



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129416** (13) **C2**
(51) МПК (2025.01)

A61K 36/18 (2006.01)

A61K 127/00 (2006.01)

A61P 35/00

A61P 37/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2022 04485**

(22) Дата подання заявки: **29.11.2022**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **17.04.2025**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **19.07.2023, Бюл.№ 29**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **16.04.2025, Бюл.№ 16**

(72) Винахідник(и):

**Ковальська Надія Петрівна (UA),
Карпюк Уляна Володимирівна (UA),
Досенко Віктор Євгенович (UA),
Скрипченко Надія Василівна (UA),
Мінарченко Валентина Миколаївна (UA),
Чолак Ірина Семенівна (UA)**

(73) Володілець (володільці):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
бульв. Шевченка, 13, м. Київ, 01601 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

Солдатов Д.П. Розробка твердої лікарської
форми гепатопротекторної дії з екстрактом
листя винограду культурного: автореф. дис.
на здоб. наук. ступеня кандидата фармац.
наук: 15.00.01. Нац. фармац. універ. Харків.
2011. 24 с.

UA 147975 U, 23.06.2011

ANA MARGARIDA SILVA et al. Valorization of
Kiwiberry Leaves Recovered by Ultrasound-
Assisted Extraction for Skin Application: A
Response Surface Methodology Approach.
Antioxidants. 12.04.2022. Vol. 11. No. 763. P.
15

NO KHROMYKH et al. Phytochemical profiles,
antioxidant and antimicrobial activity of
Actinidia polygama and A. arguta fruits and
leaves. Biosystems Diversity. 02.11.2022. Vol.
30. No. 1. P. 39-45

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ СУБСТАНЦІЇ ІНГІБІТОРА ПРОТЕАСОМИ

(57) Реферат:

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до способу одержання комплексів біологічно активних речовин з рослинної сировини, зокрема біологічно активних субстанцій, які інгібують активність протеасоми.

UA 129416 C2

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до способів одержання комплексів біологічно активних речовин з рослинної сировини, зокрема рослинних екстрактів, які інгібують активність протеасоми.

Використання власного механізму руйнування білка клітини (система, опосередкована убіквітином/протеасомою) для цілеспрямованої деградації білка відкрило нову сферу створення ліків [1]. Цей новий підхід розширив цільовий простір лікарським препаратам, дозволяючи лікам модулювати білковий обмін або розпад надмірно великої кількості білків. Хоча здавалося б, що небезпечно змінювати активність цієї вирішальної системи деградації білка, інгібування протеасом добре зарекомендувало себе як раціональна стратегія при множинній мієломі [2, 3], неходжкінській лімфомі [4] та деяких інших пухлинах [5].

Види патологій, які можна буде лікувати інгібіторами протеасом, протягом останніх років значно розширилися. Особлива увага надається терапії запальних процесів, оскільки протеасоми задіяні в активації NF-κB-антиапоптотичного і протизапального регулятора експресії цитокінів, вони відіграють роль у розвитку запальних і аутоімунних захворювань. Підвищений рівень експресії протеасом пов'язаний з виразністю захворювання і спостерігається при таких аутоімунних захворюваннях, як системний червоний вовчак та ревматоїдний артрит [6].

Ряд досліджень показали, що рослинні біологічно активні речовини можуть модулювати функціональність протеасоми [7,8,9,10,11,12,13]. Наразі вивчається ефективність цілого ряду сполук рослинного походження як інгібіторів протеасом, тож існує нагальна потреба у продовженні наукових пошуків в окресленому напрямку.

