

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044986**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.19

(21) Номер заявки
202192022

(22) Дата подачи заявки
2020.02.12

(51) Int. Cl. *A61K 8/98* (2006.01)
A23L 21/20 (2016.01)
A61K 35/644 (2015.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(54) **ЭКСТРАКТ ЖИДКОГО ПРОПОЛИСА, СПОСОБ ЕГО ПРОИЗВОДСТВА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **P20190325A; P20200178A**

(32) **2019.02.19; 2020.02.03**

(33) **HR**

(43) **2021.10.21**

(86) **PCT/EP2020/053573**

(87) **WO 2020/169425 2020.08.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АПИОТИКС ТЕКНОЛОДЖИС Д.о.о.
(HR)

(72) Изобретатель:
Радик Саса, Радик Бозо, Суран Елена
(HR)

(74) Представитель:
Нюховский В.А. (RU)

(56) CN-A-1685928
JP-A-2004159563
KR-A-20130134800
CN-A-108181388
SHUAI HUANG ET AL.: "Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis", MOLECULES, vol. 19, no. 12, 26 November 2014 (2014-11-26), pages 19610-19632, XP055330723, DOI: 10.3390/molecules191219610 figure 1
WO-A1-2011092511
US-A-4382886
WO-A2-2011141007
US-A1-2013006011
CN-A-103278575
WO-A1-2014176654

(57) Настоящее изобретение раскрывает новый стандартизированный жидкий экстракт прополиса и фармацевтический состав на основе указанного экстракта, способы их производства и применения. Жидкий экстракт получают экстракцией сырого прополиса экстракционным растворителем на основе смеси ПЭГ 200-600 (96,5-99,9 вес.%) и лецитинов (0,1-3,5 вес.%). Экстракт характеризуется стандартизированным содержанием п-кумаровой кислоты (1), транс-феруловой кислоты (2), кофейной кислоты (3) и САРЕ (4). Экстракт используется в качестве активного ингредиента при производстве фармацевтических, косметических, ветеринарных, агрохимических или функциональных пищевых продуктов. Фармацевтический состав, согласно изобретению, состоит из 5-95% по весу указанного экстракта прополиса и до 100% вспомогательных веществ, необходимых для производства различных лекарственных форм.

044986
B1

044986
B1

Область техники

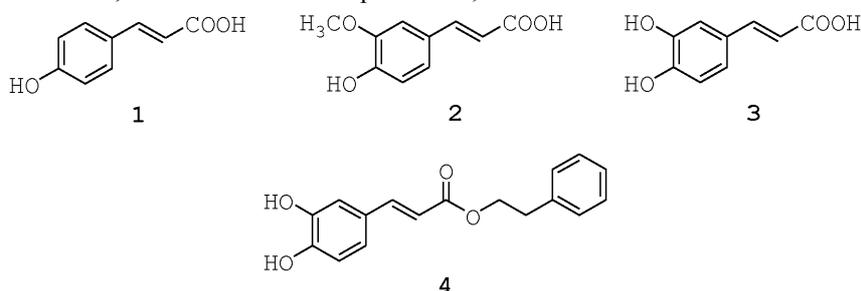
Настоящее изобретение относится к новому жидкому стандартизованному экстракту прополиса, к способу производства новой фармацевтической композиции на основе упомянутого экстракта и к его применению.

Техническая проблема

Что касается того факта, что прополис представляет собой смесь пчелиного воска и большого количества природных органических соединений, различные процессы экстракции дают экстракты с очень разным составом активных веществ. С использованием хемоселективных экстракционных растворителей (ES), которые обладают способностью к селективной экстракции преимущественно определенных групп органических соединений, вместе с использованием подходящих аналитических методов теоретически возможно получить согласованный и стандартизованный состав экстракта прополиса.

Технические задачи, решаемые настоящим изобретением, включают

(i) безалкогольный жидкий экстракт прополиса, который будет характеризоваться высоким и стандартизованным содержанием фенольных прополисовых кислот, пара-кумаровая кислота (1), транс-феруловая кислота (2), кофейная кислота (3) и 2-фенилэтиловый эфир кофейной кислоты, 2-фенил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4; CAPE), для которых известны несколько фармакологической активности как на человеческие, так и на животные организмы;



(ii) способ его изготовления;

(iii) применение для производства фармацевтических, косметических, ветеринарных, агрохимических или пищевых продуктов с известным стандартизованным содержанием активных веществ прополиса 1-4; и особенно

(iv) фармацевтическая композиция на основе указанного экстракта прополиса, которая будет эффективна при лечении воспалительных и инфекционных заболеваний, а также заболеваний и состояний, при которых антиоксидантная, противовоспалительная и иммуномодулирующая активность определенных активных веществ прополиса играет важную роль в этиологии заболеваемости, о чем свидетельствуют некоторые источники информации в современном уровне техники.

Такие безалкогольные экстракты с незначительным содержанием пчелиного воска и других балластных соединений прополиса с высоким и стандартизованным содержанием высокобиоактивных ингредиентов прополиса представляют собой основу для разработки и производства высокоценных фармацевтических, ветеринарных, агрохимических или функциональных пищевых продуктов или пищевых добавок. Напротив, использование для этой цели стандартных экстрактов прополиса на основе этанола, глицерина или 1,2-пропиленгликоля сопряжено с различными трудностями, такими как неизвестное содержание вышеупомянутых активных веществ прополиса или низкий количественный состав ценных фенольных кислот и CAPE относительно флавоноидных ингредиентов прополиса.

Настоящее изобретение относится к

(i) применению состава специального экстракционного растворителя (ES), который служит для хемоселективного процесса экстракции сырого прополиса;

(ii) способу количественного определения активных ингредиентов прополиса, включая основные активные вещества 1-4;

(iii) стандартизации приготовленного таким образом жидкого экстракта прополиса путем разбавления определенным количеством того же экстракционного растворителя до желаемого уровня активных веществ 1-4 согласно настоящему изобретению; где указанный экстракционный растворитель состоит из двух или более пищевых и фармацевтически приемлемых веществ, а также в конечном продукте жидкий стандартизованный экстракт прополиса. Этот же растворитель для экстракции играет роль носителя или разбавителя; и

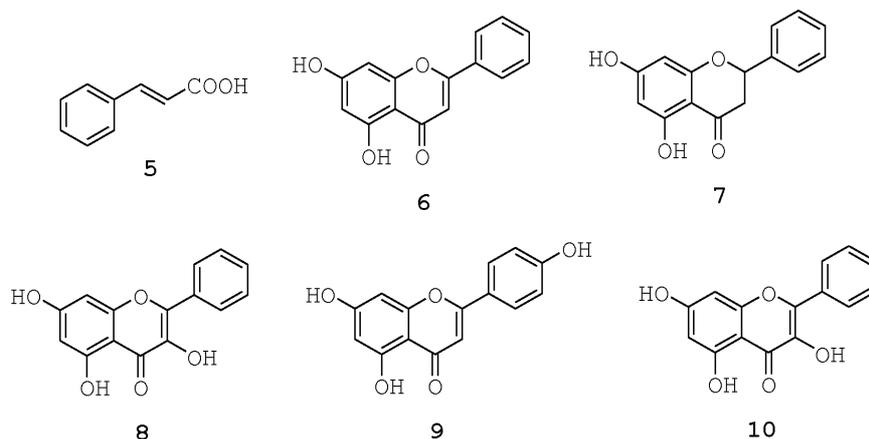
(iv) фармацевтическая композиция, основанная на указанном стандартизованном экстракте прополиса согласно настоящему изобретению, которая оказалась эффективным средством для лечения воспалительных и инфекционных заболеваний. Благодаря широкому спектру фармакологической активности, она может использоваться для лечения различных заболеваний и состояний, таких как: воспалительные заболевания, бактериальные и грибковые инфекции, вирусные заболевания, аутоиммунные заболевания, для регенерации слизистой оболочки, лечения ожогов и ран и раковых заболеваний.

Предыдущий уровень техники

Прополис - это натуральный продукт, собираемый пчелами, служит который для них клеем для закрытия мелких нежелательных отверстий в ульях. Прополис содержит в качестве основного ингредиента пчелиный воск и большое количество различных органических соединений. Многие из них обладают значительными благотворными фармакологическими эффектами; см., например, источник информации 1:

1) С. Кастальдо, Ф. Капассо: прополис и старое лекарство, используемое в современной медицине, Фитотерапия 73 (2002) S1-6.

Помимо упомянутых активных веществ 1-4, прополис содержит целый ряд других природных соединений, например, среди кислот он также содержит транс-коричную кислоту (5) и ряд флавоноидов с относительно большим количеством хризина (6), пиноцембрина (7), галангина (8), апигенина (9) и кемпферола (10):



Традиционно сырой прополис экстрагируют этанолом или смесями этанола и воды, получая так называемые настойки прополиса. Такие жидкие экстракты прополиса характеризуются рядом недостатков:

- (i) наличие относительно агрессивного растворителя (этанола);
- (ii) спиртосодержащие продукты не подходят детям, беременным и кормящим женщинам и некоторым пациентам; и
- (iii) относительно высокое содержание пчелиного воска, что обуславливает его дезагрегация на стадии смешивания с водой во время производства фармацевтических и других продуктов, когда такой экстракт используется в качестве активного ингредиента.

Помимо этанола, в качестве экстракционного растворителя будут использоваться глицерин, вода, смеси глицерина и воды, а также другие органические растворители.

Таким образом, Т. Цукада и соавторы раскрыли использование глицерина в качестве экстракционного растворителя при соотношении прополис: экстракционный растворитель, 1:2 по весу, при температуре 90-160°C с последующей фильтрацией. Такие экстракты глицерина водорастворимы и подходят для производства фармацевтических продуктов в качестве активного фармацевтического ингредиента (API); см. источник информации 2:

2) JPH05957A; Т. Цукада, ЗВ. Камеда, М. Иде: Производство водорастворимого фармацевтического препарата прополиса; Огава Коре К.К., Сантапурон К.К. (Япония).

Водные экстракты прополиса также описаны в предшествующем уровне техники. Экстракцию водой в качестве экстракционного растворителя (ES) можно проводить при температуре 30-50°C в течение 6-8 минут, что после фильтрации дает непосредственно жидкий экстракт прополиса. Последний в конечном итоге может быть дополнительно переработан путем микрокапсулирования с помощью технологии распылительной сушки на подходящих носителях, такие как мальтодекстрин и гуммиарабик, в твердые экстракты; см. источник информации 3:

3) CN103783349A; З. Ван, С. Шао, Х. Ма, С. Ван, Л. Ван, К. Чжан, Х. Ма: Способ для производства микрокапсул для экстракции полифенолов в виде сот с помощью спрея; Университет Цзянсу (Китай).

Использование поверхностно-активных агентов в качестве компонентов экстракционного растворителя (EP), которые включают лецитины, обычно известно из предшествующего уровня техники. Например, Парадкар и его сотрудники описали процесс экстракции прополиса с использованием водного растворителя полисорбата при температуре 40-90°C в течение 2-24 часов с получением жидкого экстракта прополиса; см. источник информации 4:

4) WO 2011092511A1; А. Парадкар, Р. Дхумал, А. Келли, С. Гильда: Прополис и способ его обработки и конечные продукты, полученные из него; Natures Lab Ltd (Великобритания).

Сосновский раскрыл способ экстракции прополиса различными органическими растворителями, включая 1,2-пропиленгликоль, полиэтиленгликоль (PEG) и смеси этих растворителей с водой; см. ссылку на литературу 5:

5) US 4382886; З.М. Сосновский: Метод извлечения прополиса и водорастворимого сухого порошка

прополиса.

Chun и соавторы раскрыли фармацевтическую композицию, которая, среди прочего, основана на жидком экстракте прополиса в 1,3-бутиленгликоле в качестве экстракционного растворителя, который при использовании гидрогенизированного лецитина вместе с другими эмульгаторами превращается в фармацевтическую лекарственную форму, содержащую наночастицы с экстрактом прополиса; см. источник информации 6:

6) KR 20130134800 A; YJ Chun, SB Shim, X. Ke: Состав нанопузырьков, содержащих прополис, и способ его производства; Университет Чхунгун IACF (KR).

Несмотря на то, что в этом документе не используется лецитин для облегчения экстракции активных веществ прополиса с помощью 1,3-бутиленгликоля, безусловно, предлагается возможность его использования в качестве поверхностно-активного вещества, которое в конечном итоге может улучшить экстракцию и эмульгирование некоторых жирных активных ингредиентов прополиса в более полярных растворителях.

Что касается анализа прополиса, в уровне техники существует большое количество аналитических способов для количественного определения активных веществ прополиса в сложных экстрактах прополиса, которые содержат большое количество ингредиентов. В качестве примера аналитический способ, аналогичный используемому в настоящем изобретении, приводится в работе китайских авторов Цуй-Пинга и его сотрудников. Они описали количественный способ определения 12 различных флавоноидов и 8 фенольных прополисовых кислот с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Этот способ, среди прочего, позволяет определять пара-кумаровую кислоту (1), трансферуловую кислоту (2) и кофейную кислоту (3), которые упоминаются как качественные маркеры прополиса; см. источник информации 7:

7) Z. Cui-ping, H. Shuai, W. Wen-ting, P. Shun, S. Xiao-ge, L. Ya-jing, H. Fu-liang: Разработка высокоэффективной жидкостной хроматографии для контроля качества и подлинности китайского прополиса, *J. Food Sci.* 79 (2014) C1315-C1322.

Благодаря содержанию активных веществ 1-10 и других, прополис и прополис-экстракт оказывают ряд очень ценных и полезных фармакологических эффектов на здоровье человека, животных и растений. В предшествующем уровне техники существует большое количество научных и патентных документов, подтверждающих широкий спектр положительных эффектов, среди которых наиболее значительными являются следующие: противовоспалительный эффект; эффект антиоксиданта; иммуномодулирующий эффект; гепатопротекторный эффект; противомикробные эффекты, включая антибактериальные, противовирусные, противогрибковые и противопротозойные; и противоопухолевые; см., например, источники информации 8-12:

8) EL Ghisalberti: Прополис: Обзор, *Bee World* 60 (1979) 59-84;

9) А. Банскота, Ю. Тезука, С. Кадота: недавний прогресс в фармакологических исследованиях прополиса, *Фитотер. Res.* 15 (2001) 561-571;

10) Г. А. Лопух: Обзор биологических свойств и токсичности пчелиного прополиса (прополиса), *FoodChem. Toxicol.* 36 (1998) 347-363;

11) JM Сфорцин: прополис и иммунная система: обзор, *J. Ethnopharmacol.* 113 (2007) 1-14;

12) Ю.В. Добровольский, SB Vohora, K. Sharma, SA Shah, SAN Naqvi, PC Dandiya: Антибактериальные, противогрибковые, антиамебные, противовоспалительные и жаропонижающие исследования продуктов пчеловодства на основе прополиса, *J. Ethnopharmacol.* 35 (1991) 77-82.

Помимо экстрактов прополиса, в предшествующем уровне техники описан целый ряд полезных фармакологических эффектов для некоторых выделенных (чистых) активных веществ прополиса, например:

(i) п-кумаровая кислота (1); см. источники информации 13 и 14;

(ii) транс-феруловая кислота (2); см. источники информации 15 и 16;

(iii) кофейная кислота (3); см. источники информации 17 и 18; а также

(iv) 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4; CAPE); см. источники информации 19 и 20, которые, среди прочего, обладают иммуномодулирующим, противовоспалительным и антимикробным действием:

13) TF Bachiega, CL Orsatti, AC Pagliarone, JM Sforcin: Влияние прополиса и его изолированных соединений на продукцию цитокинов мышинными макрофагами, *Phytother. Res.* 26 (2012) 1308-1313;

14) К. Пей, Дж. Оу, Дж. Хуанг, С. Оу: пара-кумаровая кислота и ее конъюгаты: пищевые источники, фармакокинетические свойства и биологическая активность, *J. Sci. Продовольственное сельское хозяйство.* 96 (2016) 2956-2962;

15) Н. Кумар, В. Прути: Возможные применения феруловой кислоты из природных источников, *Biotechnol. Отчет* 4 (2014) 86-93;

16) К. Ши, Х. Чжан, Ю. Сунь, М. Ян, К. Сун, З. Чжэн, Ю. Чен, Х. Лю, З. Цзя, Р. Донг, Л. Цуй, Х. Ся: антимикробное действие феруловой кислоты против *Stenobacter sakazakii* и возможный механизм действия, *Foodborne Pathog. Дис.* 13 (2016) 196-204;

17) HG Choi, PT Tran, JH Lee, BS Min, JA Kim: Противовоспалительная активность производных

кофейной кислоты, выделенных из корней *Salvia miltiorrhiza* Bunge, Arch. Pharm. Res. (2018) 64-70;

18) В.Н. Лима, С.Д. Оливейра-Тинтино, Э.С. Сантос, Л.П. Мораис, С.Р. Тинтино, Т.С. Фрейтас, Ю.С. Джеральдо, Р.Л. Перейра, Р.П. Круз, И.Р. Менезес, HD Коутиньо: Противомикробные средства и усиление антибиотической активности фенольными соединениями: галловая кислота, кофейновая кислота и пирогаллол, Microb. Патог. 99 (2016) 56-61;

19) К. Френкель, Х. Вэй, Р. Бхимани, Дж. Е, Дж. Задунайский, М.-Т. Хуанг, Т. Ферраро, А.Х. Конней, Д. Грюнбергер: Ингибирование процессов, опосредованных промотором опухоли, в коже мышей и линзах крупного рогатого скота фенолиловым эфиром кофейной кислоты, Cancer Res. 53 (1993) 1255-1261;

20) А. Руссо, Р. Лонго, А. Vanella: Антиоксидантная активность прополиса: роль фенолилового эфира кофейной кислоты и галангина, Fitother. 73 (2002) S21-S29.

Кроме того, активные вещества прополиса представляют собой фунгициды, бактерициды, вирулициды, инсектициды, нематоциды и используются для защиты растений. Благодаря сильной антиоксидантной активности прополис укрепляет растения и повышает их устойчивость к абиотическому стрессу и помогает им бороться с инфекциями, см. источники информации 21-25:

21) СА Гугински-Пива, И. душ Сантуш, А. В. Жуниор, Д. В. Хек, М. Ф. Флорес, К. Пазолини: Прополис для борьбы с мучнистой росой и индукции фитоалексинов в огурцах, IDESIA (Чили) 33 (2015) 39-47;

22) Z. Ararso, G. Legesse: Инсектицидное действие экстракта прополиса медоносных пчел против личинок малой восковой моли, Agric. Биол. J. North Am. (2015) DOI: 10.5251 / abjna.2016.7.6.302.306;

23) Л. Кумар, М. К. Махатма, К. А. Калария, С.К. Биши, А. Манн: Растительные фенолы: важное биологическое оружие против патогенов и насекомых-травоядных, Popular Kheti 2 (2014) 149-152;

24) ЭМ Noweer, MG Dawood: Эффективность экстракта прополиса на растениях фасоли и его роль в борьбе с нематодной инфекцией, Commun. Agric. Прил. Биол. Sci. 74 (2009) 593-603;

25) К. Кульбат: Роль фенольных соединений в устойчивости растений, Biotechnol. Food Sci. 80 (2016) 97-108.

Насколько нам известно, использование специального экстракционного растворителя (ES) на основе жидкого полиэтиленгликоля с низким (0,1-3,5 вес.%) содержанием лецитина в качестве усилителя хемоселективности экстракции прополиса не описывалось в предшествующем уровне техники. Применение таких специфических ES по настоящему изобретению позволяет повысить хемоселективность экстракции сырого прополиса, давая соответствующий жидкий экстракт со значительно повышенным содержанием соответствующих активных веществ 1-4.

Кроме того, использование упомянутого конкретного стандартизованного жидкого экстракта прополиса в качестве активного фармацевтического ингредиента (API) в фармацевтической композиции, согласно настоящему изобретению, обеспечивает неожиданное улучшение ряда различных показаний к его применению, как описано в подробном описании этого изобретения.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение основано на неожиданной эффективности и хемоселективности экстракции сырого прополиса специальным экстракционным растворителем (ES).

Последний состоит из смеси жидкого полиэтиленгликоля (PEG), например PEG 400, и лецитина или гидролизованного лецитина в соотношении 96,5-99,9 : 0,1-3,5 по весу.

