



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 122754

(13) C2

(51) МПК

A61K 35/741 (2015.01)

A61K 38/14 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

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

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2019 10894	(72) Винахідник(и):	Капустян Антоніна Іванівна (UA), Черно Наталія Кирилівна (UA), Пукас Артем Сергійович (UA)
(22) Дата подання заявки:	04.11.2019	(73) Володілець (володільці):	ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	29.12.2020	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2007/0185012 A1, 09.08.2007 RU 2562595 C2, 10.09.2015 RU 2129010 C1, 20.04.1999 UA 94056 C2, 11.04.2011 UA 73804 U, 10.10.2012 UA 116404 U, 25.02.2017 EP 0464298 A1, 08.01.1992 EP 0861905 A2, 02.09.1998 Грицко Р.Ю. Імунокоригувальний молочний бактеріально- дріжджовий напій з високим вмістом нуклеїнових кислот для клінічного застосування у практиці сімейного лікаря // Семейная медицина, 2016. - №1 (63). – С.52-57
(41) Публікація відомостей про заяву:	12.05.2020, Бюл.№ 9		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	28.12.2020, Бюл.№ 24		

## (54) ДІЄТИЧНА ДОБАВКА "ІМУНОКОРЕКТ"

### (57) Реферат:

Винахід стосується дієтичної добавки, що містить низькомолекулярні муропептиди з молекулярною масою 700 Да і додатковий компонент, причому дієтична добавка додатково містить фракції молекулярних пептидів з молекулярними масами 300-400 Да та 1000-1500 Да, при цьому добавка містить муропептиди пробіотичного походження трьох фракцій 300-400 Да, 600-700 Да та 1000-1500 Да, при їх масовому співвідношенні у суміші (0,1-1):(0,1-1):(0,1-1) відповідно, а як додатковий компонент дієтична добавка містить мікрокристалічну целюлозу або гідроксипропілметилцелюлозу, або карбоксиметилцелюлозу, або крохмаль кукурудзяний, або крохмаль картопляний, або кальцію стеарат, або магнію стеарат, або полісорбат.

UA 122754 C2



Винахід належить до оздоровчого та лікувально-профілактичного харчування і передбачає нутритивну підтримку населення, що страждає розладами функціонування імунної системи.

Реактивне збільшення випадків захворювання серед населення, викликаних бактеріальними та вірусними збудниками, часто спровоковано пригніченням функціональної активності імунної системи. На фармакологічному ринку України та світу присутні ряд імунологічних препаратів природного, штучного або напівштучного походження. Найбільш поширеними серед природних є екстракти деяких лікарських рослин, пробіотики, інтерферон та його похідні. Високою імунологічною активністю володіють також продукти переробки дріжджів та пробіотичних бактерій, що містять відповідно такі біологічно-активні сполуки як глюкани та фрагменти пептидогліканів - низькомолекулярні муропептиди (НМЛ).

У даний час встановлено, що НМЛ (400-700 Да) володіють всіма необхідними для патоген-асоційованих молекулярних структур (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) властивостями, що виражаються в стимуляції вродженого імунітету і здатності формувати захист від мікробних інфекційних агентів у хребетних [див. Половинкина В.С. Иммуноадьювантные свойства мурамилдипептида / В.С. Половинкина, Е.Ю. Марков // Бюллетень ВХНЦ СО РАМН.- 2012.- № 1 (83).- С. 149-153; Mare A. Boudreau. Messenger Functions of the Bacterial Cell Wall-derived Muropeptides // Marc A. Boudreau, Jed F. Fisher. Shahriar Mobashery // Biochemistry, 2012, 51, 14, 2974]. НМП розпізнаються внутрішньоклітинними Nod2 подібними рецепторами організму господаря та ініціюють сигнальний каскад реакцій, що приводить до синтезу імунокомпетентними клітинами прозапальних цитокінів та активації механізмів імунологічного захисту організму. Екзогенне введення похідних НМП відтворює фізіологічні та еволюційно закріплені механізми модуляції імунної відповіді. Існує ряд фармакологічних ін'єкційних препаратів на основі похідних муропептидів, але також відомо, що низькомолекулярні муропептиди (400-700 Да) можуть долати кишечний бар'єр [див. Vavricka S.R., Musch M.W., Chang J.E. et al. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. Gastroenterology 2004; 127: 1401-1409], отже, вони є перспективними імунокоригувальними інгредієнтами пероральних форм дієтичних добавок для нутритивної підтримки населення зі зниженим імунним статусом.