Необхідно надати увагу рослинам з багатовіковим досвідом використання в народній медицині, до яких належить *Actinidia arguta* Lindl., плоди якої є джерелом фенольних сполук, вітаміну С, каротиноїдів, органічних кислот, цукрів [14]. В Україні багато сортів актинідії гострої культивують як цінні їстівні рослини. Плоди актинідії вживають при виснаженні організму і ослабленому імунітеті, хронічних і гострих захворюваннях кишки. При вирощуванні плодово-ягідних культур, акцент використання є на плодах, а їх листя, як правило, не мають застосування. Науковцями багатьох країн активно проводяться дослідження хімічного складу та біологічної активності листків *Actinidia arguta* Lindl. Відомо, що її листя накопичує поліфенольні сполуки, зокрема флавоноїди і гідроксикоричні кислоти, які є цінними біологічно активними речовинами з широким спектром біологічної активності [15,16,17].

Тому є актуальною розробка способу екстракції суми біологічно активних речовин фенольної природи з листя *Actinidia arguta* Lindl., яка культивується на території України з метою розширення сировинних джерел для створення вітчизняних ефективних фітопрепаратів з протеасомною активністю.

Відомий спосіб одержання сполук інгібіторів протеасоми за патентом US8227503B2 [19]. Зазначений спосіб здійснюють шляхом синтезу гетероциклічних сполуки, таких як саліноспорамід А. Спосіб включає взаємодію наведеної сполуки з реагентом срібла із подальшим утворенням аналогів саліноспораміду А, які включають сульфонатний ефір, карбоновий ефір або просту ефірну групу.

Незважаючи на те, що саліноспорамід А є природною речовиною, яку виробляють облигатні морські бактерії *Salinispora tropica* і *Salinispora arenicola*, які знаходяться в океанських відкладеннях, недоліками відомого способу можна вважати використання синтезу як способу одержання аналогів з протеасомною активністю, який, як відомо, супроводжується одержанням супутніх продуктів, які можуть виявляти побічні ефекти на організм людини.

Відомий спосіб одержання препаратів бортезомібу, які виявляють інгібуючу активність на протеасоми, стабілізовані борною кислотою за патентом EP 2624818 B1 [20]. Зазначений спосіб здійснюють шляхом поєднання бортезомібу, борної кислоти та гліцину у різних співвідношеннях, для вивчення стабільності бортезомібу в розчині при використанні допоміжних речовин. Бортезоміб - це модифікована дипептидилборна кислота, яка може пригнічувати протеасому в організмах. Хоча бортезоміб є сильним і ефективним інгібітором протеасоми, було виявлено кілька і часто серйозних побічних ефектів при його застосуванні, включаючи втому, нудоту, сенсорну нейропатію та побічні ефекти з боку серцево-судинної системи [18].

До недоліків способу можна віднести використання синтетичних компонентів із недостатньо високим рівнем безпеки.

Наведені способи одержання інгібіторів протеасоми можна вважати аналогами за призначенням, але їх виконують принципово іншим шляхом з використанням синтетичних компонентів і, тому вони не мають спільних ознак із способом, що заявляється.

В основу винаходу поставлена задача розробка способу одержання біологічно активної субстанції інгібітора протеасоми шляхом трикратної спиртової екстракції листя актинідії гострої, зібраних у стадію масової вегетації після цвітіння, з подальшою фільтрацією та з'єднанням

фільтратів, що дозволяє одержати субстанцію з вираженою інгібуючою активністю протеасоми, нетоксичну, без побічних ефектів, яка може бути використана як активна діюча субстанція лікарських засобів аналогічного призначення, виконаних у різних лікарських формах.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання біологічно активної субстанції інгібітора протеасоми включає трикратну екстракцію листя актинідії гострої, зібраних у стадію масової вегетації після цвітіння, 40 % спиртом при співвідношенні 1:10, при температурі 80-90 °С, протягом 30 хвилин з подальшою фільтрацією та з'єднанням отриманих фільтратів після кожної екстракції.