Экстракционный растворитель (ES) эффективно и хемоселективно извлекает следующие активные вещества прополиса: п-кумаровая кислота (1), транс-феруловая кислота (2), кофейная кислота (3) и 2-фенэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4); CAPE). Использование подходящего аналитического способа, основанного на высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), позволяет количественно определять активные вещества 1-4, приготовленные первичным экстрактом. Последний подвергают дальнейшей стандартизации путем разбавления тем же ES, который использовался на стадии экстракции, до желаемого содержания активных веществ 1-4 в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, получают жидкий экстракт прополиса с известными и стандартизованными концентрациями основных активных веществ 1-4 согласно настоящему изобретению. Он также используется в качестве активного фармацевтического ингредиента (API), активного косметического ингредиента (ACI), или в качестве пищевого ингредиента для производства функциональных продуктов питания и пищевых добавок.

Композиция по настоящему изобретению на основе указанного жидкого экстракта прополиса, который содержит основные активные вещества п-кумаровую кислоту (10-1300 мкг/мл), трансферуловую кислоту (10-800 мкг/мл), кофейную кислоту (5-300 мкг /мл) и 2-фенэтил-3,4-дигидрокси-трансциннамат (5-400 мкг/мл) является эффективным средством в терапии воспалительных заболеваний, бактериальных инфекций, грибковых инфекций, вирусных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, функциональных желудочно-кишечных расстройств, для регенерации слизистой оболочки, лечения ожогов и ран, а также при лечении онкологических заболеваний.

Описание чертежей

Фиг. 1 показывает типичную хроматограмму HPLC основных ингредиентов прополиса 1-4 и сопутствующих ингредиентов 5-10.

Фиг. 2.1-2.4 показаны результаты измерения количественного состава активных веществ 1-4 в жид-

ких экстрактах прополиса, полученных экстракцией этанолом (96%) и смесями этанола с различными видами и концентрациями лецитинов.

Фиг. 2.5-2.10 показаны результаты измерения количественного состава сопутствующих веществ 5-10 в жидких экстрактах прополиса, полученных экстракцией этанолом (96%) и смесями этанола с различными видами и концентрациями лецитинов.

Фиг. 3.1-3.4 показаны результаты измерения количественного состава активных веществ 1-4 в жидких экстрактах прополиса, полученных экстракцией полиэтиленгликолем 400 и смесями полиэтиленгликоля 400 с различными видами и концентрациями лецитинов.

Фиг. 3.5-3.10 показаны результаты измерения количественного состава сопутствующих веществ 5-10 в жидких экстрактах прополиса, полученных экстракцией полиэтиленгликолем 400 и смесями полиэтиленгликоля 400 с различными видами и концентрациями лецитинов.

Фиг. 4 показывает блок-схему способа производства стандартизированного жидкого экстракта прополиса согласно настоящему изобретению.

Фиг. 5 показывает типичную хроматограмму HPLC количественного анализа фармацевтического состава по настоящему изобретению, продукта из примера 11.

Сокращения.

ES - экстракционный растворитель.

SL - соевый лецитин (Глицин макс. Л.).

RL - рапсовый лецитин (*Brassica napus* Л.).

HRL - гидролизованный соевый лецитин.

SUL - обезжиренный лецитин подсолнечника.

EtOH - 96% этанол.

PEG - полиэтиленгликоль.

HPLC - высокоэффективная жидкостная хроматография.

GC - газовая хроматография.

TLC - тонкослойная хроматография.

MIC - минимальная ингибирующая концентрация.

RPMI - среда для культур клеток и тканей.

TTC - 2,3,5-трифенил-2Н-тетразолий хлорид, окислительно-восстановительный индикатор.

PBS - фосфатный буфер в физиологическом растворе.

КОЕ - колониеобразующие единицы; количество живых микроорганизмов, способных образовывать колонии. ХТТ - Натриевая соль ХТТ; 2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид внутренняя соль, окислительно-восстановительный индикатор.

MRSA - Метициллин-резистентный золотистый стафилококк. MSSA - Метициллин-чувствительный золотистый стафилококк. CLSI - Институт клинических и лабораторных стандартов.

EUCAST - Европейский комитет по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам.

API - активный фармацевтический ингредиент/вещество.

DER - лекарственное средство: экстракт, весовое соотношение; мера силы экстрактов, выраженная массовым соотношением исходного лекарственного средства и конечного экстракта.

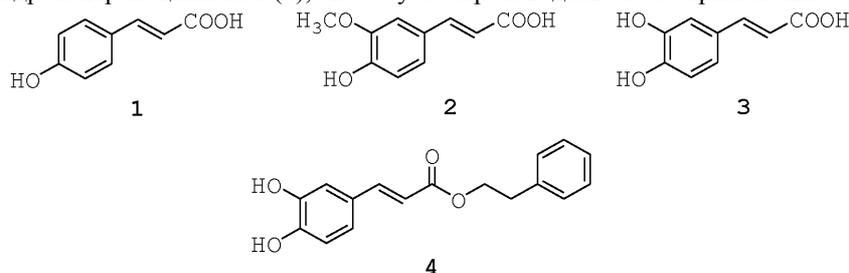
SCC - количество соматических клеток, i.mam. - интрамаммарное применение.

ATCC - Американская коллекция типовых культур; некоммерческая организация, которая собирает, хранит и распространяет стандартные эталонные микроорганизмы.

ЦНС - коагулазонегативные стафилококки.

Подробное описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к новому жидкому экстракту прополиса, стандартизованному по содержанию основных активных веществ, выбранных из группы, состоящей из: п-кумаровой кислоты (1), трансферуловой кислоты (2), кофейной кислоты (3) и 2-фенилэтиловый эфир кофейной кислоты, 2-фенетил-3,4-дигидрокситрансциннамат (4), способу его производства и его применению.



Жидкий экстракт прополиса, применяемый в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента, согласно настоящему изобретению, содержит:

(А) сухой экстракт прополиса: 0,1-10,0 вес.%; и

(В) экстракционный растворитель: 90,0-99,9 вес.%; где экстракционный растворитель содержит:

(В.1) один или несколько жидких полиэтиленгликолей (PEG) 200-600: 96,5-99,9 вес.%; и

(В.2) лецитин или гидролизованный лецитин: 0,1-3,5 вес.%; где указанный жидкий экстракт прополиса стандартизирован по:

(I) количественному массовому соотношению сырого прополиса, применяемому в качестве лекарственного средства и конечного экстракта (DER) в соотношении: 1:2 - 1:20 по весу; и

(II) количественному содержанию активных веществ, выбранных из группы, состоящей из: п-кумаровой кислоты (1), транс-феруловой кислоты (2), кофейной кислоты (3) и 2-фенилэтил-3,4-дигидроксициннамата (4), где количественный состав, минимум двух из четырех указанных основных активных веществ, следующий:

(I) п-кумаровая кислота (1): 100-1300 мкг/мл;

(ii) транс-феруловая кислота (2): 75-800 мкг/мл; (iii) кофейная кислота (3): 25-300 мкг/мл; и

(iv) 2-фенилэтил 3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4; CAPE): 40-400 мкг/мл.

В предпочтительном варианте осуществления этого изобретения жидкий полиэтиленгликоль (PEG), применяемый в качестве компонента экстракционного растворителя (ES) выбран из группы, состоящей из: полиэтиленгликоля 200, полиэтиленгликоля 300, полиэтиленгликоля 400, полиэтиленгликоля 600 или смеси этих веществ.

В частности, жидкий полиэтиленгликоль (PEG), применяемый в качестве компонента экстракционного растворителя (ES) выбирается из группы, состоящей из: полиэтиленгликоля 200, полиэтиленгликоля 400 или смесей этих веществ.

Кроме того, лецитин или гидролизованный лецитин выбран из группы, состоящей из продуктов, характеризующихся коэффициентом гидрофильно-липофильного баланса (HLB) от 2 до 12, и выбран из группы, состоящей из: лецитина сои (SL; из *Glycine max. L.*); лецитина подсолнечника (SUL; из *Helianthus annuus L.*); рапсового лецитина (RL; из *Brassica napus L.*); лецитина канолы (*Brassica rapa L.*); лецитина из куриных яиц (*Gallus gallus domesticus L.*); обезжиренных продуктов указанных лецитинов; гидрированных лецитинов из указанных источников; гидролизованных лецитинов из указанных источников; модифицированных ферментами производных указанных лецитинов; или смеси этих веществ.

В частности, в качестве лецитина в настоящем изобретении используется природный лецитин, обезжиренный, гидрогенизированный, гидролизованный или ферментно-модифицированный лецитин из сои (*Glycine max. L.*), подсолнечника (*Helianthus annuus L.*), семян рапса (*Brassica napus L.*) или канолы (*Brassica rapa L.*); или могут использоваться смеси этих веществ.

Термин "ферментно-модифицированный лецитин" включает гидролизованный лецитин, полученный ферментативно-катализируемым гидролизом одного фрагмента высшей жирной кислоты с образованием моноэфира глицерина и высших жирных кислот с оставшимися фосфатными и холиновыми группами в молекуле. Это приводит к значительному увеличению фактора HLB такого гидролизованного лецитина.

Предпочтительно в качестве экстракционного растворителя (ES) для производства жидкого экстракта прополиса, согласно настоящему изобретению, используется смесь, содержащая:

(I) полиэтиленгликоль (PEG) 200, полиэтиленгликоль 300, полиэтиленгликоль 400 или их смеси: 97-99 вес.%; и (ii) природный лецитин, обезжиренный лецитин или гидролизованный лецитин из сои (*Glycine max. L.*), подсолнечника (*Helianthus annuus L.*), рапса (*Brassica napus L.*) или канолы (*Brassica rapa L.*): 1-3 вес.%; или могут быть использованы смеси этих веществ.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения жидкий экстракт прополиса, согласно настоящему изобретению, стандартизирован по:

(I) количественному массовому соотношению сырого прополиса, применяемый в качестве лекарственного средства к конечному экстракту (DER) в соотношении: 1:3-1:5 по весу; и

(II) количественному составу активных веществ, выбранных из группы, состоящей из: п-кумаровой кислоты (1), транс-феруловой кислоты (2), кофейной кислоты (3) и 2-фенилэтил-3,4-дигидроксициннамата (4), где количественный состав, минимум двух из четырех указанных основных активных веществ, следующий:

(i) п-кумаровая кислота (1): 500-1300 мкг/мл;

(ii) транс-феруловая кислота (2): 300-800 мкг/мл;

(iii) кофейная кислота (3): 100-300 мкг/мл; и

(iv) 2-фенилэтил 3,4-дигидрокси-циннамат (4; CAPE): 100-400 мкг/мл.

Аналитика активных веществ прополиса в жидких экстрактах

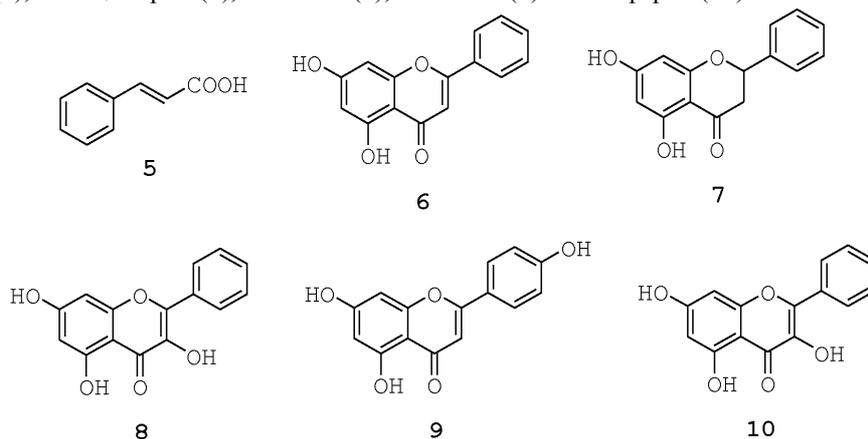
Для разработки нового стандартизованного жидкого экстракта прополиса, согласно настоящему изобретению, необходимо разработать подходящий аналитический способ количественного определения следующих веществ:

(i) основные активные вещества прополиса, выбранные из группы, состоящей из:

п-кумаровая кислота (1), транс-феруловая кислота (2), кофейная кислота (3) и 2-фенилэтил-3,4-дигидроксициннамат (4); и

(ii) сопутствующие активные вещества, выбранные из группы, состоящей из: транскоричная кисло-

та (5), хризин (6), пиноцембрин (7), галангин (8), апигенин (9) и кемпферол (10).



Для первоначального изучения указанного аналитического способа необходимо было приготовить модельные жидкие экстракты прополиса. Использовали модельные экстракты прополиса в этаноле (96%) и полиэтиленгликоле. Их получали стандартным способом экстракции путем мацерации при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем нерастворенный остаток отделяли фильтрованием, и прозрачный фильтрат использовали в качестве модельного жидкого экстракта прополиса для дальнейшего изучения. В качестве модельного жидкого полиэтиленгликоля использовался полиэтиленгликоль 400 (PEG 400). Процедуры производства модельных жидких экстрактов прополиса в классических экстракционных растворителях, этаноле (96%) и полиэтиленгликоле 400, описаны в примере 1 (96% этанол) и примере 2 (PEG 400).

Был разработан подходящий аналитический способ, основанный на высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), с помощью которого было достигнуто успешное разделение всех 10 указанных соединений 1-10. Способ подробно описан в примере 3.

Типичная хроматограмма HPLC, полученная данным аналитическим способом, показана на фиг. 1. Время удерживания (tR) соединений 1-10 представлено в табл. 1.

Таблица 1
Время удерживания активных веществ прополиса 1-10, согласно способу HPLC, настоящего изобретения

№	Действующее вещество прополиса	Время удерживания (tR) [мин]
1	п-кумаровая кислота (1)	14,13
2	транс-феруловая кислота (2)	15,31
3	кофейная кислота (3)	10,57
4	2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4)	48,62
5	транс-коричная кислота (5)	29,76
6	хризин (6)	44,68
7	пиноцембрин (7)	47,39
8	галангин (8)	49,94
9	апигенин (9)	37,72
10	кемпферол (10)	36,87

^a Хроматографическая колонка: Ascentis express; C18; размеры: 15 см×3,0 мм; диаметр частиц в колонке: 2,7 мкм; подвижная фаза: А = 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, В = метанол; градиент: 0 мин, 80% А, 20% В; 3 мин, 70% А, 30% В; 60 мин, 20% А, 80% В; 90 мин, 20% А, 80% В; 100 мин, 70% А, 30% В; 105 мин, 80% А, 20% В; температура колонки: 30°C; поток: 0,25 мл / мин; время анализа: 110 мин; длина волны на детекторе UV-VIS: для обнаружения: 370 нм, для интегрирования 290 нм; объем закачки: 10 мкл; давление: 210-290 бар

Изучение влияния лецитина на эффективность экстракции активных веществ прополиса 1-4.

В продолжение этого исследования, влияние различных экстракционных растворителей (ES) с содержанием различных видов (SL, RL, HRL) и концентраций (1-30 весовых) лецитинов на эффективность экстракции активных веществ прополиса 1-4 были изучены, см. табл. 2.

Таблица 2

Системы экстракционных растворителей (ES) испытаны для экстракции активных веществ 1-4 прополиса

№	Растворитель	Лецитин	Соотношение веса растворитель: лецитин (по весу)	Эксперимент
1	EtOH	-	-	Пример 1
2	EtOH	SL	97: 3	Пример 4, E1
3	EtOH	SL	90: 10	Пример 4, E2
4	EtOH	SL	80: 20	Пример 4, E3
5	EtOH	SL	70: 30	Пример 4, E4
6	EtOH	RL	98,9: 1,1	Пример 4, E5
7	EtOH	RL	96: 4	Пример 4, E6
8	EtOH	HRL	97,8: 2,2	Пример 4, E7
9	EtOH	HRL	92,3: 7,7	Пример 4, E8
10	PEG 400	-	-	Пример 2
11	PEG 400	SR	97: 3	Пример 5, E1
12	PEG 400	SR	90: 10	Пример 5, E2
13	PEG 400	RL	98,9: 1,1	Пример 5, E3
14	PEG 400	RL	96: 4	Пример 5, E4
15	PEG 400	HRL	97,8: 2,2	Пример 5, E5
16	PEG 400	HRL	92,3: 7,7	Пример 5, E6

EtOH = 96% этанол; PEG 400 = полиэтиленгликоль 400; SL = соевый лецитин; RL = рапсовый лецитин; HRL = гидролизованный лецитин рапсового масла.

Приготовленные, таким образом, жидкие экстракты прополиса подвергали количественному анализу на содержание основных активных веществ 1-4 и сопровождаемых активных веществ 5-10. Результаты представлены в табл. 3-6.

В случае использования экстракционного растворителя (ES) на основе 96% этанола (EtOH) и смесей EtOH и различных видов (SL, RL, HRL) и концентраций (1-30 вес.% в составе композиции ES), первичные жидкие экстракты прополиса содержат п-кумаровую кислоту (1; приблизительно 800-1250 мкг/мл), транс-феруловую кислоту (2; приблизительно 485-770 мкг/мл), кофейную кислоту (3; приблизительно 185-290 мкг/мл) и 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4; CAPE; приблизительно 215-320 мкг/мл), применяемый в качестве доминирующих активных ингредиентов, см. табл. 3.

Таблица 3

Количественный состав активных веществ 1-4 в жидких экстрактах прополиса, полученных с помощью экстракционных растворителей (ES) на основе этанола

ES	<i>n</i> -кумаровая кислота (1) γ [мкг / мл] (Фигура 2.1)	<i>транс</i> -феруловая кислота (2) γ [мкг / мл] (Фигура 2.2)	кофеиновая кислота (3) γ [мкг / мл] (Фигура 2.3)	2-фенэтил- - 3,4- дигидрокси -транс- циннамат (4) γ [мкг / мл] (Фигура 2.4)
1	916,32	559,26	209,49	236,68
2	820,35	501,87	186,22	216,63
3	872,51	533,16	204,30	232,98
4	1116,27	679,58	251,24	289,45
5	1248,16	770,88	288,66	320,75
6	808,30	485,32	185,58	231,19
7	981,25	596,21	225,33	266,46
8	861,11	516,41	196,96	248,14
9	945,73	582,69	228,69	263,48
<u>Экстракционный растворитель (ES)</u>				
1 - EtOH			6 - EtOH + 1,1% RL	
2 - EtOH + 3% SL			7 - EtOH + 4% RL	
3 - EtOH + 10% SL			8 - EtOH + 2,2% HRL	
4 - EtOH + 20% SL			9 - EtOH + 7,7% HRL	
5 - EtOH + 30% SL				
ES = экстракционный растворитель; EtOH = 96% этанол; SL = соевый лецитин; RL = рапсовый лецитин; HRL = гидролизованый лецитин рапсового масла.				

При этом концентрации вспомогательных активных веществ 5-10 были на следующем уровне: транс-коричная кислота (примерно 40-65 мкг/мл), хризин (примерно 500-690 мкг/мл), пиноцембрин (примерно 440-670 мкг/мл), галангин (примерно 210-300 мкг/мл), апигенин (примерно 90-150 мкг/мл) и кемпферол (примерно 45-90 мкг/мл), см. табл. 4.

В случае использования экстракционного растворителя (ES) на основе полиэтиленгликоля (PEG 400) и смесей PEG 400 и различных видов (SL, RL, HRL) и концентраций (1-10 вес.% в составе ES) из лецитинов первичные жидкие экстракты также содержат *n*-кумаровую кислоту (примерно 750-1300 мкг/мл), транс-феруловую кислоту (примерно 400-800 мкг/мл), кофейную кислоту (примерно 140-300 мкг/мл) и 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (CAPE; приблизительно 190-370 мкг/мл), см. табл. 5.

Таблица 4

Количественный состав сопутствующих активных веществ 5-10 в жидких экстрактах прополиса, полученных с помощью экстракционных растворителей на основе этанола

ES	<i>транс-</i> коричная кислота (5)	хризин (6)	пиноцембрин (7)	галангин (8)	апигенин (9)	кемпферол (10)
	γ[мкг / мл]	γ[мкг / мл]	γ[мкг / мл]	γ[мкг / мл]	γ[мкг / мл]	γ[мкг / мл]
1	48,88	521,03	496,38	232,36	103,38	54,00
2	43,06	463,66	444,22	208,74	93,41	47,72
3	46,60	499,97	479,67	224,56	100,84	74,08
4	58,37	623,32	594,05	267,18	127,17	62,16
5	65,92	685,81	665,44	297,85	146,91	71,11
6	40,53	500,50	477,17	226,86	96,11	79,10
7	51,21	576,39	552,12	263,99	115,45	87,40
8	43,15	534,08	510,26	245,27	102,79	85,78
9	51,21	557,42	535,33	256,51	111,98	88,93
Экстракционный растворитель (ES)						
1 - EtOH				6 - EtOH + 1,1% RL		
2 - EtOH + 3% SL				7 - EtOH + 4% RL		
3 - EtOH + 10% SL				8 - EtOH + 2,2% HRL		
4 - EtOH + 20% SL				9 - EtOH + 7,7% HRL		
5 - EtOH + 30% SL						
ES = экстракционный растворитель; EtOH = 96% этанол; SL = соевый лецитин; RL = рапсовый лецитин; HRL = гидролизованый лецитин рапсового масла.						

