$VC = ((sd / OD_{\text{среднее}}) \times 100)$$

Значение p (двусторонний t-критерий типа 2) должно быть ниже 0,05%.

В таблице ниже приведены данные, связанные с развитием свободных радикалов. Полученные данные представлены на фиг. 5.

Таблица 9

мг/мл	Композиция по изобретению						
	РАЗВИТИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ						
	0,5	0,25	0,125	0,063	0,03	Вит. С 0,05	Отриц.
	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	Контр.
T0	6311,67	6178	6072	7070	7237	5654	10315
20 МИН	7026	6984	7993	9473	10308	5993	14015
40 МИН	6643	6945	8228	10021	10758	5721	14248
60 МИН	6192	6716	8543	9582	10140	5240	13120
80 МИН	5952	6813	8861	9797	10173	4802	12789
100 МИН	5534	6643	8857	9649	10181	4937	12600

Данные, представленные в таблице, показывают, что при разведениях 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл значения, полученные с помощью композиции по изобретению, сравнимы с теми, которые получены с витамином С.

Полученные данные были затем обработаны с точки зрения % защиты от свободных радикалов, проявляемой анализируемыми веществами.

В таблице ниже приведены данные, относящиеся к полученным результатам. То, что указано в таблице ниже, было графически представлено на фиг. 6.

Таблица 10

мг/мл	Композиция по изобретению					
	% ЗАЩИТЫ ОТ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ					
	0,5 мг/мл	0,25 мг/мл	0,125 мг/мл	0,063 мг/мл	0,03 мг/мл	Вит. С 0,05 мг/мл
T0	39	40	41	31	30	45
20 МИН	50	50	43	32	26	57
40 МИН	53	51	42	30	24	60
60 МИН	53	49	35	27	23	60
80 МИН	55	48	32	25	22	63
100 МИН	56	47	30	23	19	61

Данные, представленные в таблице, показывают, что при разведениях 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл значения, полученные с помощью композиции по изобретению, сравнимы с теми, которые получены с витамином С.

В таблице ниже представлена статистическая значимость полученных результатов.

Таблица 11

мг/мл	Композиция по изобретению					
	СТАТИСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ (Значение p)					
	0,5 мг/мл	0,25 мг/мл	0,125 мг/мл	0,063 мг/мл	0,03 мг/мл	Vit, С 0,05 мг/мл
T0	9,26E-11	1,72E-10	8,79E-11	8,61E-09	5,25E-09	7,10E-11
20 мин	1,92E-09	3,38E-09	3,04E-08	1,05E-06	4,93E-06	6,88E-10
40 мин	6,56E-10	1,41E-09	1,57E-08	1,27E-06	8,58E-06	2,04E-10
60 мин	3,23E-09	2,14E-08	4,76E-07	1,54E-05	7,96E-05	8,91E-10
80 мин	1,44E-06	6,42E-06	3,54E-04	3,12E-03	8,32E-03	2,62E-07
100 мин	4,43E-07	3,20E-06	3,22E-04	2,42E-03	8,19E-03	1,71E-07

Как видно из приведенной выше таблицы, статистический анализ полученных результатов подтвердил, что проведенное испытание удовлетворяет всем необходимым критериям приемлемости, и, следовательно, подтверждает данные, полученные для исследуемых веществ.

Подводя итог вышесказанному, анализы, проведенные на образцах композиции по изобретению в различных вариантах выполнения, как описано выше, продемонстрировали, что композиция обладает хорошим поглощающим действием, способным нейтрализовать индуцированные H₂O₂ свободные радикалы (FR): первая проанализированная доза (0,5 мг/мл) снижает образование FR 39-50-53-53-55 и 56% соответственно после каждого раза воздействия. Благодаря этому результату эта доза может считаться наиболее эффективной дозой.

Вторая проанализированная доза (0,25 мг/мл) снижает образование FR 40-50-51-49-48 и 47% соответственно после каждого раза воздействия.

При третьей дозе (0,125 мг/мл) образование FR уменьшается 41-43-42-35-32 и 30% соответственно после каждого раза воздействия.

При четвертой дозе (0,0625 мг/мл) образование FR уменьшается 31-32-30-27-25 и 23% соответственно после каждого раза воздействия.