Разом з тим, представляє інтерес вивчення імуотропних властивостей пероральних форм муропептидів, молекулярною масою 700-1500 Да, отриманих у результаті дезінтеграції пептидогліканів клітинних стінок пробіотичних бактерій.

Існує ряд імунокоригувальних дієтичних добавок та фармакологічних препаратів для перорального вживання на основі екстрактів ехінацеї пурпурової [див. Патент РФ на винахід № 2129010, 1999 р.], β-глюкану дріжджів [див. патент UA на корисну модель 116404 U, 2017], пробіотичних бактеріальних культур [див. патент UA на корисну модель 94056, 2011], але дані імунокоригувальні засоби вирішують поставлену задачу принципово іншим шляхом з використанням інших хімічних речовин.

Найближчою до винаходу, що заявляється, є фармакологічна композиція муропептидів з молекулярною масою 700 Да, що використовується для лікування аутоімунних та метаболічних захворювань (див. патент US 2007/0185012 A1 Glycopeptides for the treatment of ALS and other metabolic and autoimmune disorders). Для посилення фізіологічного ефекту заявлена композиція додатково може містити флавіон, такий як лютеолін та/або ізофлавіон, такий як геністеїн, та/або ізокверцитрин, та/або рутин. Дану композицію обрано прототипом.

Прототип і дієтична добавка, що заявляється, співпадають у наявності у складі засобу:

НМЛ з молекулярною масою 700 Да;  
додатковий компонент.

Але композиція за прототипом має у своєму складі муропептиди штучного походження, які синтезовано хімічним шляхом. Використання композиції передбачено виключно у якості фармакологічного засобу. Отримання муропептидів, що використовуються у даній композиції передбачає використання складних процесів хімічного синтезу та методів його контролю.

В основу винаходу поставлено задачу створити дієтичну добавку імунокоригувальної дії для парентерального вживання, яка містить у своєму складі як основний діючий компонент суміш муропептидів пробіотичного походження з молекулярними масами 300-400 Да, 600-700 Да, та 1000-1500 Да, що мають PAMPs властивості, здатні долати кишковий бар'єр та відтворювати еволюційно закріплені механізми імунної відповіді, джерелом отримання яких є пептидоглікани клітинних стінок пробіотичних культур (див. Kapustian A., Chernov N., Kolomiets I. Obtaining and characteristic of muropeptides of probiotic cultures cell walls // Food science and technology. 2018. Vol. 12, Issue 1. P. 11-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v12i1.885>).

Поставлена задача вирішена дієтичною добавкою "Імунокорект", що містить низькомолекулярні муропептиди з молекулярною масою 700 Да і додатковий компонент, тим, що вона додатково містить фракції муропептидів з молекулярними масами 300-400 Да та 1000-1500 Да, при цьому добавка містить муропептиди пробіотичного походження трьох фракцій 300-400 Да, 600-700 Да, та 1000-1500 Да при їх масовому співвідношенні у суміші (0,1-1):(0,1-1):(0,1-1) відповідно, а як додатковий компонент дієтична добавка містить мікрокристалічну целюлозу, або гідроксипропілметилцелюлозу, або карбоксиметилцелюлозу, або крохмаль кукурудзяний, або крохмаль картопляний, або кальцію стеарат, або магнію стеарат, або полісорбат, за наступним співвідношенням вказаних компонентів, мас. %:

суміш фракцій  
низькомолекулярних  
муропептидів з молекулярними  
масами 300-400 Да, 600-700 Да 5-25  
та 1000-1500 Да, при їхньому  
масовому співвідношенні (0,1-1):(0,1-1):(0,1-1)

додаткові компоненти 75-95.