Таблица 5

Количественный состав активных веществ 1-4 в жидких экстрактах прополиса, полученных с использованием экстракционных растворителей (ES), на основе полиэтиленгликоля 400

EO	<i>n</i> -кумаровая кислота (1)	<i>транс</i> - феруловая кислота (2)	кофеиновая кислота (3)	2-фенилэтил-3,4- дигидрокси- транс-циннамат (4)
	γ[мкг / мл] (Фигура 3.1)	γ[мкг / мл] (Фигура 3.2)	γ[мкг / мл] (Фигура 3.3)	γ[мкг / мл] (Фигура 3.4)
1	750,57	458,93	167,79	226,14
2	1112,08	685,14	249,67	329,41
3	781,98	485,75	171,88	223,99
4	1215,61	745,35	274,49	366,41
5	659,80	405,60	146,30	194,79
6	1294,35	792,50	292,18	392,23
7	806,44	495,64	182,80	236,48
Экстракционный растворитель (ES)				
1 - PEG 400			5 - PEG 400 + 4% от нормы	
2 - PEG 400 + 3% SL			6 - PEG 400 + 2,2% HRL	
3 - PEG 400 + 10% SL			7 - PEG 400 + 7,7% HRL	
4 - PEG 400 + 1,1% RL				
ES = экстракционный растворитель; PEG 400 = полиэтиленгликоль 400; SL = соевый лецитин; RL = рапсовый лецитин; HRL = гидролизованый лецитин рапсового масла.				

В этом случае концентрация вспомогательных активных веществ 5-10 была на уровне: *транс*-коричная кислота - примерно 30-70 мкг/мл, хризин - примерно 400-830 мкг/мл, пиноцембрин - примерно 390-800 мкг/мл, галангин - примерно 190-360 мкг/мл, апигенин - примерно 80-170 мкг/мл) и кемпферол - примерно 40-140 мкг/мл, см. табл. 6.

Таблица 6
Количественный состав сопутствующих активных веществ 5-10 в жидких экстрактах прополиса, полученных с использованием экстракционных растворителей (ES), на основе полиэтиленгликоля 400

ES	<i>транс-коричная кислота</i> (5)	хризин (6)	пиноцембрин (7)	галангин (8)	апигенин (9)	кемпферол (10)
	γ [мкг / мл]	γ [мкг / мл]	γ [мкг / мл]	γ [мкг / мл]	γ [мкг / мл]	γ [мкг / мл]
1	38,40	476,77	457,71	208,31	97,03	80,18
2	57,81	681,36	649,38	293,11	145,59	68,23
3	39,28	456,61	437,36	196,76	103,89	43,00
4	62,14	772,55	736,93	329,80	157,13	130,60
5	32,92	412,97	391,23	172,80	84,25	44,46
6	66,58	824,77	794,67	354,62	171,29	138,94
7	40,75	499,97	473,43	210,09	103,22	54,16
Экстракционный растворитель (ES)						
1 - PEG 400			5 - PEG 400 + 4% от нормы			
2 - PEG 400 + 3% SL			6 - PEG 400 + 2,2% HRL			
3 - PEG 400 + 10% SL			7 - PEG 400 + 7,7% HRL			
4 - PEG 400 + 1,1% RL						
ES = экстракционный растворитель; PEG 400 = полиэтиленгликоль 400; SL = соевый лецитин; RL = рапсовый лецитин; HRL = гидролизованный лецитин рапсового масла.						

Как видно из результатов, все протестированные лецитины (SL, RL, HRL) в сочетании с любым чистым растворителем, 96% этанолом или полиэтиленгликолем 400 (PEG 400), при использовании в более низких концентрациях, от 1-3 вес.%, входящих в состав экстракционного растворителя (ES), вносят значительный вклад в повышение хемоселективности экстракции активных веществ 1-4 по сравнению с чистыми растворителями.

Неожиданный эффект комбинации PEG 400 и лецитина (SL, RL, HRL) проявляется в том факте, что, хотя PEG 400 как чистый растворитель, экстрагирует активные вещества 1-4 значительно слабее, чем 96% этанол (табл. 3; строка 1, столбец 2), при использовании в комбинации с лецитинами (SL, RL, HRL) в концентрации от 1 до 3 вес.% он экстрагирует соединения 1-4 значительно более эффективно по сравнению с аналогичными комбинациями 96% этанола с теми же лецитинами. Например, хотя достигнутая концентрация п-кумаровой кислоты (1) в экстракте, полученном с использованием 100% PEG 400, применяемым в качестве экстракционного растворителя, находилась в диапазоне 750 мкг/мл (табл. 5; строка 1, столбец 2) и с 96% EtOH как ES в диапазоне 916 мкг/мл (табл. 3; строка 1, столбец 2), использование 3% SL в PEG 400 привело к концентрации 1112,08 мкг/мл (табл. 5; строка 2, столбец 2), в случае использования ES на основе 96% этанола с 3 процентам весовым SL.

Из этого типичного примера отчетливо виден совершенно неожиданный эффект комбинации полиэтиленгликоля и лецитина в концентрации от 1 до 3 процентов по весу в растворителе для экстракции (ES). Это может быть экстраполировано специалистом в данной области до приемлемого диапазона оптимального массового процентного содержания лецитина от 0,1-3,5 процентов по весу в составе ES-композиции.

При использовании более высоких вес.% лецитина в композиции экстракционного растворителя (ES) полезное влияние лецитина на хемоселективность экстракции прополиса теряется по сравнению с аналогичными системами на основе этанола. Например, при использовании лецитинов в концентрациях от 4% RL, 7,7% HRL или 10% SL в ES были зарегистрированы более низкие концентрации основных активных веществ 1-4 по сравнению с использованием аналогичных систем ES на основе этанола. Типичные результаты показаны в табл. 7 и 8 для двух наиболее распространенных активных веществ: п-кумаровой кислоты (1) и трансферуловой кислоты (2).

Таблица 7

Количественный состав п-кумаровой кислоты (1) в жидких экстрактах прополиса, полученных с использованием различных экстракционных растворителей, согласно настоящему изобретению

ES	<i>m</i> -кумаровая кислота (1) γ[мкг / мл]	Процентное изменение в системе PEG 400 ES по сравнению с ES на основе EtOH (%) а	Процентное изменение в системе EtOH ES по сравнению с ES на основе PEG 400 (%) б
1	916,32	-	+22,1
2	750,57	-18,1	-
3	820,35	-	-26,2
4	1112,08	+35,6	-
5	872,51	-	+11,6
6	781,98	-10,4	-
7	808,30	-	-33,5
8	1215,61	+50,4	-
9	981,25	-	+48,7
10	659,80	-32,8	-
11	861,11	-	-33,5
12	1294,35	+50,3	-
13	945,73	-	+17,3
14	806,44	-14,7	-
Экстракционный растворитель (ES)			
1 - EtOH		8 - PEG 400 + 1,1% РЛ	
2 - PEG 400		9 - EtOH + 4% RL	
3 - EtOH + 3% SL		10 - PEG 400 + 4% от нормы	
4 - PEG 400 + 3% SL		11 - EtOH + 2,2% HRL	
5 - EtOH + 10% SL		12 - PEG 400 + 2,2% HRL	
6 - PEG 400 + 10% SL		13 - EtOH + 7,7% HRL	
7 - EtOH + 1,1% RL		14 - PEG 400 + 7,7% HRL	
ES = экстракционный растворитель; EtOH = 96% этанол; PEG 400 = полиэтиленгликоль 400; SL = соевый лецитин; RL = рапсовый лецитин; HRL = гидролизованный лецитин рапсового масла.			
а Увеличение или уменьшение процента (%) концентрации п-кумаровой кислоты (1) в экстракте, полученном с ES на основе PEG 400, по сравнению с аналогичными ES на основе этанола.			
б Увеличение или уменьшение процента (%) концентрации п-кумаровой кислоты (1) в экстракте, полученном с ES на основе этанола, по сравнению с аналогичным ES на основе PEG 400.			

В табл. 7 можно увидеть типичный неожиданный результат настоящего изобретения в строке 8, столбец 3, где наблюдалось увеличение концентрации п-кумаровой кислоты (1) на 50%, когда экстракционный растворитель (ES), PEG 400 + RL (98,9: 1,1 по весу) по сравнению с аналогичным ES на основе EtOH (EtOH + RL = 98,9: 1,1 по весу).

Таблица 8

Количественный состав транс-феруловой кислоты (2) в жидких экстрактах прополиса, полученных с использованием различных экстракционных растворителей согласно настоящему изобретению

ES	<i>транс</i> -феруловая кислота (2) γ[мкг / мл]	Процентное изменение в системе PEG 400 ES по сравнению с ES на основе EtOH (%) а	Процентное изменение в системе EtOH ES по сравнению с ES на основе PEG 400 (%) b
1	559,26	-	+21,9
2	458,93	-17,9	-
3	501,87	-	-26,7
4	685,14	+36,5	-
5	533,16	-	+9,8
6	485,75	-10,4	-
7	485,32	-	-33,5
8	745,35	+50,4	-
9	596,21	-	-19,3
10	405,60	+23,9	-
11	516,41	-	-34,8
12	792,50	+53,5	-
13	582,69	-	+17,6
14	495,64	-14,9	-
Экстракционный растворитель (ES)			
1 - EtOH		8 - PEG 400 + 1,1% РЛ	
2 - PEG 400		9 - EtOH + 4% RL	
3 - EtOH + 3% SL		10 - PEG 400 + 4% от нормы	
4 - PEG 400 + 3% SL		11 - EtOH + 2,2% HRL	
5 - EtOH + 10% SL		12 - PEG 400 + 2,2% HRL	
6 - PEG 400 + 10% SL		13 - EtOH + 7,7% HRL	
7 - EtOH + 1,1% RL		14 - PEG 400 + 7,7% HRL	
ES = экстракционный растворитель; EtOH = 96% этанол; PEG 400 = полиэтиленгликоль 400; SL = соевый лецитин; RL = рапсовый лецитин; HRL = гидролизованный лецитин рапсового масла.			
а Увеличение или уменьшение процента (%) концентрации транс-феруловой кислоты (2) в экстракте, полученном с ES на основе PEG 400, по сравнению с аналогичным ES на основе этанола.			
б Увеличение или уменьшение процента (%) концентрации транс-феруловой кислоты (2) в экстракте, полученном с ES на основе этанола, по сравнению с аналогичным ES на основе PEG 400.			

В качестве еще одного типичного примера неожиданного результата здесь представлены данные в таблице 8, строка 12, столбец 3, где было зарегистрировано 53,5% увеличение концентрации транс-феруловой кислоты (2), когда использовали экстракционный растворитель (ES) PEG 400 и URL (97,8: 2,2 по весу), по сравнению с аналогичным ES на основе 96% этанола.

Способ производства стандартизированного жидкого экстракта прополиса согласно настоящему изобретению.

Способ производства жидкого экстракта прополиса согласно изобретению, включает следующие этапы:

- (i) охлаждение сырого прополиса до температуры -20° С минимум на 1 ч;
- (ii) помол охлажденного прополиса с просеиванием через поры 1-8 мм;
- (iii) экстракция сырого прополиса экстракционным растворителем при следующих условиях:
 - (a) массовое соотношение сырого прополиса и экстракционного растворителя равно 1:2-1:20 по весу;
 - (b) температура экстракции от 10 до 150°С; и
 - (c) время экстракции от 5 мин до 72 ч;
- (iv) фильтрация полученной смеси через серию фильтров с порами от 100 мкм до 5 мкм, с образованием нерастворенного остатка и жидкого экстракта прополиса;
- (v) количественный анализ основных активных веществ прополиса 1-4 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC); и
- (vi) стандартизация полученного жидкого экстракта прополиса с определением точного количест-

венного состава основных действующих веществ 1-4 на стадии (v) путем разбавления свежим экстракционным растворителем, который использовался на стадии (iii), до желаемого содержания активных веществ 1-4.

В предпочтительном варианте реализации способа производства жидкого экстракта прополиса, согласно изобретению, стадия экстракции (iii) выполняется при следующих условиях:

- (a) массовое соотношение сырого прополиса и экстракционного растворителя равно 1:3-1:5 по весу;
- (b) температура отжима: 15-70°C; и
- (c) время экстракции: 1-24 ч.

Кроме этого, этап количественного определения основных активных веществ 1-4 и для сопровождаемого мониторинга вспомогательных активных веществ 5-10, разработанный для этой цели аналитический высокоэффективный способ жидкостной хроматографии (HPLC), выполняется при следующих условиях:

- (i) хроматографическая колонка: Ascentis express; C18; размеры: 15 см×3,0 мм; диаметр частиц в колонке: 2,7 мкм;
- (ii) подвижная фаза: А=0,1% водный раствор муравьиной кислоты, В = метанол; градиент: 0 мин, 80% А, 20% В; 3 мин, 70% А, 30% В; 60 мин, 20% А, 80% В; 90 мин, 20% А, 80% В; 100 мин, 70% А, 30% В; 105 мин, 80% А, 20% В;
- (iii) температура колонки: 30°C;
- (iv) поток: 0,25 мл /мин;
- (v) время анализа: 110 мин;
- (vi) длина волны на детекторе UV-VIS: для обнаружения: 370 нм, для интеграции: 290 нм;
- (vii) объем закачки: 10 мкл; (viii) давление: 210-290 бар.

Экспериментальные способы производства жидкого экстракта прополиса, согласно настоящему изобретению, раскрыты в примерах 4-9. В примере 9 описана оптимизированная версия способа производства стандартизованного жидкого экстракта прополиса, выраженного параметром отношения лекарственного средства к экстракту (DER) 1:2 по весу, в соответствии с изобретением.

Аналитический способ количественного определения основных активных веществ 1-4 и вспомогательных активных веществ 5-10 описан в примере 3.

Определение противомикробной эффективности стандартизованного жидкого экстракта согласно настоящему изобретению.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) на модельных патогенных микроорганизмах.

Противомикробная эффективность экстрактов прополиса была измерена в отделении молекулярной медицины Института Руджера Босковича, Загреб, Хорватия. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) стандартизованного жидкого экстракта прополиса, согласно настоящему изобретению, определяли по указанию CLSI (Институт клинических и лабораторных стандартов) и EUCAST (Европейский комитет по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам), как описано в источниках информации 26-29. Использовали продукт из примера 9.

26) M. Balouiri, M. Sadiki, SK Ibsouda: Способы оценки антимикробной активности *in vitro*: обзор, J. Pharm. Анальный. 6 (2016) 71-79.

27) CLSI, Способы испытаний на чувствительность к противомикробным препаратам при разведении бактерий, которые растут в аэробных условиях, Утвержденный стандарт, 9-е изд., Документ CLSIM07-A9. Институт клинических и лабораторных стандартов, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

28) CLSI, Эталонный эталонный способ тестирования дрожжей на противогрибковую чувствительность при разведении бульона, Утвержденный стандарт, 2-е изд., Документ NCCLS M27-A2. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Уэйн, Пенсильвания, 19087-1898, США, 2002.

29) CLSI, Способы определения бактерицидной активности противомикробных агентов. Утвержденное руководство, документ CLSI M26-A. Институт клинических и лабораторных стандартов, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 1998.

Противомикробная эффективность была протестирована в условиях *in vitro* на штаммах ATCC следующих модельных патогенных микроорганизмов (M):

- (i) золотистый стафилококк ATCC 29293 (M1);
- (ii) метициллин-резистентный золотистый стафилококк; MRSA (коллекция MFBF; M2);
- (iii) метициллин-чувствительный золотистый стафилококк; MSSA (коллекция MFBF; M3);
- (iv) *Enterococcus faecalis* ATCC 9212 (M4);
- (v) *Enterococcus faecalis* VRE (коллекция MFBF) (M5);
- (vi) кишечная палочка ATCC 10536 (M6);
- (vii) *Acinetobacter baumannii* ATCC 43498 (M7);
- (viii) синегнойная палочка ATCC 9027 (M8); и
- (ix) грибковые микроорганизмы албиканс ATCC 90028 (M9).

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) экстрактов была проведена

процедура последовательного микроразбавления. Значения МИС определили как концентрацию экстракта прополиса, при которой происходило 80%-ное снижение количества бактерий или грибов (МИС80). Минимальные ингибирующие концентрации (МИС80), показанные в табл. 9, показаны в виде раствора (%) соответствующего жидкого экстракта в данном растворителе. Исходный жидкий экстракт прополиса получали при соотношении сырого прополиса и конечного экстракта (DER) 1:2 -продукт из примера 9. Если разбавление жидкого экстракта больше, что означает, что концентрация активных веществ 1-10 ниже для МИС, полученный антимикробный эффект тестируемого экстракта выше.

Подробное описание экспериментальной процедуры определения МИС приведено в примере 10, а результаты приведены в табл. 9.

Таблица 9

Результаты определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС; %) разбавленных экстрактов прополиса, продукта из примера 9, по сравнению с жидкими экстрактами, полученными с 96% этанолом (пример 1) или полиэтиленгликолем 400 (пример 2), применяемым в качестве экстракционных растворителей.

№	Модельный микроорганизм	МИС ₈₀ (%) ^a		
		Жидкий экстракт на основе ES1 ^b	Жидкий экстракт на основе ES2 ^c	Жидкий экстракт на основе ES3 ^d
1	<i>Золотистый стафилококк</i> ATCC 29293 (M1)	40	10	40
2	MRSA (M2)	20	10	40
3	MSSA (M3)	52,5	10	51,5
4	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 9212 (M4)	10	5	10
5	<i>Enterococcus faecalis</i> VRE (M5)	0	0	2,5
6	<i>кишечная палочка</i> ATCC 10536 (M6)	10	10,85	12,8
7	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 43498 (M7)	20	10	20
8	<i>Синегнойная палочка</i> ATCC 9027 (M8)	0	0	1,85
9	<i>грибковые микроорганизмы албиканс</i> ATCC 90028 (M9)	0	0	12,85

ES = экстракционный растворитель; ES1 = 96% этанол; ES2 = полиэтиленгликоль 400 (PEG 400); ES3 = смесь PEG 400 + 3% соевого лецитина

^aМИС80 - минимальная ингибирующая концентрация исследуемого вещества, при которой концентрация живых модельных микроорганизмов снижается на 80%. Когда МИС80 = 0, экстракт не оказывает никакого воздействия.

^b Продукт из Примера 1.

^c Продукт из Примера 2.

^d Продукт из Примера 9.

В табл. 10-15 приведены массовые концентрации активных веществ 1-10 в эффективных растворах экстрактов прополиса в каждой из трех испытанных систем экстракционных растворителей, они получены с использованием:

- (i) 96% этанол, продукт из примера 1,
- (ii) полиэтиленгликоль 400 (PEG 400), продукт из примера 2; и,
- (iii) PEG 400 (9 вес.%) и смесь соевого лецитина (3 вес.%), продукт из примера 9;

или массовые концентрации соответствующих активных веществ 1-10, при которых каждый конкретный жидкий экстракт достигает МИС. Он был определен из первичного жидкого экстракта, где DER составляет 1:2, разведенного раствора, при котором достигается МИС.