Пятая доза (0,0313 мг/мл) значительно ингибирует образование FR 30-26-24-23-22 и 19% соответственно после каждого раза воздействия.

Аскорбиновая кислота (0,05 мг/мл) обладает акцепторным действием, способным снижать FR 45-57-60-60-63 и 61% соответственно после шестикратного воздействия стресса.

Анализ жизнеспособности с Захватом Нейтрального Красного, проведенный на планшете, не подвергнутом окислительному стрессу, не выявил снижения жизнеспособности клеток, что могло бы повлиять на значимость анализа.

Соответственно, композиция по изобретению, с учетом высокой силы приложенного стресса, оказалась хорошим поглотителем.

3. Оценка стабильности композиции по изобретению.

Стабильность композиции по изобретению в жидкой форме (сироп, как в приведенных выше примерах в 2) в отношении к танинам оценивали путем измерения содержания общего содержания танинов в пересчете на пирогаллол с помощью спектрофотометрического метода, описанного в Европейской Фармакопее (EP 9.2, 2.8.14) для репешка.

Как видно из данных, представленных в таблице ниже, никаких изменений титра не наблюдается в течение шести месяцев, при этом образец содержится в экстремальных условиях при 40°C и 75% относительной влажности.

Витамин С в препаратах, которые отличались по составу исключительно благодаря наличию витамина С вместо танинов, не проявлял стабильности после T0.

Контрольный ориентир	Танины, такие как Пирогаллол		
	T0	T3 месяцы	T6 месяцы
Ускоренная стабильность (40°C, RH 75%)	0.05	0.05	0.05

4. Анализ барьерного эффекта.

Для анализа барьерного эффекта использовали две камеры, физически разделенные полупроницае-

мой мембраной (поры 0,4 мкм). Клетки фибробластов человека высевали в нижнюю камеру, тогда как воспалительный агент LPS (очищенный липополисахарид E.Coli) вводили в верхнюю камеру; на полупроницаемой мембране, разделяющей две камеры, была наложена тонкая пленка композиции, как описано в настоящем изобретении.

Индукцированный воспалительный ответ оценивали по полуколичественной дозе цитокина Интерлейкина 6 (IL6), высвобождаемого в культуральной среде нижней камеры: оценка барьерного эффекта была получена путем сравнения с положительным контролем, в котором две камеры были разделены одинаковым типом полупроницаемой мембраны, однако без каких-либо барьеров.

Что касается порогового значения, выше которого можно сказать, что вещество вызывает барьерный эффект в представленном здесь анализе, значение, равное 15% ингибирования по сравнению с контролем, было идентифицировано Авторами во время проведения анализа на основании анализов, проведенных на веществах, которые, как известно, обладают барьерным эффектом.

Затем оценивали барьерный эффект композиции в составах в 2. выше.

Данные, представленные на фиг. 3, показывают, как композиция обладает замечательным барьерным эффектом.

Оценочный анализ выполняли следующим образом с помощью метода, разработанного для имитации *in vitro* защитного действия веществ и составов, которые при нанесении *in vivo* на кожу и слизистые оболочки образуют "изолирующую" пленку от агентов окружающей среды.

В модели используется преимущество принципа, согласно которому клетки, подвергшиеся контакту с воспалительным агентом, продуцируют и секретируют провоспалительные медиаторы (цитокины) во внеклеточной среде в количестве, связанном со степенью вызванного воспаления. Чем большее количество воспалительного агента достигает клеток, тем больше высвобождается цитокинов.

Были подготовлены две камеры, физически разделенные полупроницаемой мембраной, которая позволяет проходить растворенным веществам достаточно малого размера.

В нижней камере, состоящей из лунки, содержащей чашки для клеточных культур, выращивают клетки NuDe (no. BS PRC 41, приобретенные у Istituto Zooprofilattico di Brescia, Италия), в то время как верхняя камера, состоящая из вставки для сложных клеточных культур (трансвеллов), вмещает воспалительный агент.

На поверхности полупроницаемой мембраны вставки, разделяющей две камеры.

На поверхности полупроницаемой мембраны вставки, разделяющей две камеры, перед введением воспалительного агента в верхнюю камеру тонкая пленка исследуемого образца наложена для оценки любого ВЕ при свободном прохождении воспалительного агента.