Як рослинну сировину вибрано листя актинідії, зібрані у стадію масової вегетації після цвітіння. Саме ця стадія вегетації даної рослинної сировини характеризується максимальним накопиченням різноманітних біологічно активних речовин (БАР) групи фенольних сполук, зокрема таких, які інгібують активність протеасоми, одержаних за заявленим способом.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Висушене подрібнене листя актинідії гострої, зібраного у стадію масової вегетації після цвітіння, завантажують у екстрактор і додають 40 % спирт, при співвідношенні його до сировини 1:10. Сировину екстрагують протягом 30 хв на водяній бані при температурі 80-90 °С. Кратність зливів дорівнює 3. Одержаний екстракт піддають фільтрації. Екстракцію здійснюють трикратно, отримані фільтрати після кожної екстракції з'єднують. В результаті здійснення заявленого способу одержують субстанцію у вигляді рідини коричневого кольору, з характерним запахом.

Ключовими факторами, за якими встановлювалися оптимальні показники для екстрагування були: вибір екстрагента, час екстракції, кратність екстракції.

Під час вибору екстрагента враховували хімічний склад сировини актинідії, який в основному є представлений поліфенольними сполуками - флавоноїдами і гідроксикоричними кислотами, а також полісахаридами. Тому як екстрагенти було використано полярні розчинники - воду очищену, етанол і водно-спиртові суміші з різним вмістом етанолу (40 %, 50 %, 70 %, 90 %).

Для отримання витяжок при проведенні даного етапу дослідження розробки способу екстракції листя актинідії використовували сировину з ступенем подрібнення 3 мм. Точну наважку сировини поміщали в круглодонну колбу місткістю 100 мл, додавали екстрагент у співвідношенні 1:10. Зразки нагрівали на водяній бані зі зворотнім холодильником протягом 30 хв. Після завершення екстракції витяжки охолоджували, фільтрували, доводили вибраним екстрагентом до початкового об'єму використаного екстрагенту у мірній колбі. В отриманих витяжках визначали вміст екстрактивних речовин і суму гідроксикоричних кислот.

В таблиці 1 наведено дані щодо вибору екстрагенту для одержання екстракту з листя актинідії гострої. Дослідження базується на визначенні кількісного вмісту екстрактивних речовин та суми гідроксикоричних кислот при екстракції з листя актинідії різними розчинниками. Отримані дані свідчать, що оптимальним екстрагентом для листя актинідії є 40 % спирт.

Таблиця 1

Екстрагент	Вміст суми похідних гідроксикоричних кислот, %	Вміст екстрактивних речовин, %
Вода очищена	0,59±0,04	22,22±0,96
40 % спирт	1,18±0,05	17,63±0,75
50 % спирт	1,15±0,03	16,65±0,79
70 % спирт	0,50±0,03	6,30±0,29
90 % спирт	0,81±0,04	10,84±0,54
96 % спирт	0,89±0,03	6,04±0,25

Вміст екстрактивних речовин у витяжках, де як екстрагент було використано воду очищену, значно вищий від вмісту їх у витяжках з водно-спиртовими екстрагентами. Це пояснюється високим виходом речовин білково-полісахаридного комплексу з сировини. При додаванні до екстрагенту спирту збільшується вихід речовин вторинного синтезу - гідроксикоричних кислот. Тому для наступних етапів розробки способу екстракції листя актинідії гострої як екстрагент було обрано 40 % спирт.

Для встановлення оптимального часу екстракції дослідження проводили вибір часу екстракції, що наведено у табл. 2. Екстрагування проводили протягом 30, 60 та 90 хв. Збільшення часу для екстракції вдвічі чи втричі не дозволили збільшити пропорційно вихід БАР з сировини, що наведено у табл. 2. Тому оптимальним часом для екстракції було вибрано 30 хв.