Таблица 10

Массовая концентрация (γ) в [мкг/мл] для активных веществ прополиса 1-4 в эффективных растворах жидкого экстракта прополиса, полученного с 96% этанолом; продукт из примера 1

Модельный микроорганизм	Действующее вещество 1-4			
	1	2	3	4
M1	22,91	13,98	5,24	5,92
M2	45,82	27,96	10,47	11,83
M3	17,41	10,63	3,98	4,50
M4	90,91	55,48	20,78	23,48
M5	916,32	559,26	209,49	236,68
M6	91,63	55,93	20,95	23,67
M7	45,82	27,96	10,47	11,83
M8	916,32	559,26	209,49	236,68
M9	916,32	559,26	209,49	236,68

Активное вещество: п-кумаровая кислота (1), транс-ферулловая кислота (2), кофейная кислота (3), 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4)

Модельный микроорганизм: *S. aureus* ATCC 29293 (M1), MRSA (M2), MSSA (M3), *E. faecalis* ATCC 9212 (M4), *E. faecalis* VRE (M5), *E. coli* ATCC 10536 (M6), *A. baumannii* ATCC 43498 (M7), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (M8), *C. albicans* ATCC 90028 (M9)

Таблица 11

Массовая концентрация (γ) в [мкг/мл] для активных веществ прополиса 5-10 в эффективных растворах жидкого экстракта прополиса, полученного с 96% этанолом; продукт из примера 1

Модельный микроорганизм	Действующее вещество 5-10					
	5	6	7	8	9	10
M1	1,22	13,03	12,41	5,81	2,59	1,35
M2	2,44	26,05	24,82	11,62	5,17	2,70
M3	0,93	9,90	9,43	4,42	1,96	1,03
M4	4,85	51,69	49,24	23,05	10,26	5,36
M5	48,88	521,03	496,38	232,36	103,38	54,00
M6	4,89	52,10	49,64	23,24	10,34	5,40
M7	2,44	26,05	24,82	11,62	5,17	2,70
M8	48,88	521,03	496,38	232,36	103,38	54,00
M9	48,88	521,03	496,38	232,36	103,38	54,00

Активное вещество: коричная кислота (5), хризин (6), пиноцембрин (7), галангин (8), апигенин (9), кемпферол (10)

Модельный микроорганизм: *S. aureus* ATCC 29293 (M1), MRSA (M2), MSSA (M3), *E. faecalis* ATCC 9212 (M4), *E. faecalis* VRE (M5), *E. coli* ATCC 10536 (M6), *A. baumannii* ATCC 43498 (M7), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (M8), *C. albicans* ATCC 90028 (M9)

Таблица 12

Массовая концентрация (γ) в [мкг/мл] для активных веществ 1-4 в эффективных растворах жидкого экстракта прополиса, полученного с полиэтиленгликолем 400 (PEG 400), продукт из примера 2

Модельный микроорганизм	Действующее вещество 1-4			
	1	2	3	4
M1	75,06	45,89	16,78	22,61
M2	75,06	45,89	16,78	22,61
M3	75,06	45,89	16,78	22,61
M4	433,08	264,80	96,81	130,63
M5	750,57	458,93	167,79	226,14
M6	69,05	42,22	15,44	20,81
M7	75,06	45,89	16,78	22,61
M8) 750,57) 458,93) 167,79) 226,14
M9) 750,57) 458,93) 167,79) 226,14
Активное вещество: п-кумаровая кислота (1), транс-феруловая кислота (2), кофейная кислота (3), 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4)				
Модельный микроорганизм: <i>S. aureus</i> ATCC 29293 (M1), MRSA (M2), MSSA (M3), <i>E. faecalis</i> ATCC 9212 (M4), <i>E. faecalis</i> VRE (M5), <i>E. coli</i> ATCC 10536 (M6), <i>A. baumannii</i> ATCC 43498 (M7), <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (M8), <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (M9)				

Таблица 13

Массовая концентрация (γ) в [мкг/мл] для активных веществ прополиса 5-10 в эффективных растворах жидкого экстракта прополиса, полученного с полиэтиленгликолем 400 (PEG 400), продукт из примера 2

Модельный микроорганизм	Действующее вещество 5-10					
	5	6	7	8	9	10
M1	3,84	47,68	45,77	20,83	9,70	8,02
M2	3,84	47,68	45,77	20,83	9,70	8,02
M3	3,84	47,68	45,77	20,83	9,70	8,02
M4	22,16	275,10	264,10	120,20	56,05	46,26
M5	38,40	476,77	457,71	208,31	97,03	80,18
M6	3,53	43,86	42,11	19,17	8,93	7,38
M7	3,84	47,68	45,77	20,83	9,70	8,02
M8) 38,40) 476,77) 457,71) 208,31) 97,03) 80,18
M9) 38,40) 476,77) 457,71) 208,31) 97,03) 80,18
Активное вещество: коричная кислота (5), хризин (6), пиноцембрин (7), галангин (8), апигенин (9), кемпферол (10)						
Модельный микроорганизм: <i>S. aureus</i> ATCC 29293 (M1), MRSA (M2), MSSA (M3), <i>E. faecalis</i> ATCC 9212 (M4), <i>E. faecalis</i> VRE (M5), <i>E. coli</i> ATCC 10536 (M6), <i>A. baumannii</i> ATCC 43498 (M7), <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (M8), <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (M9)						

Таблица 14

Массовая концентрация (γ) в [мкг/мл] для активных веществ 1-4 в эффективных растворах жидкого экстракта прополиса, полученного смесью полиэтиленгликоля 400 (PEG 400, 97 вес.%) и соевого лецитина (3 вес.%), продукт из примера 9

Модельный микроорганизм	Действующее вещество 1-4			
	1	2	3	4
M1	27,80	17,13	6,24	8,24
M2	27,80	17,13	6,24	8,24
M3	27,80	17,13	6,24	8,24
M4	111,21	68,51	25,00	32,94
M5	547,05	337,03	122,82	162,05
M6	86,50	53,29	19,42	25,62
M7	55,60	34,26	12,48	16,47
M8	603,22	371,64	135,42	178,68
M9	864,95	532,89	194,19	256,21

Активное вещество: п-кумаровая кислота (1), транс-феруловая кислота (2), кофейная кислота (3), 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4)
 Модельный микроорганизм: *S. aureus* ATCC 29293 (M1), MRSA (M2), MSSA (M3), *E. faecalis* ATCC 9212 (M4), *E. faecalis* VRE (M5), *E. coli* ATCC 10536 (M6), *A. baumannii* ATCC 43498 (M7), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (M8), *C. albicans* ATCC 90028 (M9)

Таблица 15

Массовая концентрация (γ) в [мкг/мл] для активных веществ прополиса 5-10 в эффективных растворах жидкого экстракта прополиса, полученного смесью полиэтиленгликоля 400 (PEG 400, 97 вес.%) и соевого лецитина (3 вес.%), продукт из примера 9.

Модельный микроорганизм	Действующее вещество 5-10					
	5	6	7	8	9	10
M1	1,45	17,03	16,24	7,33	3,64	1,71
M2	1,45	17,03	16,24	7,33	3,64	1,71
M3	1,45	17,03	16,24	7,33	3,64	1,71
M4	5,78	68,14	64,94	29,31	14,60	6,82
M5	28,44	335,17	319,44	144,19	71,62	33,56
M6	4,50	53,00	50,51	22,80	11,32	5,31
M7	2,89	34,07	32,47	14,66	7,28	3,41
M8	31,36	369,59	352,24	158,99	78,97	37,01
M9	44,96	529,95	505,08	227,98	113,23	53,07

Активное вещество: коричная кислота (5), хризин (6), пиноцембрин (7), галангин (8), апигенин (9), кемпферол (10)
 Модельный микроорганизм: *S. aureus* ATCC 29293 (M1), MRSA (M2), MSSA (M3), *E. faecalis* ATCC 9212 (M4), *E. faecalis* VRE (M5), *E. coli* ATCC 10536 (M6), *A. baumannii* ATCC 43498 (M7), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (M8), *C. albicans* ATCC 90028 (M9)

Общий антимикробный эффект (МПК) каждого из протестированных жидких экстрактов прополиса достигается за счет синергетического действия нескольких активных веществ 1-10. Интересно и совершенно неожиданно то, что смесь активных веществ 1-10 в малых концентрациях более эффективна, чем смесь гораздо более высоких (чистых) концентраций некоторых активных веществ 1-10.

Состав по настоящему изобретению является наиболее эффективным против грамположительных микроорганизмов, таких как *Staphylococcus* spp., но, как видно из Таблицы 9, в более высокой концентрации он также эффективен против некоторых грамотрицательных бактерий: *E. coli* и *A. baumannii*, а также грибка *C. albicans*.

Применение стандартизованного жидкого экстракта прополиса согласно настоящему изобретению.

Экстракт прополиса, применяемый в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента, в соответствии с настоящим изобретением, содержит стандартизованные концентрации высокобиоактивных веществ:

- (i) п-кумаровая кислота (1): 100-1300 мкг/мл;
- (ii) транс-феруловая кислота (2): 75-800 мкг/мл;
- (iii) кофейная кислота (3): 25-300 мкг/мл; и
- (iv) 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4) (CAPE): 40-400 мкг/мл.

Благодаря стандартизованному содержанию основных активных веществ 1-4 жидкий экстракт прополиса согласно изобретению, представляет собой активный фармацевтический ингредиент (API) для использования у людей и животных, активный косметический ингредиент (ACI) или функциональный

ингредиент для пищевых продуктов или продуктов питания, корма для животных, который характеризуется следующими полезными фармакологическими эффектами:

- (i) противовоспалительное средство, см. источники информации 1, 8, 9, 11, 12, 13, 17;
- (ii) антиоксидант, см. источники информации 8, 9, 14, 15, 20;
- (iii) иммуномодулирующий, см. источники информации 1, 8, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20;
- (iv) гепатопозитивный, см. источник информации 9;
- (v) противомикробный, включая также антибактериальные, противовирусные, противогрибковые и противопаразитарные средства, см. источники информации 9, 10, 12, 15, 16, 18;
- (vi) противоопухолевый, см. источники информации 9, 10, 11, 14, 19; и
- (vii) противоопухолевый, см. источники информации 11, 14.

Другими ценными эффектами жидкого экстракта прополиса согласно изобретению, являются: фунгицидное, бактерицидное, вирулицидное, инсектицидное и нематоцидное действие при защите растений. Благодаря сильной антиоксидантной активности, жидкий экстракт прополиса, согласно изобретению, косвенно укрепляет растения и их устойчивость к факторам абиотического стресса и помогает им противостоять инфекциям. Благодаря этому его используют как укрепляющее средство для растений, см. источники информации 21-25.

Жидкий экстракт прополиса, согласно настоящему изобретению, используется как:

- (i) активный фармацевтический ингредиент или наполнитель для производства фармацевтических продуктов, выбранный из группы, состоящей из: лекарств, медицинских устройств или лечебных средств;
- (ii) активный косметический ингредиент или вспомогательное вещество для производства косметических продуктов;
- (iii) пищевой ингредиент для производства функциональных пищевых продуктов, пищевых добавок или пищевых продуктов для специального питания;
- (iv) активный фармацевтический ингредиент или наполнитель для производства ветеринарных продуктов, выбранных из группы, состоящей из: ветеринарно-медицинских продуктов, кормов для животных, кормовых добавок для животных, или средств для ветеринарного использования; или
- (v) активный агрохимический ингредиент или наполнитель для производства агрохимических продуктов, выбранных из группы, состоящей из: фунгицидов, бактерицидов, вирулицидов, инсектицидов, нематоцидов и усилителей растений, что особенно подходит для экологичного сельского хозяйства.

Фармацевтическая композиция на основе указанного стандартизованного жидкого экстракта прополиса согласно настоящему изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение раскрывает фармацевтическую композицию, которая основана на указанном стандартизованном жидком экстракте прополиса, применяемом в качестве активного фармацевтического ингредиента (API). Фармацевтическая композиция по данному изобретению содержит:

- (i) жидкий экстракт прополиса: от 5 до 95 вес.%; и
 - (ii) один или несколько фармацевтических наполнителей, необходимых для препарата конечной лекарственной формы, выбранный из группы, состоящей из: раствора, суспензии, геля, крема, мази, спрея для перорального или назального применения; до 100 вес.% конечной композиции;
- где количественный состав минимум двух из четырех указанных основных активных веществ следующий:

- (i) п-кумаровая кислота (1): 10-1300 мкг/г;
- (ii) транс-феруловая кислота (2): 10-800 мкг/г;
- (iii) кофейная кислота (3): 5-300 мкг/г; и
- (iv) 2-фенилэтил 3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4), (CAPE); 5-400 мкг/г.

Таким образом, фармацевтические вспомогательные вещества (вспомогательные вещества) выбираются из группы, состоящей из: разбавители, увлажнители, консерванты, хелатирующие агенты, антиоксиданты, загустители, смягчающие вещества, эмульгаторы, тонизирующие агенты и агенты, регулирующие pH.

Разбавитель представляет собой фармацевтически приемлемую жидкость, выбранную из группы, состоящей из: очищенная вода, этиловый спирт, 1,2-пропиленгликоль, жидкие полиэтиленгликоли (PEG), такие как PEG 200, PEG 400 или PEG 600, или смеси этих веществ.

Увлажнитель выбирается из группы, состоящей из глицерина, сорбита, 1,2-пропиленгликоля или смесей этих веществ.

Консервант выбран из группы, состоящей из: парабенов, таких как метил-4-гидроксibenзоат, этил-4-гидроксibenзоат, пропил-4-гидроксibenзоат, бутил-4-гидроксibenзоат, 4-хлор-м-крезол, триклозан, бензиловый спирт, 2-феноксиэтанол, бензойная кислота и ее соли, такие как бензоат натрия, сорбиновая кислота или ее соли, такие как сорбат калия, дегидроуксусная кислота (3-ацетил-2-гидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он), хлоргексидин и его соли, такие как диглюконат хлоргексидина, соли четвертичного аммония, такие как хлорид бензалкония или бромид цетримония, или смеси этих веществ.

Хелатирующий агент выбран из группы, состоящей из: натриевых или калиевых солей этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), диэтилентриаминопентауксусной кислоты (DTPA), нитрилотриук-

сусной кислоты (НТА); растворимые соли цитрата, такие как дигидрат тринатрийцитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), или смеси этих веществ.

Типичным хелатирующим агентом является дигидрат динатрия эдетата ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Антиоксидант выбран из группы, состоящей из: α -токоферола и его сложных эфиров, таких как α -токоферилсукцинат, аскорбиновая кислота и ее соли, такие как аскорбат натрия, 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (ВНТ), трет-бутиланизол (ВНА), или смеси этих веществ.

Загуститель выбран из группы, состоящей из: метилцеллюлоза, подобная гидроксипропилметилцеллюлозе (НРМС), гидроксипропилцеллюлоза (НРС), гидроксиэтилцеллюлоза (НЕС), метилцеллюлоза (МС), карбоксиметилцеллюлоза натрия (NaСМС), синтетические полимеры, такие как поливиниловый спирт (ПВС), полиакриловая кислота (ПАК) и ее сополимеры, поливинилпирролидон (ПВП), различные камеди, такие как гуммиарабик, ксантановая камедь, трагакант; альгиновая кислота и ее соли, такие как альгинат натрия, металлические соли высших жирных кислот, такие как моностеарат алюминия, дистеарат алюминия, тристеарат алюминия, или смеси этих веществ.

Смягчающее средство выбрано из группы, состоящей из вазелина; минеральное масло; растительные масла, такие как миндальное, подсолнечное или оливковое масло; триглицериды со средней длиной цепи; натуральные или синтетические сложные эфиры высших жирных кислот и одновалентных спиртов, такие как изопропилмириститат или масло жожоба; воски, подобные пчелиному воску, силиконовое масло, высшие жирные кислоты, такие как олеиновая или стеариновая кислота, высшие жирные спирты, такие как цетиловый спирт, или смеси этих веществ.

Эмульгатор выбран из группы, состоящей из: ланолин, этоксилированный ланолин, ланолиновые спирты; этоксилированные ланолиновые спирты, лецитин, гидролизованый лецитин, моно- и диэфиры глицерина и высших жирных кислот, такие как моностеарат глицерина, сложные эфиры сорбитана и высших жирных кислот, такие как моностеарат сорбитана, этоксилированные высшие жирные спирты, такие как полиоксиэтилен (23) лауриловый эфир или полиоксиэтилен (2) олеат, где число 23 или 2 представляет количество звеньев этиленоксида, сложные эфиры этоксилированных сложных эфиров сорбитана, такие как полисорбат 60; водорастворимые мыла, такие как стеарат натрия, водорастворимые сульфаты высших жирных спиртов, такие как лаурилсульфат натрия, водорастворимые фосфаты жирных спиртов, такие как цетилфосфат калия, или смеси этих веществ.

Тонизирующий агент используется в основном в фармацевтических лекарственных формах, которые наносят на слизистую оболочку, например слизистую оболочку носа, и выбираются из группы, состоящей из: хлорида натрия (NaCl), глицерина, 1,2-пропиленгликоля или смесей этих веществ.

Агент для регулирования рН включает фармацевтически приемлемые кислоты и основания для уменьшения или увеличения значения рН и буферные системы. Его выбирают из группы, состоящей из соляной кислоты (HCl), серной кислоты (H_2SO_4), фосфорной кислоты (H_3PO_4), лимонной кислоты, уксусной кислоты, гидроксида натрия (NaOH), гидроксида калия (KOH), гидроксида аммония (NH_4OH), дигидрофосфат натрия (NaH_2PO_4), гидрофосфат натрия (Na_2HPO_4), дигидроцитрат натрия ($\text{NaH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), водородцитрат натрия ($\text{Na}_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$), цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$) или смеси этих веществ.

Производство фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению получают способом, который включает следующие стадии:

(i) добавление стандартизированного жидкого экстракта прополиса согласно данному изобретению в разбавитель и их гомогенизация;

(ii) добавление одного или нескольких других вспомогательных веществ и их гомогенизация;

где стадии (i) и (ii) проводят при температуре от 10 до 100°C, предпочтительно при температуре от 20 до 60°C, в течение 1-5 мин, в случае изготовления лекарственной формы;

(iii.a) раствор или раствор для спрея; выполняется фильтрация конечного раствора, в том числе стерильная фильтрация, если нужно;

(iii.b) гель или суспензия; осуществляется добавление загустителя и его гомогенизация;

(iii.c) крем; производство жировой фазы осуществляется смешиванием смягчителя и эмульгатора и их гомогенизации при температуре 50-80°C в течение 1-15 мин, а затем проводят добавление раствора со стадии (ii), нагретого до 50-80°C, с последующим эмульгированием с использованием гомогенизатора высокого сдвига или высокого давления, при температуре от 50-80°C, предпочтительно от 55-65°C, в течение 1-30 мин, с последующей гомогенизацией при температуре от 65-20°C, в течение 10-120 мин; или

(iii.d) мазь; смешивание раствора со стадии (ii) с ранее расплавленной смесью смягчителя и, возможно, эмульгатора при температуре 50-70°C в течение 5-30 мин с последующей гомогенизацией при температуре 70-20°C, в течение 10-120 мин.

Способы производства фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут включать также различные альтернативные общепринятые технологические способы для производства указанных дозированных форм, известных специалистам в области фармацевтической технологии.

Типичные примеры производства фармацевтической композиции согласно изобретению, описаны в примерах 11-16.

В качестве особого примера, обрисованная в общих чертах конечная лекарственная форма раствора для интрамаммарного применения, которая раскрыта в примере 11. В этом случае первичный стандартизованный жидкий экстракт прополиса, производство которого описано в примере 9, в котором просто разбавляют экстракционный растворитель согласно изобретению; в данном случае со смесью полиэтиленгликоля 400 (97 вес.%) и лецитина сои (3 вес.%), который здесь находится в функции разбавителя. Полученный таким образом раствор для интрамаммарного применения дает количественное содержание основных действующих веществ 1-4 в указанных пределах, см. табл. 16.

Табл. 16. Результаты количественного анализа активных веществ 1-10 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) фармацевтической композиции по настоящему изобретению; лекарственная форма раствора для интрамаммарного применения; продукт из Примера 11, характеризующийся массовым соотношением лекарственного средства к экстракту (DER) 1:2, разбавленный в 10 раз для целей анализа HPLC.

Таблица 16

№	Действующее вещество прополиса 1-10	Концентрация [мкг / г]
1	п-кумаровая кислота (1)	40,97
2	транс-феруловая кислота (2)	52,18
3	кофейная кислота (3)	17,73
4	CAPE(4)	52,25
5	коричная кислота (5)	6,99
6	хризин (6)	84,70
7	пиноцембрин (7)	77,36
8	галангин (8)	43,37
9	апигенин (9)	15,24
10	кемпферол (10)	4,76

^a Аналитический метод HPLC описан в Примере 3.

Типичная хроматограмма HPLC количественного анализа настоящей композиции показана на фиг. 5. Исследования фармакологических эффектов фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Отдельные фармакологические эффекты композиции по настоящему изобретению в дозировке из раствора, продукта из примера 11, изучали в клинических исследованиях при терапии:

- (i) мастита, воспаления вымени у коров;
- (ii) мастита у коз; и
- (iii) заживления ран у лошадей.

Изучение терапии мастита у коров.

Изучение лечения мастита у коров проводилось на пяти фермах молочного скота Голштинской породы. Всего в исследовании было задействовано 86 коров или 339 четвертей вымени, где четверть вымени использовалась в качестве статистической единицы. Животных свободно содержали в глубокой подстилке и кормили стандартным премиксом для молочного скота без добавления антибиотиков. Исследование было одобрено этическим комитетом ветеринарной медицины. Были включены здоровые животные и четверти без клинических симптомов мастита с количеством соматических клеток (SCC) ниже 200,000 мл, а также инфицированные четверти вымени с SCC выше 200,000 мл. Рандомизированное перекрестное клиническое исследование безопасности и эффективности было выполнено с интрамаммарным применением композиции по настоящему изобретению в форме раствора в условиях местности. Композицию по настоящему изобретению из примера 11 наносили трижды на все четыре четверти вымени коровы: во время утреннего доения, вечернего доения и на следующий день после утреннего доения. Подробная процедура описана в примере 17, тогда как табл. 17 представляет бактериологическое излечение для каждого патогена, идентифицированного за определенное количество кварталов до первого интрамаммарного применения.