В зависимости от изолирующих способностей образца будет иметь место уменьшение миграции воспалительного агента из верхней камеры и, как следствие, меньшая стимуляция клеток для продуцирования цитокинов. Степень воспалительной реакции оценивают по полуколичественной дозе цитокинов, высвобождаемых в культуральной среде нижней камеры, в частности интерлейкина 6 (IL-6).

В качестве контроля используется аналогичный эксперимент, в котором образец не наложен на мембрану, что позволяет измерять действие воспалительного агента без какого-либо барьера в дополнение к полупроницаемой мембране.

Кроме того, используется внутренний контроль, в котором культивируемые клетки предварительно обрабатывают веществом, адаптированным для индуцирования высвобождения маркера, и образец помещают на полупроницаемую мембрану в отсутствие указанного вещества, таким образом, выполняется одно или несколько измерений во времени количества маркера в питательной среде указанного внутреннего контроля. Поэтому при внутреннем контроле клетки стимулируют сначала индуцирующим веществом, а затем оценивают, оказывает ли образец, который может пройти через мембрану и проникнуть в клетки, вытесненные вышеуказанной средой, эффект уменьшения высвобождения маркера, не связанный с барьерным эффектом. Например, когда воспалительный агент используется в качестве индуцирующего вещества, внутренний контроль позволяет понять, происходит ли снижение концентрации цитокинов в культуральной среде из-за барьерного эффекта или же образец, который может проникнуть в клетки подталкиваемой вышеупомянутой средой, оказывает какое-либо влияние на уменьшение воспалительного ответа независимо от барьерного эффекта.

Барьерный эффект (ВЕ) выражается в процентах от снижения высвобождения IL-6 и рассчитывается путем сравнения с положительным контролем, в котором две камеры разделены полупроницаемой мембраной одного типа без созданного образцом барьера.

4.1. Приготовление клеточной культуры.

Для каждого анализируемого образца (в соответствии с 2 выше) клетки линии NuDe высевали в лунки планшета для культивирования клеток один раз для анализа барьера (Т.В.) (ВА) и еще один раз для внутреннего контроля при плотности 40000 клеток/мл в среде МЕМ с добавлением 10% бычьей сыворотки (FBS); 1 мл клеточной суспензии на лунку.

Клетки обрабатывали ОБРАЗЦОМ (САМ), ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ КОНТРОЛЕМ (С+) (воспалительный агент без образца) и ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ КОНТРОЛЕМ (С-) (только среда), и каждый анализ проводили в трижды.

Планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи (22-24 ч).

4.2. Подготовка вставок для сложных клеточных культур.

Вставки для Клеточных Культур (Becton Dickinson) для сложных клеточных культур помещали на другие планшеты, и на каждую из них подавали фиксированное количество коллагена 0,1 мг/мл. Планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи (22-24 ч).

Для продолжения эксперимента ожидается слияние не ниже чем 95%.

Из двух планшетов (ВА и IC) со вставками удаляли коллаген, и вставки оставляли под потоком вытяжного шкафа на время, необходимое для полного высыхания (1(Н15 мин)).

4.3. Барьерные анализы (ВА).

Стадии, описанные ниже, были выполнены на культуральном планшете для ВА.

Настройка слоя образца в ВА.

На полупроницаемую мембрану образца инокулировали 100 мкл композиции на основе 0,5% альгината и позволяли формироваться слою в течение 20 мин, тогда как во вставках С+ и С- ничего не добавляли. По истечении 20 мин избыток образца удаляли и мембраны промывали PBS в соответствии с процедурами, указанными в протоколе.

Добавление LPS (воспалительного агента) к вставкам ВА.

После высыхания слоя образца, как, например, по 2 выше, в первые три вставки САМ и в три вставки С+ инокулировали 300 мкл раствора LPS (мембранный липополисахарид) при концентрации 1 мкг/мл, в то время как в оставшиеся три С- добавляли 300 мкл среды MEM с 5% FBS. Вставки помещали в соответствующие лунки с клетками и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C и в атмосфере, обогащенной 5% CO₂, в течение ночи (22-24 ч).

После завершения 1-часового инкубирования вставки удаляли и выбрасывали, а чашки снова инкубировали в течение ночи (22-24 ч).

4.4. Анализ внутреннего контроля (IC).