Таблиця 2

Час екстракції, хв	Вміст суми похідних гідроксикоричних кислот, %	Вміст екстрактивних речовин, %
30 хв	1,18±0,05	17,63±0,75
60 хв	1,27±0,04	18,55±0,72
90 хв	1,40±0,04	20,59±0,99

- Для встановлення кратності екстракції виготовляли витяжки при вибраних оптимальних умовах - екстрагент 40 % спирт у співвідношенні 1:10, час екстракції 30 хв. Після першої екстракції сировину відтискали і проводили зі шротом повторну, а потім третю вичерпну екстракцію БАР. Тривалість кожної екстракції - 30 хв. В таблиці 3 наведено результати вибору кратності екстракції. Повнота екстракції суми гідроксикоричних кислот добре досягається при дво- і трикратній екстракції сировини.

Таблиця 3

Кратність екстракції	Вміст суми похідних гідроксикоричних кислот, %	Вміст екстрактивних речовин, %
I екстракція	1,16±0,07:1	17,89±0,89
II екстракція	0,57±0,04	5,58±0,29
III екстракція	0,32±0,03	2,01±0,11

- Для завершального етапу розробки способу екстракції було отримано об'єднані сумарні екстракти після двократної та після трикратної екстракції листя актинідії, які отримували згідно обраних оптимальних параметрів екстракції та визначено у них вихід БАР (таблиця 4). Отримані результати довели, що проведення трикратної екстракції сировини дозволяє максимально ефективно вилучити з листя актинідії гідроксикоричні кислоти, які є одними з головних носіїв біологічної активності.

Таблиця 4

Об'єднання кратності	Вміст суми похідних гідроксикоричних кислот, %	Вміст екстрактивних речовин, %
I+II	0,83±0,04	23,37±1,15
I+II+III	0,62±0,03	26,67±1,00

- Отже, результати проведених досліджень щодо розробки способу екстракції суми БАР з листя актинідії показали, що оптимальним екстрагентом є 40 % спирт у співвідношенні його з сировиною 1:10, час екстракції 30 хв. Трикратна екстракція забезпечує повноту виходу БАР в отриманий екстракт.

- Інгібуючу активність протеасоми у одержаній біологічно активній субстанції підтверджували методом *in vitro*. Очищену протеасому інкубують протягом 30 хв при температурі 36 °C з біологічно активною субстанцією з листя актинідії. Порівняння ефективності проводять з інкубованою очищеною протеасомою з селективного інгібітора протеасоми кластолактацистину-β-лактоном. До досліджуваних зразків додають розчин специфічного флуорогенного субстрату сукциніл-лейцин-лейцин-валін-тирозин-7-амідо-4-метилкумарину (N-Suc-LLVT-AMC). Після закінчення інкубування вимірюють продукти флуоресценції при довжині хвилі збудження/випромінювання 360/440 нм на спектрофлуориметрі. Для побудови стандартної кривої використовують вільний 7-аміно-4-метилкумарин. Відсоток зміни хімотрипсиноподібної протеасомної активності під впливом екстракту з листя актинідії і специфічного інгібітора протеасоми кластолактацистину β-лактону наведено в таблиці 5.

Таблиця 5

Субстанція	Хімотрипсиноподібна активність
Екстракт з листя актинідії	-72±4,05 %
Кластолактацистину	-83±4,15 %

β-лактон	
----------	--

Таким чином, в результаті наших експериментів виявлено здатність екстракту з листя актинідії впливати на активність очищеної протеасоми, знижуючи її до 28,2 %. Тобто, біологічно активна субстанція з листя актинідії є інгібітором протеасоми.

5 Джерела інформації:

1. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*. 2000. 22(5):442-51.

2. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC; Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2005 Jun 16;352(24):2487-98. doi: 10.1056/NEJMoa043445. PMID: 15958804.

3. Catley L, Tai YT, Chauhan D, Anderson KC. Perspectives for combination therapy to overcome drug-resistant multiple myeloma. *Drug Resist Updat*. 2005 Aug;8(4):205-18.