Таблица 17

Эффективность бактериологической обработки/лечения мастита у коров после интрамаммарного применения композиции по настоящему изобретению из примера 11.а

№	Возбудитель	Состав из Примера 11		
		Количество обработанных четвертей вымени (N)	Количество четвертей вымени, подвергшихся бактериальной обработке	% вылечившихся
1	<i>Стрептококк уберис</i>	9	9	100
2	<i>Streptococcus spp.</i>	2	2	100
3	ЦНС	1	1	100
4	<i>Enterococcus sp.</i>	2	2	100
5	<i>Кишечная палочка</i>	3	3	100
6	<i>Corynebacterium spp.</i>	4	4	100
7	<i>Pasteurella spp.</i>	2	2	100
8	<i>Citrobacter spp.</i>	1	1	100
9	<i>Сerratия</i>	1	1	100
10	<i>Бациллы</i>	1	1	100
Всего:		26	26	100
^a Процедура проведения исследования описана в Примере 17.				

Трехкратный (двухдневный) режим введения композиции из примера 11 обеспечил бактериологическое излечение в 100% случаев всего за 7 дней.

Для сравнения, антибиотик цефалоспоринового ряда цефтиофур достигает 66% бактериологического излечения, но только после ежедневного интрамаммарного применения в течение 8 дней, а через 5 дней излечение дает лишь 54% случаев, см. источник информации 30. При субклиническом мастите, вызванном *S. uberis*, двухдневная терапия пирлимидином привела к излечению в 58,1% случаев, в то время как терапия в течение 5 и 8 дней обеспечила излечение в 68,8% и 80% случаев, см. источник информации 30:

30) С.П. Оливер, Б.Е. Гиллеспи, С.Дж. Хедрик, Х. Мурхед, П. Ланн, Е. Х. Даулен, Д. Джонсон, К. К. Ламар, С. Т. Честер, В. М. Мозли: Эффективность расширенной интрамаммарной терапии цефтиофуrom для лечения субклинического мастита у лактирующих молочных коров. *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 2393-2400.

Альтернативно, при терапии мастита у коров композиция по настоящему изобретению в дозированной форме суспензии для интрамаммарного применения, как описано в примере 12, также может быть успешно использована.

Исследование терапии мастита у коз.

Изучение лечения мастита у коз было проведено на ферме альпийских коз при OPG Matijasec, Sigetec Ludbreski, Хорватия, на 25 козах. У всех коз был диагностирован субклинический мастит левой и правой половин вымени. Козы, молоко которых при микробиологическом исследовании дали положительный результат, были разделены на две группы: в одну группу применяли композицию по настоящему изобретению из Примера 11, а в другую группу применяли интрамаммарную суспензию амоксициллина и клавулановой кислоты (Клавуксил®; Genera, Хорватия). Все по трехкратному режиму применения. Переносимость и бактериологическое излечение половинок контролировали параллельно после i.mam. нанесения композиции из примера 11. Трехкратное (двухдневное) нанесение композиции по настоящему изобретению обеспечило бактериологическое излечение 75% инфицированных половинок и 85% через 14 дней. Это оказалось более эффективным, чем интрамаммарное введение антибиотиков, которое позволило бактериологическое излечение в 73,3% случаев. Результаты исследования показали, что лечение мастита коз композицией из примера 11 может обеспечить своевременное бактериологическое излечение без использования антибиотиков.

Подробная процедура исследования описана в примере 18, а результаты бактериологического лечения представлены в табл. 18.

Таблица 18

Эффективность бактериологической обработки/лечения мастита у коз после i.mam. применения композиции по настоящему изобретению из примера 11 по сравнению с антибиотиком (фиксированная комбинация амоксициллина и клавулановой кислоты)^a

№	Возбудитель	Количество обработанных половинок вымени (N)	Количество подвергшихся бактериальной обработке половинок вымени через 7 дней	Количество подвергшихся бактериальной обработке половинок вымени через 14 дней	% вылечившихся
Антибиотик (амоксициллин + клавулановая кислота)					
1	<i>Staphylococcus spp.</i>	8	2	4	50
2	<i>S. aureus</i>	1	1	1	100
3	<i>Streptococcus spp.</i>	3	3	3	100
4	<i>C. уберис</i>	2	2	2	100
5	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	2	2	100
Всего:		15	9	11	73,3
Состав из Примера 11					
1	<i>Staphylococcus spp.</i>	8	6	7	87,5
2	<i>S. aureus</i>	7	4	6	85,7
3	<i>Streptococcus spp.</i>	2	2	2	100
4	<i>C. уберис</i>	2	2	2	100
5	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	1	1	100
Всего:		20	15	17	85
^a Процедура проведения исследования описана в Примере 18.					

При сравнении активности i.mam. при применении амоксициллина в качестве антибиотика широкого спектра действия, который подходит для лечения мастита, вызванного патогенами, обнаруженными в образцах молока и композиции из примера 11, была доказана более сильная активность последнего. Через семь дней после применения амоксициллина вылечилось только 60% половинок, в то время как результат для композиции из примера 11 составил 75%. Через 14 дней после первого применения общий процент бактериологически вылеченных половинок при применении антибиотика составил 73,3%, в то время как для тестируемой композиции - 85%.

Из указанных результатов можно увидеть высокую эффективность противовоспалительной и противомикробной активности композиции по настоящему изобретению при лечении мастита. Эффективность выше, чем у классической терапии, такой как фиксированная комбинация амоксициллина и клавулановой кислоты в качестве антибиотика широкого спектра действия.

Альтернативно при терапии мастита у коз, композиция по настоящему изобретению в виде суспензии для интрамаммарного применения, как описано в примере 12, также может быть успешно использована.

Можно сделать вывод, что композиция по настоящему изобретению, помимо других своих свойств, характеризуется антимикробной активностью против ряда бактерий и грибов, причем антимикробная эффективность по сравнению с классическими антибиотиками выше *in vivo*, чем в условиях *in vitro*. Это не только антимикробное средство, но также противовоспалительное и иммуномодулирующее средство.

Иммуномодулирующие эффекты прополиса тесно связаны с его антиоксидантным действием, а окислительный стресс является неотъемлемой частью патогенеза мастита, см., например, ссылку 31 на источник информации:

31) О. Атакиси, Х. Орал, Э. Атакиси, О. Мерхан, С. Метин Панкарчи, А. Озджан, С. Марасли, Б. Полат, А. Колак, С. Кайя: Субклинический мастит вызывает изменения оксида азота, всей окислительной и антиоксидантной способности коровьего молока, Res. Vet. Sci. 89 (2010) 10-13.

Обзор случая заживления ран у лошадей.

Описан случай заживления ран на передней ноге кобылы. Это была глубокая рана в области передней ноги, которая возникла, когда задняя нога зацепила переднюю ногу во время бега. Перед началом введения композиции из примера 11 рану лечили консервативно, безуспешно, разными препаратами.

Затем рану промывали физиологическим раствором, сушили и обрабатывали композицией из при-

мера 11 один раз в день в течение 5 дней. Улучшение, подобное эпителизации, можно было увидеть через 48 часов, а полное заживление раны произошло через 96 ч. Кобыла в течение нескольких дней интенсивно хромала, после чего признаков хромоты не наблюдалось. Восстановление было полным. Подробное описание этого случая приведено в примере 19.

Несмотря на то, что для более точных выводов необходимо провести подробное клиническое исследование, специалистам в данной области ясно, что настоящая композиция эффективно действует как средство для заживления ран. Поскольку из литературы известно, что противовоспалительная, антиоксидантная и эпителизирующая активности важны для процесса заживления ран, стимуляция синтеза коллагена, как и в случае с композицией по настоящему изобретению, вместе с доказанной антимикробной активностью является частью спектра фармакологические эффекты; для сравнения см. источник информации 32:

32) С. Маринотти, Э. Ранзато: Прополис: новый рубеж для заживления ран, *Burns Trauma* (2015) 3:9, DOI 10.1186/s41038-015-0010-z.

Применение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению используется для лечения заболеваний и состояний у людей и животных из следующих групп: воспалительные заболевания, бактериальные инфекции, грибковая инфекция, вирусные заболевания, аутоиммунные заболевания, функциональные желудочно-кишечные расстройства, для регенерации слизистой оболочки, лечения ожогов и заживления ран, а также онкологических заболеваний.

К воспалительным заболеваниям и состояниям относятся: гингивит, пародонтит, ларингит, гастрит, колит, геморроидальная болезнь, дерматит, воспаление наружного уха, синусит, ринит, вагинит и мастит.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению используется для лечения бактериальных инфекций, вызванных бактериями из следующих групп:

(i) грамположительные бактерии: *Staphylococcus* spp.: *Staphylococcus aureus*, MRSA (метициллин-резистентный золотистый стафилококк), MSSA (метициллин-чувствительный золотистый стафилококк), *Staphylococcus intermediateus*, *Staphylococcus pseudintermedius*; коагулазонегативные стафилококки: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp.: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus thermophilus*; *Peptostreptococcus* spp., *Corynebacterium* spp.: *Corynebacterium Bovis*, *Trueperella pyogenes*; *Nocardia* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, энтерококки: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*. устойчивые к ванкомицину энтерококки (VRE): *Enterococcus casseliflavus*; и

(ii) грамотрицательные бактерии: кишечная палочка; *Acinetobacter baumannii*, Синегнойная палочка, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella choleraesuis*, *Yersinia enterocolitica*; *Enterobacter* spp. (*Enterobacter cloacae*), *Klebsiella* spp.: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella flexner*; *Burkholderia cepacia*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces israelii*, *Bacteroides fragilis*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas salivosa*, *Porphyromonas denticanis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema* spp., *Bacteroides splanchnicus*.

Кроме того, настоящая фармацевтическая композиция используется для лечения грибковых инфекций, вызванных такими грибами, как: *Candida* vs.: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida kruzei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*; *Aspergillus* spp.: *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium pinophilum*, *Paecilomyces variotii*, *Trichoderma virens*, *Chaetomium globosum*, и *Malassezia pachydermatis*.

Также композиция по изобретению используется для лечения вирусных заболеваний, вызываемых вирусами, такими как: Вирус простого герпеса (HSV), Вирус папилломы человека (ВПЧ), Вирус Эпштейна-Барра (EBV), Цитомегаловирус (ЦМВ), полиовирус, вирусы гриппа А и В, ретровирусы, вирус осповакцины, вирусы простуды: риновирус, пикорнавирус, вирус парагриппа человека (HPIV), метаневмовирус человека (HMPV), коронавирусы, аденовирусы, респираторно-синцитиальный вирус человека (HRSV), энтеровирусы.

Альтернативно, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению используется для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, целиакия и рассеянный склероз.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению используется для лечения раковых заболеваний, таких как рак кожи и слизистых оболочек, опухоли желудочно-кишечного тракта, колоректальная карцинома.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению используется для лечения следующих функциональных желудочно-кишечных расстройств: расстройства пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкого кишечника и толстой кишки, центрально опосредованная желудочно-кишечная боль, расстройства желчного пузыря и сфинктера Одди, аноректальные расстройства, специфические желудочно-кишечные расстройства у детей и подростков.

В частности, композиция по настоящему изобретению используется для лечения мастита у животных.

Примеры

Основные замечания.

В качестве первичного прополиса использовался неочищенный прополис тополевого типа от компании Hedera Ltd. Этанол (96%) и полиэтиленгликоль 200, 400 и 600, а также порошкообразный соевый лецитин (SL) были приобретены у компании Fagron Croatia Ltd (HR). Лецитин рапса (RL) и гидролизованый лецитин рапса (HRL) были приобретены от компании Pfannenschmidt (Германия). Обезмасленный лецитин подсолнечника (SUL) был приобретен в компании Barentz (Нидерланды). Дистеарат алюминия был приобретен у компании Sigma-Aldrich (США). Все остальное исходное сырье закупалось у местных поставщиков.

Пробы химически чистых соединений аналитического назначения: и-кумаровая кислота (1; >98% HPLC), транс-феруловая кислота (2; 99%), кофейная кислота (3; ≥98% HPLC), 2-фенэтил-3,4-дигидрокситранс-циннамат (CAPE; 4; ≥97% HPLC), транс-коричная кислота (5; ≥96,5% ГХ), хризин (6; ≥98% HPLC), пиноцембрин (7; ≥95% ТСХ), галангин (8; ≥95% HPLC), апигенин (9; ≥99% HPLC) и кемпферол (10; ≥90% HPLC), которые служили количественными аналитическими стандартами для определения их количественного содержания в жидких экстрактах прополиса, были приобретены у компании Sigma-Aldrich (США).

Термин "комнатная температура" относится к температурному интервалу от 20 до 25° С. Аббревиатура "мин" означает минуты. Выход (% от теоретического выхода) выражается как весовой процент выделенного жидкого экстракта прополиса по отношению к весу исходного экстракционного растворителя (этанол, PEG, этанол + лецитин, PEG + лецитин).

Количественное содержание активных веществ 1-10 в жидких экстрактах прополиса выражается в виде массовой концентрации (γ) в микрограммах на миллилитр [мкг/мл], в то время как его количественный состав в фармацевтической композиции по настоящему изобретению выражается в микрограммах на грамм конечного продукта (лекарственной формы) [мкг/г].

Пример 1. Производство жидкого экстракта прополиса с использованием 96% этанола в качестве экстракционного растворителя.

Предварительная обработка прополисом перед экстракцией: Образец неочищенного прополиса (тип тополя; 1 кг) был охлажден в холодильнике при - 20°С в течение минимум 1 ч. Затем образец измельчали в мельнице.

Экстракция 96% этанолом: Этанол (96%; 70,00 г) добавляли к измельченному прополису (30,00 г). Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре 72 ч при периодическом перемешивании. Затем смесь фильтровали через фильтровальную бумагу (черная лента), получая 60,00 г (85,7%) жидкого экстракта прополиса в виде раствора темно-коричневого цвета со слегка интенсивным запахом прополиса. С целью тестирования минимальной ингибирующей концентрации (МИС) спиртового экстракта прополиса, описанной в примере 10, та же процедура была повторена при соотношении лекарственного средства к экстракту (DER) 1:2.

Пример 2. Производство жидкого экстракта прополиса с использованием полиэтиленгликоля 400 в качестве экстракционного растворителя.

Измельченный прополис, предварительная обработка которого описана в примере 1 (30,00 г), смешивали с полиэтиленгликолем 400 (PEG 400; 70,00 г). Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре 72 ч при периодическом перемешивании. Затем смесь фильтровали через фильтровальную бумагу (черная лента). Получили 55,00 г (78,6%) жидкого экстракта прополиса в виде вязкой жидкости темно-коричневого цвета со слегка интенсивным запахом, напоминающим прополис.

С целью тестирования минимальной ингибирующей концентрации (МИС) экстракта полиэтиленгликоль-прополиса, описанной в примере 10, ту же процедуру повторяли при соотношении лекарственного средства к экстракту (DER) 1:2.

Пример 3. Аналитический способ HPLC для количественного определения активных веществ 1-10 в жидких экстрактах прополиса.

Количественные анализы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) были выполнены с использованием способа, разработанного специально для целей мониторинга основных активных веществ 1-4 и сопровождаемых активными ингредиентами 5-10 из прополиса.

Образцы имеющихся в продаже стандартов активных веществ 1-10 готовят для анализа разбавлением смесью этанол: вода, 75:25 по объему, до концентрации 100 мкг/мл.

Образцы жидких экстрактов прополиса (100 мкл) согласно настоящему изобретению перед анализом разбавляли смесью этанол: вода, 75:25 по объему (900 мкл), в соотношении 1:10 по весу (10 кратное разведение).

Анализы проводились на приборе Shimadzu LC201СНТ, оборудованном автосамплером, насосом, дегазатором, термостатом колонок и детектором UV-VIS, при следующих условиях:

(i) хроматографическая колонка: Ascentis express; C18; размеры: 15 см×3,0 мм; диаметр частиц в колонке: 2,7 мкм;

(ii) подвижная фаза: А = 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, В = метанол; градиент: 0 мин,

80% А, 20% В; 3 мин, 70% А, 30% В; 60 мин, 20% А, 80% В; 90 мин, 20% А, 80% В; 100 мин, 70% А, 30% В; 105 мин, 80% А, 20% В;

(iii) температура колонки: 30°C;

(iv) поток: 0,25 мл/мин;

(v) время анализа: 110 мин;

(vi) длина волны на детекторе UV-VIS: для обнаружения: 370 нм, для интеграции: 290 нм;

(vii) объем закачки: 10 мкл; (viii) давление: 210-290 бар.

В указанных условиях основные активные вещества 1-4 и сопутствующие ингредиенты 5-10 имеют следующие времена удерживания (t_r):

(i) t_r [п-кумаровая кислота (1)] = 14,13 мин; t_r [транс-феруловая кислота (2)] = 15,31 мин; t_r [кофейная кислота (3)] = 10,57 мин; t_r [2-фенэтил-3,4-дигидрокситрансциннамат; CAPE (4)] = 48,62 мин;

(ii) t_r [транс-коричная кислота (5)] = 29,76 мин; t_r [хризин (6)] = 44,68 мин; t_r [пиноцембрин (7)] = 47,39 мин; t_r [галангин (8)] = 49,94 мин; t_r [апигенин (9)] = 37,72 мин; t_r [кемпферол (10)] = 36,87 мин.

Время удерживания основных активных веществ прополиса 1-4 и сопутствующих активных ингредиентов 5-10 представлено в табл. 1.

Пример 4. Производство стандартизированных жидких экстрактов прополиса с использованием экстракционного растворителя на основе смеси этанола и лецитина.

Измельченный прополис, предварительная обработка которого описана в примере 1, (30,00 г) смешивали с экстракционным растворителем следующего состава (эксперименты E1-8):

E1: 96% этанол (67,00 г; 95,7%) и лецитин соевых бобов (SL; 3,00 г; 4,3%);

E2: 96% этанол (60,00 г; 85,7%) и лецитин соевых бобов (SL; 10,00 г; 14,3%);

E3: 96% этанол (50,00 г; 71,4%) и лецитин соевых бобов (SL; 20,00 г; 28,6%);

E4: 96% этанол (40,00 г; 57,1%) и лецитин соевых бобов (SL; 30,00 г; 42,9%);

E5: 96% этанол (67,00 г; 98,9%) и лецитин рапса (RL; 3,00 г 25% -ного препарата; 0,75 г лецитина; 1,1%); теоретический выход в E5 = 67 г этанола + 0,75 г лецитина = 67,75 г;

E6: 96% этанол (60,00 г; 96,0%) и лецитин из семян рапса (RL; 10,00 г 25% -ного препарата; 2,50 г лецитина; 4,0%); теоретический выход в E6 = 60 г этанола + 2,50 г лецитина = 62,50 г;

E7: 96% этанол (67,00 г; 97,8%) и гидролизованный лецитин из семян рапса (HRL; 3,00 г 50% -ного препарата; 1,50 г гидролизованного лецитина из семян рапса; 2,2%); теоретический выход в E7 = 67 г этанола + 1,50 г лецитина = 68,50 г;

E8: 96% этанол (60,00 г; 92,3%) и гидролизованный лецитин из семян рапса (HRL; 10,00 г 50% -ного препарата; 5,00 г лецитина; 7,7%); теоретический выход в E8 = 60 г этанола + 5,00 г лецитина = 65,00 г.

Полученную таким образом смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и оставляли при комнатной температуре на 72 ч при периодическом перемешивании. Затем смесь фильтровали через фильтровальную бумагу (черная лента). Получили 50-60 г (71,0-85,7%) жидкого экстракта прополиса в виде вязкой жидкости темно-коричневого цвета со слегка интенсивным запахом, напоминающим прополис.

Приготовленный таким образом первичный жидкий экстракт прополиса подвергся количественному анализу на содержание основных активных веществ 1-4, а также сопутствующих ингредиентов 5-10 в соответствии с аналитическим способом, описанным в примере 3. Результаты представлены в табл. 3 и 4.

Приготовленные таким образом первичные жидкие экстракты прополиса в экстракционных растворителях (ES), описанные в экспериментах E1-E8 с известным количественным содержанием активных веществ 1-4, стандартизировали путем разбавления теми же ES, которые использовались на стадии экстракции, до желаемого уровня количественного состава активных веществ 1-4, согласно настоящему изобретению.

Пример 5. Производство стандартизированных жидких экстрактов прополиса с использованием экстракционного растворителя на основе смеси полиэтиленгликоля 400 и лецитина.