Дієтична добавка "Імунокорект" додатково включає загальноприйняті у фармацевтичному виробництві компоненти: мікрокристалічну целюлозу або гідроксипропілметилцелюлозу, або карбоксиметилцелюлозу, або крохмаль кукурудзяний, або крохмаль картопляний, або кальцію стеарат, або магнію стеарат, або полісорбат.

Дієтична добавка "Імунокорект" для перорального вживання може бути у вигляді таблеток, або порошків, або капсул від білого до бежевого кольору.

Новим у винаході, що заявляється, є те, що вперше для нутритивної підтримки населення з розладами функціонування імунної системи у якості імунокоригувальної складової дієтичної добавки запропоновано використання PAMPs структур, а саме низькомолекулярних муропептидів пробіотичного походження, джерело отримання яких є природним та абсолютно безпечним для перорального вживання, а активна складова взаємодіє безпосередньо з імунокомпетентними рецепторами та сприяє формуванню каскаду імунних реакцій організму. Уперше доведено, що муропептиди молекулярною масою 1000-1500 Да проявляють імунотропну активність при парентеральному введенні, а, отже, долають кишковий бар'єр, а комбінація муропептидів з молекулярними масами 300-400 Да, 600-700 Да та 1000-1500 Да посилює імунотропний ефект.

Наявність муропептидів різних фракцій у складі гідролізату пробіотичних бактерій вивчали методом гель-хроматографії (див. графік). У складі суміші муропептидів присутні фракції молекулярною масою 1000-1500 Да, 600-700 Да та 300-400 Да у співвідношенні відповідно 1:0,5:0,5 (див. Kapustian A., Cherno N., Kolomiets I. Obtaining and characteristic of muropeptides of probiotic cultures cell walls // Food science and technology. 2018. Vol. 12, Issue 1. P. 11-19.

DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v12i1.88>).

Фізіологічну активність фракцій муропептидів досліджували в експерименті на тваринах. Дослідження проводили на безпородних білих щурах, масою тіла 200 г, формували контрольну та три дослідних групи білих щурів, по 20 тварин у кожній. Тваринам контрольної групи задавали ізотонічний розчин натрію хлориду. Тваринам усіх дослідних груп вводили муропептиди у дозі 1 мг/кг. Тваринам I дослідної групи вводили муропептиди двох фракцій з молекулярними масами 300-400 Да та 600-700 Да при масовому співвідношенні 1:1, II групи - 1000-1500 Да, III групи - суміш муропептидів, які отримували за відомою методикою. Препарат вводили внутрішньошлунково упродовж 14 діб. На 7, 14, 21 та 28 доби експерименту проводили відбір крові для гематологічних і біохімічних досліджень, визначення факторів неспецифічного захисту (див. табл. 1-3).

Застосування муропептидів різних молекулярних фракцій упродовж усього періоду експерименту та у період відновлення сприяло збільшенню концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів та лейкоцитів. У тварин III-ї дослідної групи при використанні суміші муропептидів спостерігалось вірогідне збільшення гематологічних показників, а саме, концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів та лейкоцитів, порівняно з іншими дослідними групами на 14-у добу використання. При аналізі концентрації загального білка та його фракцій було встановлено, що препарат на 14-у добу застосування у тварин дослідних груп спричинив збільшення кількості альбумінів та γ-глобулінів.