Анализ внутреннего контроля был проведен одновременно с ВА.

Воздействие LPS на клетки IC.

После высушивания в первые шесть вставок IC, в три для анализируемого образца, САМ, и три для С+ инокулировали 300 мкл раствора LPS, в то время как в оставшиеся три С- добавляли 300 мкл среды.

Вставки с LPS и MEM затем помещали в лунки с клетками IC и все инкубировали в течение 1 ч.

Удаление LPS и сушка мембран IC.

После завершения 1-часового инкубирования вставки удаляли из лунок с клетками и переносили на пустой планшет, тогда как планшет с клетками помещали в инкубатор.

Все еще присутствующий раствор LPS удаляли из вставок и последние подвергали быстрой промывке ультрачистой стерильной водой и давали высохнуть.

Расположение слоя образца в IC.

На полупроницаемую мембрану трех вставок для образца инокулировали 100 мкл композиции на основе 0,5% альгината и давали формироваться слою в течение 20 мин, тогда как во вставках С+ и С- ничего не добавляли. По истечении 20 мин избыток образца удаляли и мембраны промывали PBS в соответствии с процедурами, указанными в протоколе.

Добавление LPS во вставки IC.

Как только вставки с образцом были готовы, ко всем вставкам добавляли 300 мкл среды (САМ, С+, С-). Вставки помещали в соответствующие лунки с клетками и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

После завершения 1-часового инкубирования вставки удаляли и выбрасывали, а планшеты снова инкубировали в течение ночи (22-24 ч).

4.5. Сбор супернатанта и ферментный иммуноанализ.

По истечении 22-24 ч супернатанты собирали из планшетов ВА и IC для проведения анализа ELISA и полуколичественной дозировки IL-6.

Оценка барьерного эффекта (BE).

BE вещества или соединения выражается в % снижения высвобождения цитокина IL-6 клетками, подвергнутыми воздействию LPS, где образец был проанализирован относительно положительного контроля (С+), где клетки подвергались воздействию только LPS.

$$BE = \% \text{ снижения высвобождения цитокина IL-6} = 100 - \left[\frac{(\text{пг/мкл цитокина, высвобожденного из образца})}{(\text{пг/мкл цитокина, высвобожденного из С+})} \times 100 \right]$$

Как видно из результатов на фиг. 1-4, композиция по изобретению обладает превосходными мукоадгезивными свойствами и высоким барьерным эффектом.

Следовательно, очевидно, что помимо активности поглотителя свободных радикалов и стабильности композиция также обладает барьерным эффектом и высокими мукоадгезивными свойствами.

5. Подготовка фракций.

1. Пример приготовления полисахаридной (слизистой) фракции Алтея.

Высушенный и измельченный корень алтея подвергают экстракции водой в статическом экстракторе путем расщепления перколатором, при этом растение погружают в растворитель, а растворитель рецир-

кулируют снизу вверх механическим насосом.

Соотношение лекарственное средство-растворитель (DSR) составляет 1:10, температура экстракции составляет 90°C, продолжительность экстракции составляет 12 ч. Из полученной смеси нерастворимый остаток отделяют от растворимой фракции статическим декантированием и затем фильтрованием на бумажном фильтре. Полученный раствор концентрируют выпариванием этанола с использованием вакуумной системы концентрирования. При достижении степени концентрации 10:1 концентрирование прекращают, и сушку завершают лиофилизацией или распылительной сушкой. Лиофилизированный материал составляет интересующую фракцию (DER 4-10:1).

2. Пример приготовления полисахаридной фракции подорожника.

Высушенные и измельченные листья подорожника подвергают экстракции 50% этанолом (этанол:вода 50:50 об./об.) в статическом экстракторе путем расщепления перколатом, при этом растение погружают в растворитель, а растворитель рециркулируют снизу вверх механическим насосом.

Соотношение лекарственное средство-растворитель (DSR) составляет 1:10, температура экстракции составляет 50°C, продолжительность экстракции составляет 6-8 ч. Из полученной смеси нерастворимый остаток отделяют от растворимой фракции статическим декантированием и затем фильтрованием на бумажном фильтре. Полученный раствор концентрируют выпариванием этанола с использованием вакуумной системы концентрирования. При достижении степени концентрации 10:1 концентрирование прекращают, и сушку завершают лиофилизацией или распылительной сушкой. Лиофилизированный материал составляет интересующую фракцию (DER 4-10:1).