Измельченный прополис, предварительная обработка которого описана в примере 1, (30,00 г) смешивали с экстракционным растворителем следующего состава (эксперименты E1-E8):

E1: полиэтиленгликоль 400 (PEG 400; 67,00 г; 97%) и лецитин соевых бобов (SL; 3,00 г; 3%);

E2: полиэтиленгликоль 400 (PEG 400; 60,00 г; 90%) и лецитин соевых бобов (SL; 10,00 г; 10%);

E3: полиэтиленгликоль 400 (PEG 400; 67,00 г; 98,9%) и лецитин рапса (RL; 3,00 г 25% -ного препарата; 0,75 г лецитина; 1,1%); теоретический выход в E3 = 67 г PEG 400 + 0,75 г лецитина = 67,75 г;

E4: полиэтиленгликоль 400 (PEG 400; 60,00 г; 96,0%) и лецитин рапса (RL; 10,00 г 25% -ного препарата; 2,50 г лецитина; 4,0%); теоретический выход в E4 = 60 г PEG 400 + 2,50 г лецитина = 62,50 г;

E5: полиэтиленгликоль 400 (PEG 400; 67,00 г; 97,8%) и гидролизованный лецитин рапсового масла (HRL; 3,00 г 50% -препарата; 1,50 г гидролизованного лецитина; 2,2%); теоретический выход в E5 = 67 г PEG 400 + 1,50 г лецитина = 68,50 г;

E6: полиэтиленгликоль 400 (PEG 400; 60,00 г; 92,3%) и гидролизованный лецитин рапсового масла (HRL; 10,00 г 50% -ного препарата; 5,00 г лецитина; 7,7%); теоретический выход в E6 = 60 г PEG 400 + 5,00 г лецитина = 65,00 г.

Полученную таким образом смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и остав-

ляли при комнатной температуре на 72 ч при периодическом перемешивании. Затем смесь фильтровали через фильтровальную бумагу (черная лента). Получили 45-55 г (69,0-78,6%) жидкого экстракта прополиса в виде вязкой жидкости темно-коричневого цвета со слегка интенсивным запахом, напоминающим прополис.

Приготовленный таким образом первичный жидкий экстракт прополиса подвергся количественному анализу на содержание основных активных веществ 1-4, а также сопутствующих ингредиентов 5-10 в соответствии с аналитическим способом, описанным в примере 3. Результаты представлены в табл. 5 и 6.

Такие приготовленные первичные жидкие экстракты прополиса в экстракционных растворителях (ES), описанные в экспериментах E1-E6, с известным количественным содержанием активных веществ 1-4, стандартизировали путем разбавления теми же ES, которые использовались на стадии экстракции, до желаемого уровня количественного состава действующих веществ 1-4, согласно настоящему изобретению.

Пример 6. Производство стандартизированных жидких экстрактов прополиса с использованием экстракционного растворителя на основе смеси полиэтиленгликоля 200 и соевого лецитина.

Измельченный прополис, предварительная обработка которого описана в примере 1 (30,00 г), смешивали с экстракционным растворителем, смесью полиэтиленгликоля 200 (149,85 г, 99,9%) и соевого лецитина (SL, 0,15 г, 0,1%). Полученную таким образом смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и оставляли при комнатной температуре на 48 ч при периодическом перемешивании. Затем смесь фильтровали через фильтровальную бумагу (черная лента). В результате было получено 137,00 г (91,3%) жидкого экстракта прополиса в виде вязкой жидкости темно-коричневого цвета со слегка интенсивным запахом, напоминающим прополис. Затем был проведен количественный анализ HPLC в соответствии со способом, описанным в примере 3, для определения количественного содержания основных активных веществ 1-4. Фильтрат разбавляли тем же экстракционным растворителем, смесью полиэтиленгликоля 200 и соевого лецитина (SL), 99,9:0,1 по весу, до общего уровня содержания активных веществ 1-4 в соответствии со спецификацией стандартизированного жидкого экстракта по настоящему изобретению.

Пример 7. Производство стандартизированных жидких экстрактов прополиса с использованием экстракционного растворителя на основе смеси полиэтиленгликоля 600 и обезжиренного лецитина подсолнечника.

Измельченный прополис, предварительная обработка которого описана в примере 1, (30,00 г) смешивали с экстракционным растворителем, смесью полиэтиленгликоля 600 (PEG 600, 297,00 г, 99%) и обезжиренного лецитина подсолнечника (SUL, 3,00 г, 1,0%). Полученную таким образом смесь нагревали до температуры 70°C и интенсивно перемешивали в течение 3 ч. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через фильтровальную бумагу (черная лента). В результате было получено 261,00 г (87,0%) жидкого экстракта прополиса в виде вязкой жидкости темно-коричневого цвета со слегка интенсивным запахом, напоминающим прополис. Затем был проведен количественный анализ HPLC в соответствии со способом, описанным в примере 3, на основании которого было определено количественное содержание основных активных веществ 1-4. Фильтрат разбавляли тем же экстракционным растворителем, смесью полиэтиленгликоля 600 и обезжиренного лецитина подсолнечника (SUL), 99:1 по весу, до общего уровня содержания активных веществ 1-4, в соответствии со спецификацией стандартизированного жидкого экстракта по настоящему изобретению.

Пример 8. Производство стандартизированных жидких экстрактов прополиса с использованием экстракционного растворителя на основе смеси полиэтиленгликоля 200, полиэтиленгликоля 600 и гидролизованного лецитина рапсового семени.

Измельченный прополис, предварительная обработка которого описана в примере 1, (30,00 г) смешивали с экстракционным растворителем, смесью полиэтиленгликоля 200 (PEG 200, 150,00 г, 50%), полиэтиленгликоля 600 (139,50 г, 46,5%) и гидролизованного лецитина рапсового масла (HRL; 10,50 г, 3,5%). Полученную смесь нагревали при температуре 100° C при интенсивном перемешивании в течение 3 ч. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через фильтровальную бумагу (черная лента). В результате получили 245,00 г (81,7%) жидкого экстракта прополиса в виде вязкой жидкости темно-коричневого цвета со слегка интенсивным запахом, напоминающим прополис.

Затем был проведен количественный анализ HPLC в соответствии со способом, описанным в примере 3, на основании которого было определено количественное содержание основных активных веществ 1-4. Фильтрат разбавляли тем же экстракционным растворителем, смесью полиэтиленгликоля 200, полиэтиленгликоля 600 и гидролизованного лецитина рапса (HRL), 50:46,5:3,5 по весу, до общего уровня активных веществ 1-4, согласно спецификации стандартизированного жидкого экстракта по настоящему изобретению.

Пример 9. Производство стандартизированных жидких экстрактов прополиса с использованием смеси полиэтиленгликоля 400 и соевого лецитина.

Измельченный прополис, предварительная обработка которого описана в примере 1, (30,00 г) смешивали с экстракционным растворителем, смесью полиэтиленгликоля 400 (PEG 400, 87,30 г, 97 вес.%) и соевого лецитина (SL, 2,70 г, 3 вес.%). Полученной таким образом смеси давали отстояться для мацерации при периодическом перемешивании в течение 72 ч. Затем смесь фильтровали через фильтровальную

бумагу (800 пор/см²). Получили 50-55 г вязкой жидкости темно-коричневого цвета с интенсивным запахом, напоминающим прополис. Полученный таким образом продукт разбавляли тем же экстракционным растворителем до массы 60,00 г. Таким образом, полученный экстракт лекарственного средства-экстракт (DER) с соотношением 1:2 был получен, или, как указано, 60 г экстракта из 30 г исходного прополиса.

Такой приготовленный жидкий экстракт прополиса для целей производства фармацевтической композиции по настоящему изобретению:

(i) подвергли количественному анализу HPLC в соответствии с способом, описанным в примере 3 для определения активных веществ 1-4, а в дальнейшем, с учетом реальной массовой концентрации действующих веществ 1-4 в таком приготовленном экстракте,

(ii) стандартизировано разбавлением чистой (свежей) смесью растворителей: полиэтиленгликоль 400 (97 вес.%) и лецитин соевых бобов (3 вес.%), до массовой концентрации действующих веществ 1-4:

(i) п-кумаровая кислота (1), 10-1300 мкг/мл;

(ii) транс-феруловая кислота (2), 10-800 мкг/мл;

(iii) кофейная кислота (3), 5-300 мкг/мл; и,

(iv) 2-фенэтил-3,4-дигидрокситрансциннамат (4; CAPE); 5-400 мкг/мл; деленного на коэффициент X/100, где X - весовой процент указанного стандартизированного жидкого экстракта прополиса в составе фармацевтической композиции.

Пример 10. Определение антимикробной эффективности стандартизированных жидких экстрактов согласно настоящему изобретению.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (MIC) на модельных патогенных микроорганизмах.

Минимальные ингибирующие концентрации (MIC) стандартизированных жидких экстрактов прополиса, согласно настоящему изобретению, были определены с использованием продукта из примера 9 по сравнению с аналогичными жидкими экстрактами прополиса, полученными с 96% этанолом (продукт из примера 1) или PEG 400 (продукт из Примера 2) в соответствии с указаниями способов CLSI и EUCAST; см. источники информации 26-29.

Противомикробная эффективность была протестирована в условиях *in vitro* на штаммах ATCC следующих модельных патогенных микроорганизмов (M): Золотистый стафилококк ATCC 29293 (M1); Метициллин-резистентный золотистый стафилококк; MRSA (коллекция MFBF; M2); метициллин-чувствительный золотистый стафилококк; MSSA (коллекция MFBF; M3); *Enterococcus faecalis* ATCC 9212 (M4); *Enterococcus faecalis* VRE (коллекция MFBF) (M5); кишечная палочка ATCC 10536 (M6); *Acinetobacter baumannii* ATCC 43498 (M7); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (M8); и грибковые микроорганизмы албиканс ATCC 90028 (M9).

Процедуру серийного микроразбавления проводили для определения минимальных ингибирующих концентраций (MIC) экстрактов. Суспензии клеток были приготовлены из родительской культуры в буфере PBS (pH 7,4), и они были доведены до 0,5 единиц МакФарланда нефелометрией. Тестирование проводили в серийных растворах в 96-луночных микротитрационных планшетах в диапазоне от 100 до 0,7125 мкг/мл путем добавления 100 мкл раствора экстракта прополиса, растворенного в бульоне Мюллера-Хинтона. После инокуляции 100 мкл каждой бактериальной культуры, доведенной до 105 КОЕ/мл, планшеты инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. MIC определяли добавлением 10 мкл 0,5 мг/мл раствора хлорида 2,3,5-трифенил-2Н-тетразолия (ТТС; индикатор окислительно-восстановительного потенциала) на одну лунку, и после инкубации в течение 4 ч при температуре 30°C оптическую плотность определяли спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

Значения MIC определяли, как концентрацию экстракта прополиса, при которой происходило 80% снижение количества бактерий (MIC80).

Для видов грибов значения MIC определяли в среде RPMI с добавлением глюкозы по той же схеме, что и для бактерий. После инкубации (48 ч, 37°C, аэробные условия, в темноте) добавляли ХТТ (индикатор окислительно-восстановительного потенциала) в сочетании с менадионом, и оптическую плотность определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм.

Значения MIC определяли, как концентрацию экстракта прополиса, при которой происходило 80% снижение количества бактерий или грибов (MIC80).

Отрицательный контроль содержал только среду и растворитель (без добавленных микроорганизмов и прополиса), тогда как положительный контроль подвергался воздействию антибиотиков или противогрибковых агентов.

Путем определения антимикробной активности раствора прополиса *in vitro* были измерены минимальные ингибирующие концентрации (MIC80), которые показаны в таблице 9 в виде раствора (%) жидкого экстракта в данном растворителе. Исходный жидкий экстракт прополиса получали при массовом соотношении лекарственное средство: экстракт (DER) 1:2; продукт из Примера 9. Если разбавление жидкого экстракта больше, что означает, что концентрация активных веществ 1-10 ниже для MIC, полученный антимикробный эффект тестируемого экстракта выше.

Результаты представлены в табл. 9.

В табл. 10-15 рассчитанные значения массовой концентрации (γ) в [мкг/мл] для каждого конкретно-

го активного вещества даны 1-10 (из каждого из трех исследованных жидких экстрактов прополиса), для которых каждый конкретный экстракт достиг МС. Экстракты получали с использованием следующих экстракционных растворителей (ES): 96% этанол (продукт из примера 1), полиэтиленгликоль 400 (PEG 400; продукт из Примера 2) и смесь PEG 400 (97 вес.%) и лецитина соевых бобов (3 вес.%) (продукт из примера 9). Они были определены из первичных жидких экстрактов, где DER составляет 1:2; деленное на раствор (коэффициент), при котором был достигнут соответствующий МС.

Пример 11. Производство композиции по настоящему изобретению в лекарственной форме раствора для интрамаммарного применения с минимальным содержанием 150 мкг/г действующих веществ 1-4.

Состав (на 100 г раствора):

(1) 50,00 г (50,00 вес.%) жидкого экстракта прополиса согласно данному изобретению, продукт из примера 9, стандартизованный минимум на 300 мкг/мл активных веществ 1-4;

(2) 50,00 г (20,00 вес.%) полиэтиленгликоль 400.

Подготовка. Ингредиенты (1) и (2) смешивали и гомогенизировали путем перемешивания при комнатной температуре в течение 5 мин. Раствор фильтровали через фильтровальную бумагу и заливали в интрамаммарные инъекторы по 4-8 г. Состав раствора: минимум 150 мкг/г общая концентрация действующих веществ 1-4. Результаты количественного анализа HPLC представлены в табл. 16, а соответствующая типичная хроматограмма HPLC приведена на фиг. 5.

Пример 12. Производство композиции по настоящему изобретению в лекарственной форме суспензии для интрамаммарного применения с минимальным содержанием 100% мкг/г действующих веществ 1-4.

Состав (на 100 г суспензии):

(1) 770,00 г (77,00 вес.%) жидкого экстракта прополиса согласно настоящему изобретению, продукт из примера 9, стандартизованный минимум на 150 мкг/мл активных веществ 1-4;

(2) 200,00 г (вес.%) полиэтиленгликоля 4000;

(3) 3,00 г (вес.%) дистеарата алюминия.

Подготовка. Полиэтиленгликоль расплавляли (2) при температуре 60°C, добавляли дистеарат алюминия (3) и гомогенизировали при этой температуре в течение 15 мин. Затем смесь охлаждали при перемешивании и добавляли экстракт прополиса (1) при температуре 40-45°C. Смесь дополнительно охлаждали до комнатной температуры при перемешивании и дополнительно гомогенизировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Была получена вязкая суспензия бледно-желтого цвета, которую далее заливали во внутримаммарные инъекторы по 4-8 г.

Состав подвески: минимально 100 мкг/г общая концентрация активных веществ 1-4.

Пример 13. Производство композиции по настоящему изобретению в лекарственной форме геля с минимальным содержанием 250 мкг/г действующих веществ 1-4.

Состав (на 100 г геля):

(1) 30,00 г (30,00 вес.%) жидкого экстракта прополиса согласно настоящему изобретению, продукт из примера 9, стандартизованный минимум на 850 мкг/мл активных веществ 1-4;

(2) 20,00 г (2,00 вес.%) карбопол 940;

(3) 1,00 г (1,00 вес.%) полисорбат 60;

(4) 0,20 г (0,20 вес.%) сорбата калия;

(5) 0,30 г (0,30 вес.%) бензоат натрия;

(6) 0,30 г (0,30% w/w) лимонная кислота, безводная;

(7) q.s. гидроксид натрия (20% раствор);

(8) дополнительно 100% дистиллированная вода.

Подготовка. К 30 г жидкого экстракта прополиса согласно настоящему изобретению добавляли (2) и гомогенизировали путем перемешивания при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем добавляли 50 г очищенной воды (8) и гомогенизировали путем перемешивания при комнатной температуре в течение 5 мин. После этого добавляли ингредиенты (3-6) и растворяли при перемешивании в течение 10 мин. Затем значение pH доводили до 5,5-6 с помощью (7). К полученному таким образом гелю добавляли оставшееся количество очищенной воды до 100 г общей массы и гомогенизировали путем перемешивания при комнатной температуре в течение 15 мин с окончательной деаэрацией продукта.

Состав геля: минимально 250 мкг/г общая концентрация активных веществ 1-4.

Пример 14. Производство композиции по настоящему изобретению в лекарственной форме крема с минимальным содержанием 100 мкг/г действующих веществ 1-4.

Состав (на 100 г крема):

(1) 20,00 г (20,00 вес.%) жидкий экстракт прополиса согласно данному изобретению, продукт из примера 9, стандартизованный минимум на 500 мкг/мл активных веществ 1-4;

(2) 5,00 г (5,00 вес.%) полисорбат 60;

(3) 5,00 г (5,00 вес.%) ланолин, безводный;

(4) 2,00 г (2,00 вес.%) пчелиный воск, белый;

(5) 8,00 г (8,00 вес.%) цетиловый спирт;

(6) 8,00 г (8,00 вес.%) вазелин, белый;

(7) 10,00 г (10,00 вес.%) минеральное масло густое;

- (8) 0,20 г (0,20 вес.%) 4-хлор-м-крезол;
- (9) дополнительно 100% дистиллированная вода.

Подготовка. Масляная фаза была приготовлена плавлением смеси ингредиентов (2-7) при температуре 65-70°C в течение 15-20 мин до образования почти бесцветной маслянистой жидкости. Водную фазу получали растворением соединений (8) и (1) в очищенной воде с последующим нагреванием до температуры 65-70°C при перемешивании. Затем водную фазу медленно добавляли к масляной фазе при интенсивном перемешивании, предпочтительно с помощью гомогенизатора, который обеспечивает гомогенизацию с высоким сдвигом, от 1000 до 3000 оборотов в минуту (об /мин) в течение 15-20 мин. Полученную таким образом эмульсию дополнительно интенсивно перемешивали с постепенным охлаждением при температуре 65-20°C в течение 30 минут.

Состав крема: минимально 100 мкг/г общая концентрация активных веществ 1-4.

Пример 15. Производство композиции по настоящему изобретению в лекарственной форме мази с минимальным содержанием 500 мкг/г действующих веществ 1-4.

Форма выпуска (на 100 г мази):

- (1) 50,00 г (50,00 вес.%) жидкий экстракт прополиса согласно данному изобретению, продукт из примера 9, стандартизованный минимум на 1000 мкг/мл активных веществ 1-4;
- (2) 10,00 г (10,00 вес.%) полиэтиленгликоль 400;
- (3) 40,00 г (40,00 вес.%) полиэтиленгликоль 4000.

Подготовка. Ингредиенты (1-3) тщательно перемешивали и нагревали до температуры 60°C, гомогенизировали путем перемешивания в течение 5 мин и постепенно охлаждали до комнатной температуры при перемешивании.

Состав мази: минимально общая концентрация активных веществ 1-4 500 мкг/г.

Пример 16. Производство композиции по настоящему изобретению в лекарственной форме назального спрея с минимальным содержанием 50 мкг/г действующих веществ 1-4.

Состав (на 100 г раствора для спрея):

- (1) 5,00 г (5,00% w/w) жидкий экстракт прополиса согласно данному изобретению, продукт из примера 9, стандартизованный минимум на 1000 мкг/мл активных веществ 1-4;
- (2) 0,60 г (0,60 вес.%) хлорида натрия;
- (3) 0,10 г (0,10 вес.%) полисорбат 60;
- (4) 0,10 г (0,10 вес.%) сорбат калия;
- (5) 0,10 г (0,10 вес.%) бензоат натрия;
- (6) 0,20 г (0,20 вес.%) лимонная кислота, безводная;
- (7) 0,01 г (0,01 вес.%) эдетат натрия (Na₂EDTA·2H₂O);
- (8) дополнительно 100% дистиллированная вода.

Подготовка. К 90 г очищенной воды (1) добавляли ингредиенты (2-7) и растворяли путем перемешивания при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем добавляли (1) и смесь гомогенизировали при комнатной температуре в течение 15 мин. После этого раствор фильтровали через стерильный фильтр 0,2 мкм и разливали в подходящие стерильные флаконы, снабженные крышкой и распылительными насосами для назального применения.

Состав раствора: минимально 50 мкг/г общая концентрация активных веществ 1-4.

Пример 17. Исследование противовоспалительной активности композиции по настоящему изобретению в форме интрамаммарного раствора из примера 11 при лечении мастита дойных коров.