4. Goy A, Younes A, McLaughlin P, Pro B, Romaguera JE, Hagemeister F, Fayad L, Dang NH, Samaniego F, Wang M, Broglio K, Samuels B, Gilles F, Sarris AH, Hart S, Trehu E, Schenkein D, Cabanillas F, Rodriguez AM. Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed

5. Dou QP, Landis-Piowar KR, Chen D, Huo C, Wan SB, Chan TH. Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology*. 2008 Oct;16(5):208-12. doi: 10.1007/s10787-008-8017-8. PMID: 18815743; PMCID: PMC3303149.

6. Wang J., Maldonado M. A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases, (англ.) // *Cellular & Molecular Immunology*. 2006. August (vol. 3, no. 4). P. 255-261.

7. Pettinari A, Amici M, Cuccioloni M, Angeletti M, Fioretti E & Eleuteri AM (2006) Effect of polyphenolic compounds on the proteolytic activities of constitutive and immuno-proteasomes. *Antioxid Redox Signal* 8, 121-129.

8. Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piowar KR & Dou QP (2005) Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 69, 1421-1432.

9. Chen D, Chen MS, Cui QC, Yang H, Dou QP (2007) Structure-proteasome-inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells. *Front Biosci* 12, 1935-1945.

10. Dou QP, Li B (1999) Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Update* 2, 215-223.

11. Landis-Piowar KR, Milacic V, Chen D, Yang H, Zhao Y, Chan TH, Yan B, Dou QP (2006) The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. *Drug Resist Update* 9, 263-273.

12. Pashevina DA, Tumanovska LV, Dosenko VE, Nagibin VS, Gurianova VL, Moibenko AA. Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes. *Pharmacol Rep*. 2011;63(4):1009-18. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70617-x.

13. Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovskaia LV, Zagorii V Iu, Moibenko A A. The influence of quercetin on the activity of purified 20S, 26S proteasome and proteasomal activity in isolated cardiomyocytes. *Biomed Khim*. Mar-Apr 2006;52(2): 138-45. DOI

14. Ferguson A.R., 'Kiwifruit cultivars: breeding and selections', *Acta Hort*. 1999, 498, 43-52.

15. Almeida D., Pinto D., J. Santos, A. F. Vinha, J. Palmeira, H. N. Ferreira, F. Rodrigues, M. B. Oliveira, 'Hardy kiwifruit leaves (*Actinidia arguta*): An extraordinary source of value added compounds for food industry', *Food Chemistry* 2018, 259, 113-121.

16. Henriques J., Falé P. L., Pacheco R., Florêncio M. H.a, Serralheiro M. L., 2017. Phenolic compounds from *Actinidia deliciosa* leaves: Caco-2 permeability, enzyme inhibitory activity and cell protein profile studies. *Journal of King Saud University-Science* 30(4), 513-518.

17. Gyoung-Deuck Kim, Jin Young Lee, Joong-Hyuck Auh, Metabolomic Screening of Anti-Inflammatory Compounds from the Leaves of *Actinidia arguta* (Hardy Kiwi) *Foods* 2019, 8, 47-57.

18. Metcalf R, Scott LM, Daniel KG, Dou QP. Proteasome inhibitor patents (2010-present). *Expert Opin Ther Pat*. 2014 Apr;24(4):369-82. doi: 10.1517/13543776.2014.877444. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24450483.

19. US Patent № US8227503B2. Proteasome inhibitors. / Macherla et al.; 24.07.2012.

20. European Patent Specification № EP 2624818 B1. Bortezomib formulations stabilised with boric acid. 05.04.2017 Bulletin 2017/14.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5 Спосіб одержання біологічно активної субстанції інгібітора протеасоми, за яким здійснюють трикратну екстракцію листя актинідії гострої, зібраного у стадію масової вегетації після цвітіння, 40 % спиртом при співвідношенні його і сировини 1:10, при температурі 80-90 °С, протягом 30 хвилин, екстракти далі фільтрують та з'єднують після кожної екстракції.