3. Пример приготовления полифенольной фракции Репешка.

Высушенные и раскрошенные головки репешка подвергают экстракции водой в статическом экстракторе путем расщепления перколатом, при этом растение погружают в растворитель, а растворитель рециркулируют снизу вверх механическим насосом.

Соотношение лекарственное средство-растворитель (DSR) составляет 1:8, температура экстракции составляет 90°C, продолжительность экстракции составляет 12 ч. Из полученной смеси нерастворимый остаток отделяют статическим декантированием и затем фильтрованием на бумажном фильтре. Из полученной смеси нерастворимый остаток отделяют от растворимой фракции статическим декантированием и затем фильтрованием на бумажном фильтре. Полученный раствор концентрируют выпариванием этанола с использованием вакуумной системы концентрирования. При достижении степени концентрации 10:1 концентрирование прекращают, и сушку завершают лиофилизацией или распылительной сушкой. Лиофилизированный материал составляет интересующую фракцию (DER 4-10:1).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения кашля, содержащая одну или несколько полисахаридных фракций *Plantago lanceolata*, одну или несколько полисахаридных фракций *Althaea officinalis*, одну или несколько полифенольных фракций *Agrimonia eupatoria*, содержащих танины, коричневый сахар, мёд и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов, причем указанная одна или несколько полисахаридных фракций *Plantago lanceolata* содержит полисахариды, имеющие молекулярную массу более чем 20000 Да, с процентным содержанием по массе 3-50% и причем указанная одна или несколько полисахаридных фракций *Althaea officinalis* содержит полисахариды, имеющие молекулярную массу более чем 20000 Да, с процентным содержанием по массе 5-50% и причем указанная одна или несколько полифенольных фракций *Agrimonia eupatoria*, содержащих танины, содержит полифенолы с процентным содержанием по массе 3-50%.

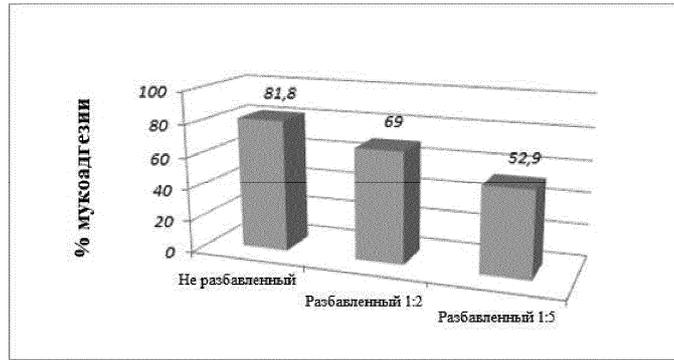
2. Композиция по п.1, в которой указанные эксципиенты выбраны из натуральных ароматизаторов, консервантов, загустителей.

3. Композиция по п.2, в которой указанный один или несколько натуральных ароматизаторов, консервантов, загустителей выбраны из лимонного сока, ежевичного сока, натурального апельсинового ароматизатора, натурального лимонного ароматизатора, натурального миртового ароматизатора, ксантановой камеди.

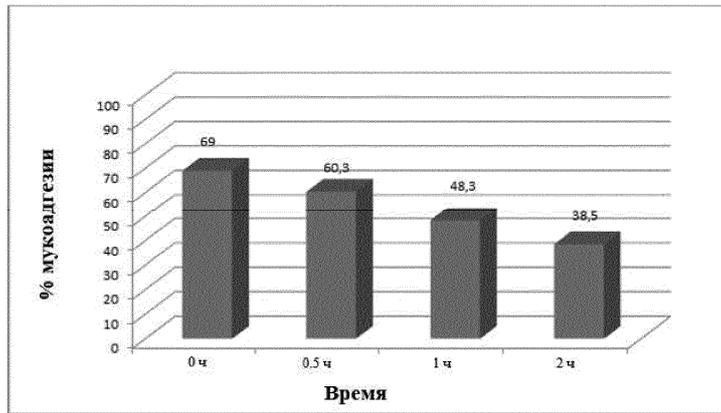
4. Композиция по любому из пп.1-3 в форме таблетки, пилюли, гранул, порошка, сиропа, эликсира, твердого желатина, мягкого желатина, суспензии, спрея, эмульсии, раствора.