Изучение лечения мастита у коров проводилось на пяти фермах молочного скота Голштинской породы. Всего в исследовании было задействовано 86 коров или 339 четвертей вымени, где четверть вымени использовалась в качестве статистической единицы. Животных свободно содержали в глубокой подстилке и кормили стандартным премиксом для молочного скота без добавления антибиотиков. Исследование одобрено этическим комитетом ветеринарной медицины. Были включены здоровые животные и четверти вымени без клинических симптомов мастита с количеством соматических клеток (SCC) ниже 200,000 мл, а также инфицированные четверти вымени с SCC выше 200,000 мл. Рандомизированное перекрестное клиническое исследование безопасности и эффективности проводили с интрамаммарным применением композиции по настоящему изобретению в форме раствора. Композицию по настоящему изобретению из Примера 11 наносили трижды на все четыре четверти вымени коровы: во время утреннего доения, вечернего доения и на следующий день после утреннего доения. Сначала была протестирована переносимость композиции при интрамаммарном применении. Следили за изменениями в поведении коров, а также за макроскопическим внешним видом вымени (отек и покраснение), молоком и чувствительностью вымени к прикосновениям. Изменение количества соматических клеток (SCC) в молоке отслеживали с периода до первого i.mam. применения композиции, до 7 суток с момента первого нанесения. Образцы молока, а также четвертинки были сгруппированы в зависимости от того, был ли SCC повышен или ниже 200,000 мл, и были ли образцы положительными или отрицательными при бактериологическом исследовании, см. источник информации 33:

33) Европейское агентство по лекарственным средствам (1992): Местная толерантность к интрамаммарным препаратам у коров. Директива 81/852/ЕЕС.

Затем были проведены испытания эффективности бактериологического лекарства с композицией прополиса в соответствии с указаниями Европейского медицинского агентства (ЕМА), что является единственным показателем эффективности для *i.mam*. применения составы при лечении субклинического мастита. Он определяется как отсутствие ранее подтвержденного патогена в образце молока, собранном в течение определенных периодов времени после *i.mam*. применения данной рецептуры, см. источник информации 34:

34) Европейское агентство по лекарственным средствам (2017 г.): Руководство по проведению исследований эффективности интрамаммарных препаратов для использования у крупного рогатого скота. CVMP. EMA / CVMP / 344/1999-Rev.2.

Отбор проб молока производился по стандартной методике. Микробиологическое обследование проводилось по стандартным направлениям, см. источник информации 35:

35) JW Hogan: Лабораторный справочник по маститу крупного рогатого скота. Национальный совет мастита (1999) Мэдисон, Висконсин, САД.

Результаты бактериологического заживления мастита у коров представлены в табл. 17.

Пример 18. Исследование противовоспалительной активности композиции по настоящему изобретению в форме интрамаммарного раствора из примера 11 при лечении мастита у коз.

Изучение лечения мастита у коз проведено на 25 козах с диагностированным субклиническим маститом левой и правой половин вымени. Козы, молоко которых было положительным при микробиологическом исследовании, были разделены на две группы: в одну группу применяли композицию по настоящему изобретению из примера 11, а в другую группу применяли интрамаммарную суспензию амоксициллина и клавулановой кислоты (Klavuxil®; Genera, Хорватия). Все по трехкратному режиму применения.

Переносимость и бактериологическое излечение половинок контролировали параллельно после *i.mam*. применения композиции из примера 11. Препараты применяли по трехразовой (двухдневной) схеме с указанным антибиотиком или композицией из примера 11.

Во время исследования коз содержали в стойле с глубокой подстилкой. В период лактации было 170 коз со средней продуктивностью 500-600 кг молока на одну козу за одну лактацию, которая длится около 300 дней. Их кормили сеном по желанию, минимум 2 кг на козу, и премиксом, содержащим 16% белков, около 1 кг на козу, делится на две порции во время утреннего и вечернего доения. 2% витаминно-минеральный премикс Овисан® (компания Sano, Хорватия) был добавлен в премикс. Козы, молоко которых было положительным при бактериологическом исследовании, были разделены на две группы: в одну группу (количество обработанных половинок, N = 20) применяли композицию из примера 11; в то время как в другой группе (N = 15) интрамаммарная суспензия амоксициллина с клавулановой кислотой (Klavuxil®; Genera Company, Хорватия). Все по трехкратному режиму применения.

Во время тестирования переносимости композиции из примера 11 не наблюдалось ни поведенческих изменений у коз, ни макроскопического внешнего вида вымени (отек и покраснение) и молока, ни чувствительности вымени к прикосновению. Образцы молока из левой и правой половин вымени отбирали в предварительно промаркированные стерильные пластиковые пробирки после доения первых нескольких форсунок. Образцы отбирали перед первым нанесением композиции из примера 11, через 12 часов после первого нанесения, через 24 часа после первого нанесения и через 7 дней после первого нанесения композиции. Образцы молока хранили при температуре 4°C до следующего дня и анализировали в лаборатории Хорватского ветеринарного института на предмет мастита и качества сырого молока.

Тестирование эффективности бактериологического лечения проводилось в соответствии с указаниями Европейского медицинского агентства (ЕМА), см. источник информации 34. Отбор проб молока проводился по стандартной методике, а микробиологическое исследование по стандартным процедурам; см. источник информации 35.

Результаты бактериологического лечения мастита у коз представлены в табл. 18.

Пример 19. Обзор успешного заживления ран на ноге кобылы при введении композиции по настоящему изобретению из примера 11 в форме раствора.

Описан случай заживления ран на передней ноге лошади. Это была глубокая рана в области передней ноги, которая возникла, когда задняя нога кобылы зацепила переднюю ногу во время бега. Перед началом введения композиции из примера 11 рану безуспешно лечили различными препаратами консервативно.

Рана образовалась во время галопа кобылы, когда она "перехитрила" себя задними лапами. Затем черепно-мозговая часть копыта и подкова задней лапы повредили суставной участок передней стопы. В результате образовалась рана эллиптической формы размером 2×4 см. Сразу после травмы кобыла показала признаки хромоты, получившие оценку 4/5 (Американская ассоциация практикующих врачей). Сразу после травмы рану побрили и промыли обычной холодной водой, после чего обработали йодом (повидон-йод 0,01%) и опрыскали спреем нитрата серебра. Рану закрыли, чтобы избежать инфекционного заражения. Поскольку кобыла уже была вакцинирована против столбняка, сыворотка ТАТ не применялась. Кобыле давали отдохнуть в течение двух недель, и рану ежедневно обрабатывали механической очисткой и содержали в чистоте и сухости. Рану обрабатывали спреем йода и нитрата серебра каждые 48 ча-

сов. Через 5 дней рана начала заживать, становилось лучше. Затем рану начали обрабатывать цинкови-таминной мазью. Через две недели кобылу вернули к работе. Однако рана начала кровоточить, как только кобыла пустилась галопом. Рану снова продезинфицировали йодом и нанесли местный антибиотик на основе цефалоспорины в составе для интрамаммарного применения (Cobactan®). Наряду с механической очисткой раны рана местно обрабатывалась антибиотиком в течение следующих 5 дней. Затем была предпринята попытка дальнейшей работы с кобылой, но рана снова начала кровоточить.

После этого рану промывали физиологическим раствором, сушили и обрабатывали композицией из примера 11 один раз в день в течение 5 дней. Улучшение, видимое через эпителизацию, можно было наблюдать через 48 часов, а полное заживление наступило через 96 ч. Кобыла хромала только первые несколько дней, но в дальнейшем признаков хромоты не наблюдалось. Восстановление было полным.

Выводы.

Экспериментальные результаты показали, что специфическая смесь жидких полиэтиленгликолей (PEG), таких как PEG 400, в сочетании с лецитинами в количестве 0,1-3,5 вес.% экстракционного растворителя (ES) неожиданным образом эффективно и хемоселективно экстрагирует активные вещества прополиса: п-кумаровая кислота (1), транс-феруловая кислота (2), кофейная кислота (3) и 2-фенэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4) по сравнению с чистыми растворителями, такими как 96% этанол, PEG 400 или смеси EtOH и тех же лецитинов.

Точный количественный состав основных активных веществ 1-4 и сопутствующих ингредиентов 5-10 в первичном жидком экстракте прополиса определяется с использованием подходящего метода аналитической HPLC, разработанного в данном изобретении. Затем такой первичный экстракт стандартизируют тем же экстракционным растворителем (ES), который использовался на стадии экстракции. Это приводит к получению жидкого экстракта прополиса согласно настоящему изобретению с известными и стандартизованными концентрациями основных активных веществ 1-4. Приготовленный таким образом стандартизованный экстракт прополиса используется в качестве активного фармацевтического ингредиента (API), активного косметического ингредиента (ACI) или пищевого ингредиента для производства функциональных пищевых продуктов и пищевых добавок.

Композиция по настоящему изобретению на основе указанного жидкого экстракта прополиса, который содержит основные активные вещества п-кумаровую кислоту (1; 10-1300 мкг/г), трансферуловую кислоту (2; 10-800 мкг/г), кофейную кислоту (3; 5-300 мкг/г) и 2-фенэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4; 5-400 мкг/г) - эффективные средства при терапии воспалительных заболеваний, бактериальных инфекций, грибковые инфекции, вирусные заболевания, аутоиммунные заболевания, функциональные желудочно-кишечные расстройства, для регенерации слизистой оболочки, лечения ожогов и заживления ран, а также для лечения онкологических заболеваний.

Промышленная применимость.

Благодаря широкому практическому применению жидкого экстракта прополиса и фармацевтической композиции на его основе, промышленная применимость настоящего изобретения очевидна.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкий экстракт прополиса, предназначенный для применения в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента, содержащий

(А) сухой экстракт прополиса: 0,1-10,0 вес.%; и

(В) экстракционный растворитель: 90,0-99,9% вес.%;

где экстракционный растворитель содержит:

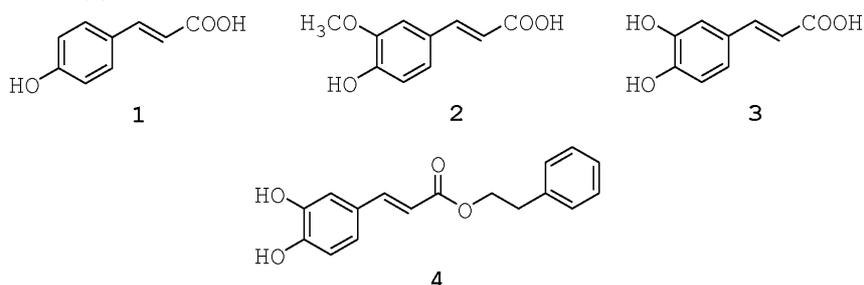
(В.1) один или несколько жидких полиэтиленгликолей (PEG) 200-600: 96,5-99,9 вес.%; и

(В.2) лецитин или гидролизованный лецитин: 0,1-3,5 вес.%;

где указанный жидкий экстракт прополиса стандартизирован по:

(I) количественному массовому соотношению сырого прополиса в качестве лекарственного средства и конечного экстракта (DER) в соотношении: 1:2-1:20 по весу; и

(II) количественному содержанию активных веществ прополиса, выбранных из группы, состоящей из: п-кумаровая кислота (1), транс-феруловая кислота (2), кофейная кислота (3) и 2-фенилэтил-3,4-дигидроксициннамат (4):



где количественный состав минимум двух из четырех указанных основных активных веществ следующий:

- (i) п-кумаровая кислота (1): 100-1300 мкг/мл;
- (ii) транс-феруловая кислота (2): 75-800 мкг/мл;
- (iii) кофейная кислота (3): 25-300 мкг/мл; и
- (iv) 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4; CAPE): 40-400 мкг/мл.

2. Жидкий экстракт прополиса, предназначенный для применения в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента по п.1, в котором жидкий полиэтиленгликоль (PEG) выбран из группы, состоящей из: полиэтиленгликоль 200, полиэтиленгликоль 300, полиэтиленгликоль 400, полиэтиленгликоль 600 или смеси этих веществ.

3. Жидкий экстракт прополиса, предназначенный для применения в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента по п.2, в котором жидкий полиэтиленгликоль (PEG) выбран из группы, состоящей из: полиэтиленгликоль 200, полиэтиленгликоль 400 или смесей этих веществ.

4. Жидкий экстракт прополиса, предназначенный для применения в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента по любому пп.1-3, в котором лецитин или гидролизованный лецитин характеризуется коэффициентом гидрофильно-липофильного баланса (HLB) от 2 до 12 и выбран из группы, состоящей из: соевый лецитин (*Glycine max* L); лецитин подсолнечника (*Helianthus annuus* L); рапсовый лецитин (*Brassica napus* L); лецитин канолы (*Brassica rapa* L); лецитин из куриных яиц (*Gallus gallus domesticus* L); обезжиренные продукты указанных лецитинов; гидрированные лецитины из указанных источников; гидролизованные лецитины из указанных источников; модифицированные ферментами производные указанных лецитинов; или смеси этих веществ.

5. Жидкий экстракт прополиса, предназначенный для применения в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента по п.4, в котором лецитин выбран из группы, состоящей из: природный лецитин, обезжиренный, гидрогенизированный, гидролизованный или модифицированный ферментами лецитин из сои (*Glycine max* L), подсолнечник (*Helianthus annuus* L), рапс (*Brassica napus* L) или канола (*Brassica rapa* L); или смеси этих веществ.

6. Жидкий экстракт прополиса, предназначенный для применения в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента по любому пп.1-5, в котором экстракционный растворитель содержит:

- (i) полиэтиленгликоль (PEG) 200, полиэтиленгликоль 300, полиэтиленгликоль 400 или их смеси: 97-99 вес.%; и
- (ii) природный лецитин, деолеинизированный лецитин или гидролизованный лецитин из сои (*Glycine max* L), подсолнечника (*Helianthus annuus* L), семян рапса (*Brassica napus* L) или канолы (*Brassica rapa* L), или смеси этих веществ: 1-3 вес.%.

7. Жидкий экстракт прополиса, предназначенный для применения в качестве фармацевтического, косметического или агрохимического ингредиента или пищевого ингредиента по пп.1-3, в котором указанный жидкий экстракт прополиса стандартизован по:

(I) количественному массовому соотношению сырого прополиса в качестве лекарственного средства к конечному экстракту (DER) в соотношении: 1:3-1:5 по весу; и

(II) количественному составу активных веществ прополиса, выбранных из группы, состоящей из: п-кумаровая кислота (1), транс-феруловая кислота (2), кофейная кислота (3) и 2-фенилэтил-3,4-дигидроксициннамат (4), где количественный состав, минимум двух из четырех указанных основных активных веществ, следующий:

- (i) п-кумаровая кислота (1): 500-1300 мкг/мл;
- (ii) транс-феруловая кислота (2): 300-800 мкг/мл;
- (iii) кофейная кислота (3): 100-300 мкг/мл; и
- (iv) 2-фенилэтил-3,4-дигидроксициннамат (4; CAPE): 100-400 мкг/мл.

8. Способ производства жидкого экстракта прополиса по любому из пп.1-7, включающий следующие стадии:

- (i) охлаждение сырого прополиса при температуре -20°C не менее 1 ч;
- (ii) измельчение охлажденного прополиса с просеиванием через поры 1-8 мм;
- (iii) экстракция сырого прополиса экстракционным растворителем при следующих условиях:
 - a) массовое соотношение сырого прополиса и экстракционного растворителя: 1:2-1:20 вес.%;
 - b) температура экстракции: 10-150°C; и
 - c) время экстракции: 5 мин - 72 ч;
- (iv) фильтрование полученной таким образом смеси через серию фильтров с порами от 100 мкм до 5 мкм с образованием нерастворенного остатка и жидкого экстракта прополиса;
- (v) количественный анализ основных активных веществ прополиса 1-4 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC); и
- (vi) стандартизация полученного таким образом жидкого экстракта прополиса с определенным точ-

ным количественным составом основных активных веществ 1-4 на этапе (v) путем разбавления свежим экстракционным растворителем, который использовался на этапе (iii), до желаемого содержания активных веществ 1-4:

- (i) п-кумаровая кислота (1): 100-1300 мкг/мл;
- (ii) транс-феруловая кислота (2): 75-800 мкг/мл;
- (iii) кофейная кислота (3): 25-300 мкг/мл; и
- (iv) 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4; CAPE): 40-400 мкг/мл.

9. Способ производства жидкого экстракта прополиса по п.8, в котором стадию экстракции (iii) проводят при следующих условиях:

- a) массовое соотношение сырого прополиса и экстракционного растворителя: 1:3-1:5 по весу;
- (b) температура экстракции: 15-70°C; и
- (c) время извлечения: 1-24 ч.

10. Способ производства жидкого экстракта прополиса по п.8 или 9, в котором способ высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) проводят для количественного определения основных активных веществ 1-4, при следующих условиях:

- (i) хроматографическая колонка: Ascentis express; C18; размеры: 15 см×3,0 мм; диаметр частиц в колонке: 2,7 мкм;
- (ii) подвижная фаза: А - 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, В - метанол; градиент: 0 мин, 80% А, 20% В; 3 мин, 70% А, 30% В; 60 мин, 20% А, 80% В; 90 мин, 20% А, 80% В; 100 мин, 70% А, 30% В; 105 мин, 80% А, 20% В;
- (iii) температура колонки: 30°C;
- (iv) поток: 0,25 мл/мин;
- (v) время анализа: 110 мин;
- (vi) длина волны на детекторе UV-VIS для обнаружения: 370 нм, для интеграции: 290 нм;
- (vii) объем инъекции: 10 мкл;
- (viii) давление: 210-290 бар.

11. Применение о жидкого экстракта прополиса по любому пп.1-7, в качестве активного фармацевтического ингредиента или наполнителя для производства фармацевтических продуктов, выбранных из группы, состоящей из: лекарственных препараты, медицинские устройства или лечебные средства.

12. Применение жидкого экстракта прополиса по любому пп.1-7 в качестве активного косметического ингредиента или наполнителя для производства косметических продуктов.

13. Применение жидкого экстракта прополиса по любому пп.1-7 в качестве пищевого ингредиента для производства функциональных пищевых продуктов, пищевых добавок и пищевых продуктов для специального питания.

14. Применение жидкого экстракта прополиса по любому пп.1-7 в качестве активного фармацевтического ингредиента или наполнителя для производства ветеринарных продуктов, выбранных из группы, состоящей из: ветеринарно-медицинские продукты, корма для животных, кормовые добавки для животных или средства для ветеринарного использования.

15. Применение жидкого экстракта прополиса по любому пп.1-7 в качестве активного агрохимического ингредиента или наполнителя для производства агрохимических продуктов, выбранных из группы, состоящей из: фунгициды, бактерициды, вирулициды, инсектициды, нематоциды и средства для стимуляции роста растений.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- (I) жидкий экстракт прополиса по любому из пп.1-7; от 5 до 95% по весу; и
- (II) один или несколько фармацевтических наполнителей, необходимых для производства конечной лекарственной формы, выбранных из группы, состоящей из: раствор, суспензия, гель, крем, мазь, спрей для перорального или назального применения, до 100 вес.% конечной композиции;

где количественный состав минимум двух из четырех указанных основных активных веществ следующий:

- (i) п-кумаровая кислота (1); 10-1300 мкг/г;
- (ii) транс-феруловая кислота (2); 10-800 мкг/г;
- (iii) кофейная кислота (3); 5-300 мкг/г; и
- (iv) 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат (4; CAPE); 5-400 мкг/г.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, в которой фармацевтический эксципиент выбран из группы, включающей: разбавители, увлажнители, консерванты, хелатирующие агенты, антиоксиданты, загустители, смягчающие вещества, эмульгаторы, агенты, повышающие тоничность, и агенты, регулирующие pH.

18. Способ производства фармацевтической композиции по п.16 или 17, включающий следующие стадии:

- (i) добавление стандартизированного жидкого экстракта прополиса по пп.1-7 в разбавитель и их гомогенизация;
- (ii) добавление одного или нескольких других вспомогательных веществ; и их гомогенизация;

где стадии (i) и (ii) проводят при температуре от 10 до 100°C в течение 1-5 мин.

19. Способ производства фармацевтической композиции по п.18, в котором в случае изготовления лекарственной формы в виде раствора или раствора для спрея производят фильтрацию конечного раствора, в том числе стерильную фильтрацию при необходимости.

20. Способ производства фармацевтической композиции по п.18, в котором в случае изготовления лекарственной формы в виде геля или суспензии осуществляют добавление загустителя и его гомогенизацию.

21. Способ производства фармацевтической композиции по п.18, в котором в случае изготовления лекарственной формы в виде крема осуществляют производство жировой фазы, проводят путем смешивания смягчающего средства и эмульгатора и их гомогенизации при температуре 50-80°C в течение 1-15 мин с последующим добавлением раствора со стадии (ii), нагретого до температуры 50-80°C с последующим эмульгированием с использованием гомогенизатора высокого сдвига или высокого давления при температуре от 50 до 80°C, в течение 1-30 мин, с последующей гомогенизацией при температуре от 65 до 20°C в течение 10-120 мин.