Застосування муропептидів різних молекулярних фракцій позитивно впливало на фактори неспецифічного захисту тварин, що проявлялось у підвищенні рівня фагоцитарної активності нейтрофілів (ФАН) та фагоцитарного індексу (ФІ), за незначного зниження циркулюючих імунних

комплексів (ЦІК) (див. табл. 3). Показник ФІ зростає як у тварин, яким вводили НПМ з молекулярною масою 300-700 Да, так і у тих, яким вводили НМП з молекулярною масою 1000-1500 Да, але деякі переваги у показниках неспецифічного захисту спостерігаються при введенні суміші муропептидів. Отже, має місце посилення імунотропного ефекту суміші муропептидів, порівняно з їхніми окремими фракціями.

Заявлена композиція не має істотних побічних дій, тому що активні компоненти, що входять до складу фармкомпозиції, застосовуються в малій і середній разовій ефективній дозі (див. Products of Metabolism and Processing of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Functional Ingredients / Kapustian A et al. // Food Science and Applied Biotechnology, 2018, 1(1), 54-62 <https://doi.org/10.30721/fsab2018.v1.i1>).

Приклад 1. Одержали дієтичну добавку "Імунокорект" для перорального вживання у формі капсули, як наведено вище. Компоненти брали у наступному співвідношенні, мас. %:

суміш низькомолекулярних муропептидів 3  
молекулярними масами 300-400 Да, 600-700 Да та 1000-1500 Да при співвідношенні (0,5:0,5:1) 5  
карбоксиметилцелюлоза 95.

Приклад 2-4. Здійснювали аналогічно тому, як наведено в прикладі 1, але змінювали масове співвідношення компонентів добавки. Дані наведено в таблиці 4.

Приклад 4-10. Здійснювали аналогічно тому, як наведено в прикладі 2, але змінювали допоміжний компонент добавки. Дані наведено в таблиці 4.

Приклад 10-12. Здійснювали аналогічно тому, як наведено в прикладі 2, але змінювали форму для перорального вживання добавки. Дані наведено в таблиці 4.

Приклад 13-15. Здійснювали аналогічно тому, як наведено в прикладі 2, але змінювали співвідношення муропептидів в суміші. Дані наведено в таблиці 4.

Таблиця 1

Гематологічні показники щурів при застосуванні муропептидів, n=5

Групи тварин	Гемоглобін г/л	Еритроцити Т/л	Лейкоцити Г/л
7 доба досліді			
Контрольна	96,8	6,12	9,9
I дослідна	97,4	6,16	10,08
II дослідна	97,6	6,21	10,40
III дослідна	98,2	6,36	10,79
14 доба досліді			
Контрольна	96,4	6,09	9,52
I дослідна	98,2	6,19	10,4
II дослідна	101,1	6,28	11,00
III дослідна	106,02	6,54	11,3
Після застосування			
21 доба досліді			
Контрольна	97,8	6,02	9,40
I дослідна	98,9	6,12	9,87
II дослідна	99,2	6,21	10,2
III дослідна	104,02	6,37	10,8
28 доба досліді			
Контрольна	97,7	6,11	9,81
I дослідна	98,2	6,17	10,01
II дослідна	98,4	6,20	10,12
III дослідна	100,2	6,28	10,31

Таблиця 2

Загальний білок та його фракції в сироватці крові при застосуванні муропептидів, n=5

Групи тварин	Білок загальний, г/л	Альбуміни, %	$\alpha$ -глобуліни, %	$\beta$ -глобуліни, %	$\gamma$ -глобуліни, %
7 доба, досліді					
Контрольна	68,2	43,5	17,7	19,7	18,8
I дослідна	69,8	44,7	17,3	18,36	19,4
II дослідна	73,2	44,88	17,1	18,148	19,7
III дослідна	74,2	45,5	16,2	17,9	20,2
14 доба досліді					
Контрольна	69,2	43,3	18,5	19,3	18,7
I дослідна	74,2	44,6	17,1	18,58	19,5
II дослідна	76,3	44,8	16,9	17,4	20,7
III дослідна	79,2	45,8	16,5	16,06	21,4
Після застосування					
21 доба досліді					
Контрольна	71,3	43,22	17,54	20,9	18,2
I дослідна	74,4	44,1	17,36	18,89	119,5
II дослідна	75,7	44,38	16,48	18,3	20,7
III дослідна	80,8	44,9	16,1	17,6	21,2
28 доба досліді					
Контрольна	70,2	43,8	18,5	19,78	17,8
I дослідна	72,1	44,3	18,4	18,9	18,2
II дослідна	73,7	44,6	17,86	18,5	18,8
III дослідна	74,2	45,1	17,4	17,58	19,7