5. Композиция по любому из пп.1-4, в которой указанное лечение представляет собой лечение сухого кашля, продуктивного кашля, кашля, связанного с URTI (инфекцией верхних дыхательных путей), кашля из-за стекания слизи из носоглотки.

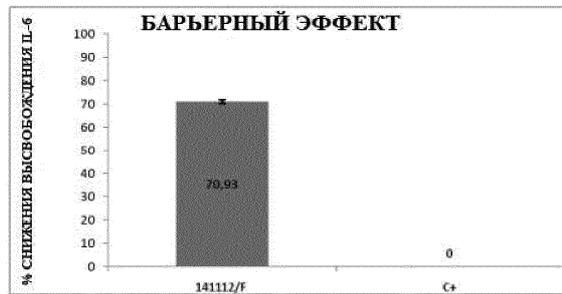
6. Способ получения композиции по любому из пп.1-5, состоящей из полисахаридной фракции(й) *Plantago lanceolata*, фракции(й) полисахаридов *Althaea officinalis*, полифенольной фракции(й), содержащей танины, из *Agrimonia eupatoria*, коричневого сахара, мёда и одного или нескольких фармацевтически приемлемых носителей и эксципиентов, где полисахаридную фракцию(и) *Plantago lanceolata*, полисахаридную фракцию(и) *Althaea officinalis*, полифенольную фракцию(и) *Agrimonia eupatoria*, содержащую танины, смешивают с мёдом, коричневым сахаром и одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами и носителями.



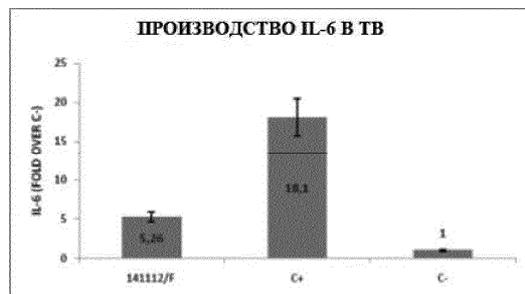
Фиг. 1



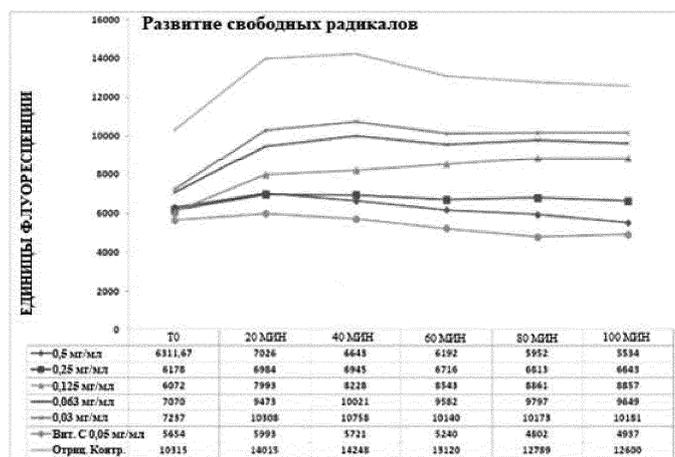
Фиг. 2



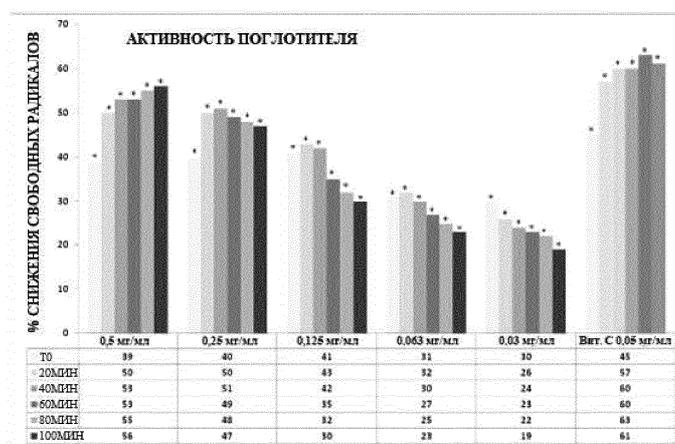
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