22. Способ производства фармацевтической композиции по п.18, в котором в случае изготовления лекарственной формы в виде мази осуществляют смешивание раствора со стадии (ii) с ранее расплавленной смесью смягчителя и эмульгатора при температуре 50-70°C в течение 5-30 мин с последующей гомогенизацией при температуре 70-20°C, в течение 10-120 мин.

23. Применение фармацевтической композиции по пп.16 или 17 для лечения заболеваний и состояний человека и животных из следующих групп, включающих: воспалительные заболевания, бактериальные инфекции, грибковые инфекции, вирусные заболевания, аутоиммунные заболевания, функциональные желудочно-кишечные расстройства, для регенерации слизистой оболочки, лечения ожогов и заживления ран и раковых заболеваний.

24. Применение фармацевтической композиции по п.23 для лечения воспалительных заболеваний из группы, включающей: гингивит, пародонтит, ларингит, гастрит, колит, геморроидальное заболевание, дерматит, воспаление наружного уха, синусит, ринит, вагинит и мастит.

25. Применение фармацевтической композиции по п.23 для лечения бактериальных инфекций, вызванных бактериями из следующих групп, включающих:

(I) грамположительные бактерии: *Staphylococcus* spp: *Staphylococcus aureus*, MRSA (метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*), MSSA (метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*; коагулазонегативные стафилококки: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus thermophilus*; *Peptostreptococcus* spp; *Corynebacterium* spp: *Corynebacterium bovis*; *Trueperella pyogenes*; *Nocardia* spp; *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus*; энтерококки: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*; устойчивые к ванкомицину энтерококки (VRE): *Enterococcus casseliflavus*; и,

(II) грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli*; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Haemophilus influenzae*; *Salmonella choleraesuis*; *Yersinia enterocolitica*; *Enterobacter* spp (*Enterobacter cloacae*); *Klebsiella* spp: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*; *Shigella flexneri*; *Burkholderia cepacia*; *Proteus mirabilis*; *Proteus vulgaris*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Actinomyces israelii*; *Bacteroides fragilis*; *Helicobacter pylori*; *Campylobacter coli*; *Campylobacter jejuni*; *Porphyromonas gulae*; *Porphyromonas salivosa*; *Porphyromonas denticanis*; *Prevotella intermedia*; *Treponema* spp; *Bacteroides splanchnicus*.

26. Применение фармацевтической композиции по п.23 для лечения грибковых инфекций, вызванных грибами из следующих групп, включающих: *Candida* spp: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida kruzei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*; *Aspergillus* spp: *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*; *Penicillium pinophilum*; *Paecilomyces variotii*; *Trichoderma virens*; *Chaetomium globosum*; *Malassezia pachydermatis*.

27. Применение фармацевтической композиции по п.23 для лечения вирусных заболеваний, вызываемых вирусами из группы, включающей: вирус простого герпеса (HSV); вирус папилломы человека (HPV); вирус Эпштейна-Барра (EBV); цитомегаловирус (CMV); полиовирус; вирусы гриппа А и В; ретровирусы; вирус осповакцины; вирусы простуды: риновирус, пикорнавирус, вирус парагриппа человека (HPIV), метапневмовирус человека (HMPV), коронавирус, аденовирусы, респираторно-синцитиальный вирус человека (HRSV), энтеровирусы.

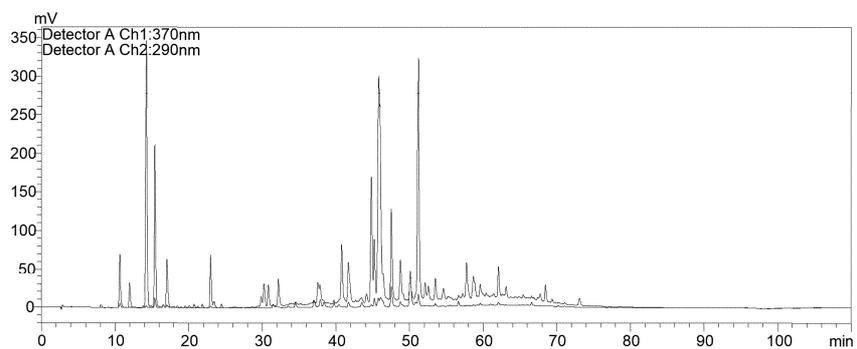
28. Применение фармацевтической композиции по п.23 для лечения аутоиммунных заболеваний из группы, включающей: псориаз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, целиакия и рассеянный склероз.

29. Применение фармацевтической композиции по п.23 для лечения раковых заболеваний из группы, включающей: рак кожи и слизистой оболочки, опухоль желудочно-кишечного тракта, колоректальная карцинома.

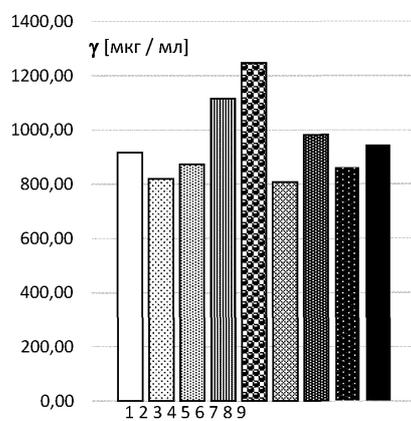
30. Применение фармацевтической композиции по п.23 для лечения мастита у животных.

31. Применение фармацевтической композиции по п.23 для лечения функциональных желудочно-

кишечных расстройств, выбранных из группы, включающей: расстройства пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкой кишки и толстой кишки, центрально опосредованная желудочно-кишечная боль, расстройства желчного пузыря и сфинктера Одди, аноректальные расстройства, желудочно-кишечные расстройства у детей и подростков.

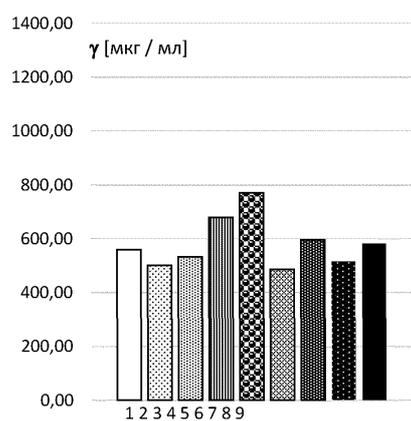


Фиг. 1



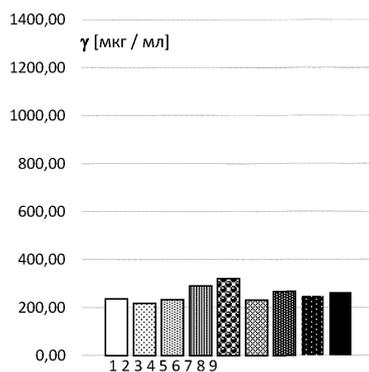
п-кумаровая кислота (1)

Фиг. 2.1

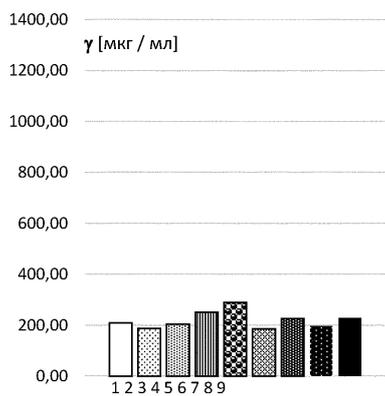


транс-феруловая кислота (2)

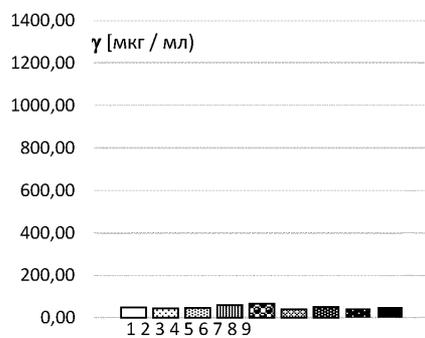
Фиг. 2.2



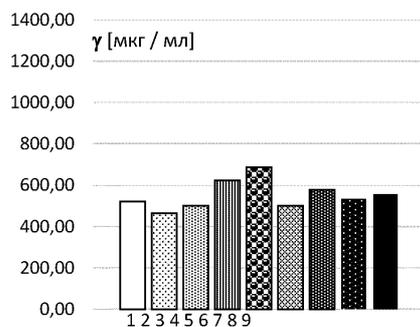
Фиг. 2.3



Фиг. 2.4

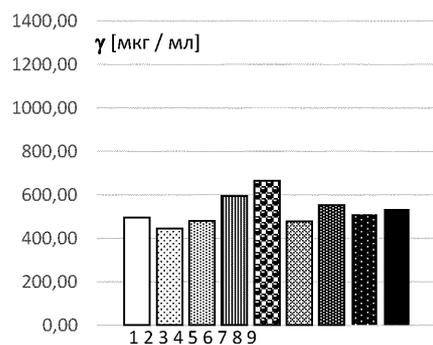


Фиг. 2.5



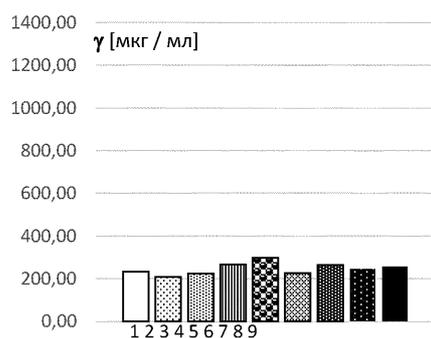
Фиг. 2.6

044986



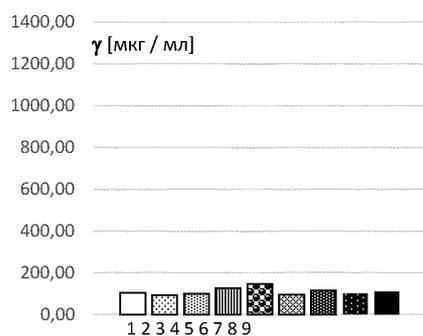
пиноцембрин (7)

Фиг. 2.7



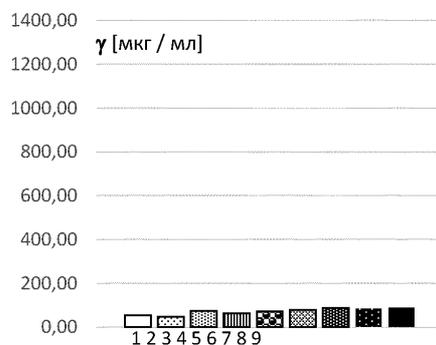
галангин (8)

Фиг. 2.8



апигенин (9)

Фиг. 2.9



кемпферол (10)

Фиг. 2.10

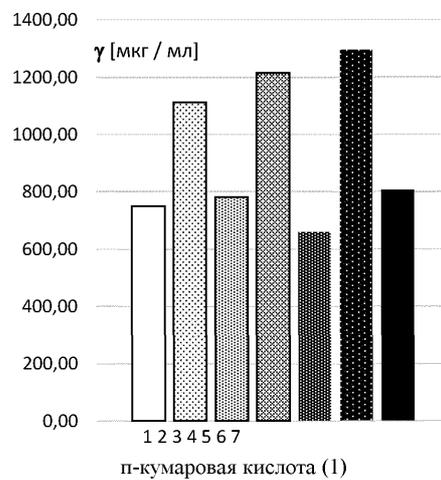
Экстракционный растворитель для фиг. 2.1-2.10:

1 - этиловый спирт,

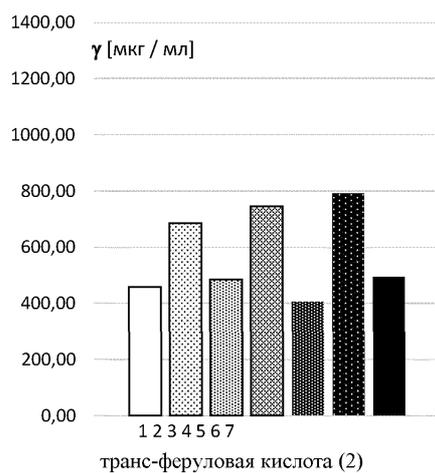
2 - этанол + 3% соевый лецитин (SL),

3 - этанол + 10% соевый лецитин (SL),

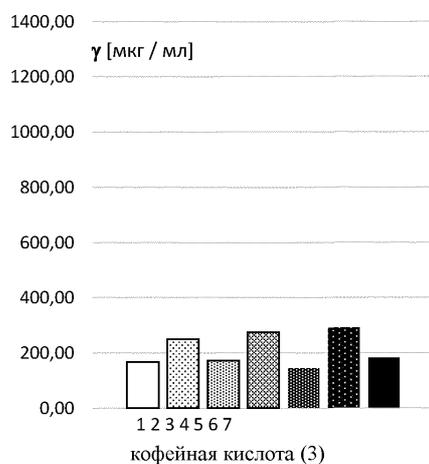
- 4 - этанол + 20% соевый лецитин (SL),
 5 - этанол + 30% соевый лецитин (SL),
 6 - этанол + 1,1% рапсовый лецитин (RL),
 7 - этанол + 4% рапсовый лецитин (RL),
 8 - этанол + 2,2% гидролизованный RL (HRL),
 9 - этанол + 7,7% гидролизованный RL (HRL).



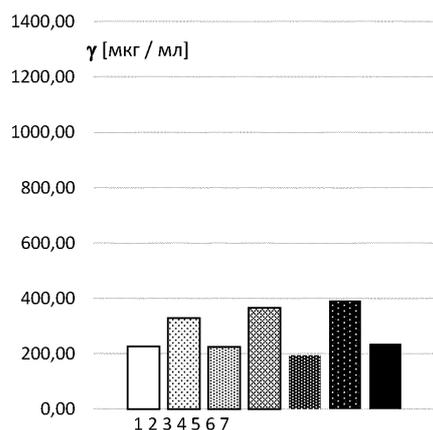
Фиг. 3.1



Фиг. 3.2

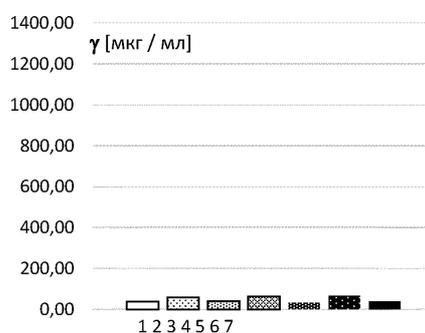


Фиг. 3.3



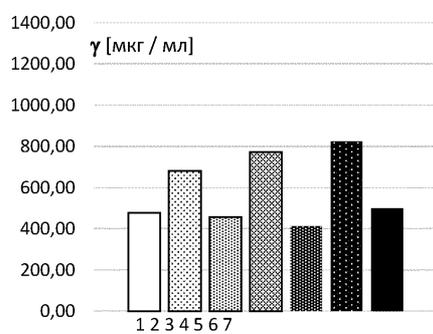
CAPE (4; 2-фенилэтил-3,4-дигидрокси-транс-циннамат)

Фиг. 3.4



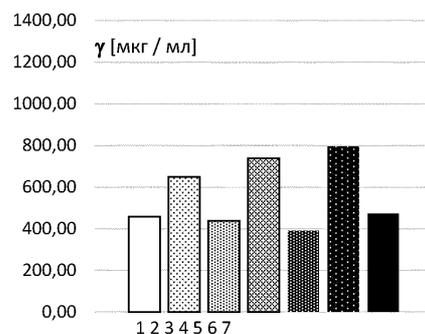
транс-коричная кислота (5)

Фиг. 3.5



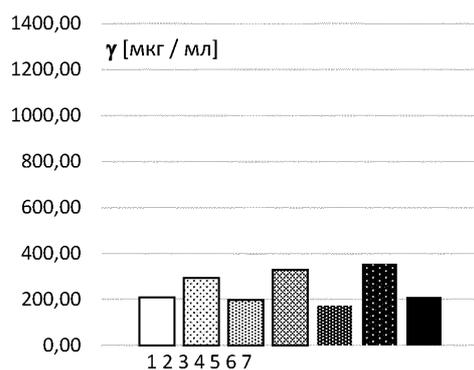
хризин (6)

Фиг. 3.6



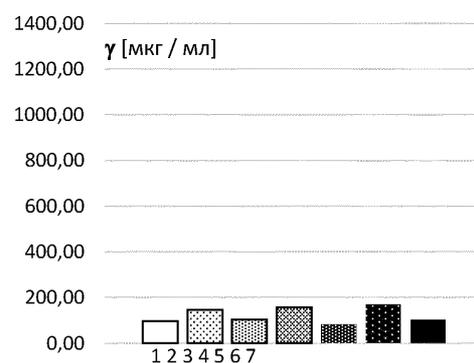
пиноцембрин (7)

Фиг. 3.7



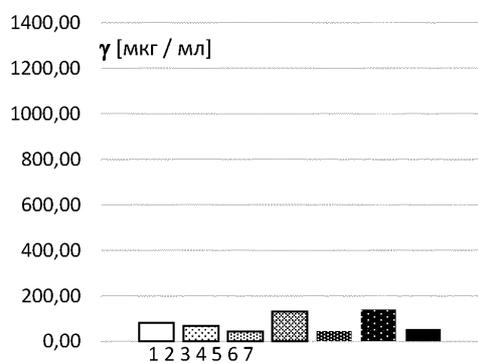
галангин (8)

Фиг. 3.8



апигенин (9)

Фиг. 3.9

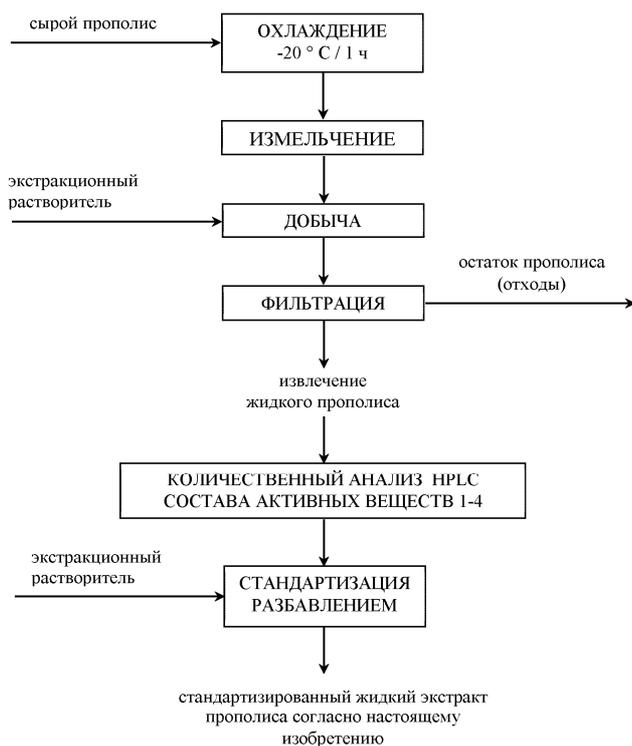


кемпферол (10)

Фиг. 3.10

Экстракционный растворитель для фиг. 3.1-3.10:

- 1 - ПЭГ 400,
- 2 - ПЭГ 400 + 3% соевый лецитин (SL),
- 3 - ПЭГ 400 + 10% соевый лецитин (SL),
- 4 - ПЭГ 400 + 1,1% рапсовый лецитин (RL),
- 5 - ПЭГ 400 + 4% рапсовый лецитин (RL),
- 6 - ПЭГ 400 + 2,2% гидролизованный RL (HRL),
- 7 - ПЭГ 400 + 7,7% гидролизованный RL (HRL).



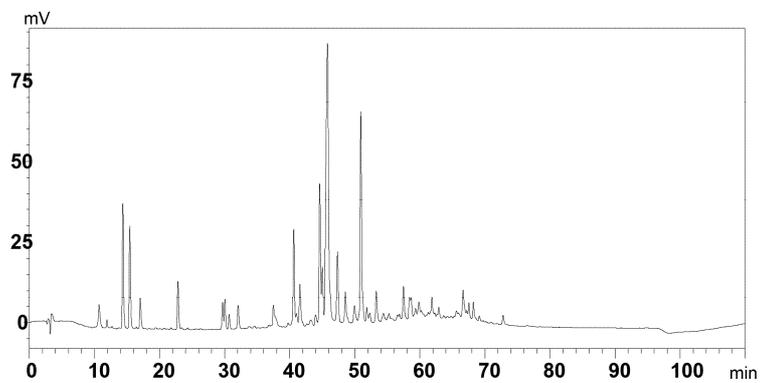
Экстракционный растворитель, определение:

A: B = 96,5-99,9 : 0,1-3,5 по весу

A = ПЭГ 200-600

B = лецитины или гидролизованные лецитины

Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2