Таблиця 3

Вплив муропептидів на фактори неспецифічного захисту білих щурів ( $M \pm m$ , n=6)

Групи тварин	ФАН, %	ФІ, %	ЦІК, Од/л
Контрольна	20,23	12,6	20,5
I дослідна	20,1	12,4	23,7
II дослідна	22,2	13,4	19,7
III дослідна	22,4	13,6	18,8

Таблиця 4

Характеристики дієтичної добавки "Імунокорект"

№ прикладу	Співвідношення НМП:допоміжні матеріали, г	Співвідношення муропептидів*	Допоміжний матеріал	Форма для перорального вживання	ФІ, %
1	0,05:0,95	0,5:0,5:1,0	Карбоксиметил-целюлоза	Капсула	13,6
2	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Карбоксиметил-целюлоза	Капсула	14,1
3	0,125:0,875	0,5:0,5:1,0	Карбоксиметил-целюлоза	Капсула	14,1
4	0,25:0,75	0,5:0,5:1,0	Карбоксиметил-целюлоза	Капсула	14,0
5	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Гідроксипропіл-метилцелюлозу,	Капсула	14,1

Продовження таблиці 4

6	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Крохмаль кукурудзяний	Капсула	14,1
7	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Крохмаль картопляний	Капсула	14,1
8	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Кальцію стеарат	Капсула	14,1
9	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Магнію стеарат	Капсула	14,1
10	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Полісорбат	Капсула	14,1
11	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Карбоксиметил-целюлоза	Таблетка	14,1
12	0,1:0,9	0,5:0,5:1,0	Карбоксиметил-целюлоза	Порошок	14,1
13	0,1:0,9	0,1:0,1:1,0	Карбоксиметил-целюлоза	Капсула	12,4
14	0,1:0,9	0,1:1,0:0,1	Карбоксиметил-целюлоза	Капсула	13,7
15	0,1:0,9	1,0:0,1:0,1	Карбоксиметил-целюлоза	Капсула	13,9

\*300-400: 600-700: 1000-1500 Да

### Дієтична добавка «Імунокорект»



Гель-хроматографічна крива суміші муропептидів та маркерів (I – ГМДП 695 Да, II – аспартам L-Аспартил-L-фенилаланин, 294 Да, III – гліцин 75 Да) та НМП

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 Дієтична добавка, що містить низькомолекулярні муропептиди з молекулярною масою 700 Да і додатковий компонент, яка **відрізняється** тим, що вона додатково містить фракції молекулярних пептидів з молекулярними масами 300-400 Да та 1000-1500 Да, при цьому добавка містить муропептиди пробіотичного походження трьох фракцій 300-400 Да, 600-700 Да та 1000-1500 Да, при їх масовому співвідношенні у суміші (0,1-1):(0,1-1):(0,1-1) відповідно, а як
- 10 додатковий компонент дієтична добавка містить мікрокристалічну целюлозу або гідроксипропілметилцелюлозу, або карбоксиметилцелюлозу, або крохмаль кукурудзяний, або крохмаль картопляний, або кальцію стеарат, або магнію стеарат, або полісорбат, при наступному співвідношенні вказаних компонентів, мас. %:
- |  |        |
|--|--------|
| суміш фракцій низькомолекулярних муропептидів з молекулярними масами 300-400 Да, 600-700 Да та 1000-1500 Да, при їхньому масовому співвідношенні (0,1-1):(0,1-1):(0,1-1) | 5-25   |
| додаткові компоненти   | 75-95. |

15