



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.29

(21) Номер заявки
201892349

(22) Дата подачи заявки
2017.05.22

(51) Int. Cl. **A61K 36/76** (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭКСТРАКТ ПОЧЕК ТОПОЛЯ, И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) **102016000053369**

(32) **2016.05.24**

(33) **IT**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/IB2017/053000**

(87) **WO 2017/203414 2017.11.30**

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

(72) Изобретатель:
**Меркати Валентино, Маттоли Луиза,
Майдекки Анна, Лугли Андреа (IT)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) J.J. Virey: "Unguento populeo riformato"
In: "Trattato compiuto di farmacia teoricae pratica
(vol. 2)", 1 January 1836 (1836-01-01), Verona,
XP055334219, pages 43-46, the whole document

Anonymous: "Honey Lemon Throat
Lozenges", Mintel Database, 1 February 2015
(2015-02-01), XP055334381, Retrieved from the
Internet: URL: http://www.gnpd.com/sinatra/recordpage/3006879/from_search/LZdtRQ83S4/?page=1 [retrieved on 2017-01-11] the whole document

WANG KAI ET AL.: "Anti-inflammatory
effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds
from poplar (*Populus canadensis*)", JOURNAL OF
ETHNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER IRELAND
LTD, IE, vol. 155, no. 1, 2 June 2014
(2014-06-02), pages 300-311, XP029009945, ISSN:
0378-8741, DOI: 10.1016/J.JEP.2014.05.037, the
whole document, abstract, page 308, right-hand
column

STÉPHANIE DUDONNÉ ET AL.: "Phenolic
Composition and Antioxidant Properties of Poplar
Bud (*Populus nigra*) Extract: Individual Antioxidant
Contribution of Phenolics and Transcriptional Effect
on Skin Aging", JOURNAL OF AGRICULTURAL
AND FOOD CHEMISTRY, vol. 59, no. 9, 11 May
2011 (2011-05-11), pages 4527-4536, XP055208075,
ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf104791t, the whole
document, pages 4527,34

Ryan Drum: "Poplar Buds, Grindelia
Buds & Fig Leaves", 27 March 2009
(2009-03-27), XP055334364, Retrieved from
the Internet: URL: <https://web.archive.org/web/20090327124300/http://www.ryandrum.com/twobudsonelaf.htm> [retrieved on 2017-01-11] the whole document

Anonymous: "Hand Cream", Mintel
Database, 1 July 2008 (2008-07-01),
XP055334163, Retrieved from the Internet: URL:
http://www.gnpd.com/sinatra/recordpage/941356/from_search/8QxEqAiyKw/?page=1 [retrieved on 2017-01-11] the whole document

WO-A1-0067767

WO -A1-2015059683

Eliana Zamboni: "Unguento al
pioppo", 19 August 2015 (2015-08-19),
XP055334200, Retrieved from the Internet:
URL: https://web.archive.org/web/20150819110104/http://www.sosrosarno.org/agricoltura-sostenibile/ite/download/19_e28111cb95524744926dd202d4f034f8.html [retrieved on 2017-01-11] the whole document

Anonymous: "Propolgemma: Propolis Spray
for Adults", Mintel Database, 1 November 2016
(2016-11-01), XP055334150, Retrieved from the
Internet: URL: http://www.gnpd.com/sinatra/recordpage/4393677/from_search/waL2IHpAMN/?page=1 [retrieved on 2017-01-11] the whole document

(57) Изобретение относится к композиции, содержащей экстракт почек тополя для применения в лечении ротоглоточной полости, мочевого аппарата, пищеварительного/выделительного аппарата, поражений кожи и бактериальных инфекций.

Изобретение относится к композиции, содержащей экстракт почек тополя, для применения в лечении ротоглоточной полости, мочевого аппарата, пищеварительного/выделительного аппарата, пораженной кожи и бактериальных инфекций.

Предшествующий уровень техники

В литературе известно, что смолистый экссудат черного тополя (*Populus nigra*) составляет базовый элемент Европейского прополиса и, в целом, пчелиного прополиса в умеренных зонах.

Прополис, известный своими многочисленными фармакологическими воздействиями, представляет собой вещество, производимое пчелами после сбора последними смолистых экссудатов (главным образом, черного тополя). В среднем, он состоит из 25-35% пчелиного воска, 5% пыльцы, 5% различных веществ, присутствующих на лапках пчел, и около 50% растительных смол.

В литературе также известны различные применения лекарственных средств на основе почек тополя.

Учитывая постоянный и растущий интерес к применению веществ естественного происхождения для лечения многочисленных заболеваний и учитывая нынешнюю привлекающую внимание опасность исчезновения пчел, важно найти продукты природного происхождения, которые могут сопоставимо сравниваться или даже быть более эффективными, чем получаемые от пчел вещества.

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения проанализировали экстракты почек тополя для того, чтобы проверить его возможное применение в терапевтических целях в качестве альтернативы прополису полностью растительного происхождения.

В отличие от прополиса, экстракты почек тополя также имеют преимущество, поскольку не содержат вещества животного происхождения и аллергенные вещества, такие как пыльца.

Авторы настоящего изобретения неожиданно нашли подтверждение тому, что в отношении Европейского прополиса экстракты почек тополя демонстрируют сравнимые или даже более высокие мукоадгезивные свойства.

Авторы настоящего изобретения впервые продемонстрировали эффективную антибактериальную активность, в частности, в отношении *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, экстрактов почек тополя, необязательно лиофилизированных, необязательно солифицированных с натуральными камедями (нанесенными на камедь).

Следовательно, объектом настоящего изобретения является композиция, содержащая следующее.

Экстракт почек тополя в процентах по массе от 0,1 до 70% и один или более фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов, ароматизаторов, консервантов для применения в лечении ротоглоточной полости, мочевого аппарата, пищеварительного/выделительного аппарата, повреждений кожи и бактериальных инфекций для применения в лечении ротоглоточной полости, мочевого аппарата, пищеварительного/выделительного аппарата, повреждений кожи и бактериальных инфекций.

Кроме того, объектом настоящего изобретения является лечение ротоглоточной полости, мочевого аппарата, пищеварительного аппарата, повреждений кожи и бактериальных инфекций путем введения смеси или композиции по изобретению субъекту, подверженному указанным нарушениям.

Подробное описание чертежей

Фиг. 1 - анализ мукоадгезии различных составов, проведенный, как описано в примере 1.

Фиг. 1A - процент мукоадгезивности композиции - разведенной (1:2,5 и 1:5) твердой композиции по примеру 4 по отношению к буккальным клеткам человека; фиг. 1B: процент мукоадгезивности композиции - разведенной (1:2,5 и 1:5) твердой композиции по примеру 3 по отношению к буккальным клеткам человека; фиг. 1C: процент мукоадгезивности композиции - не разведенной или разведенной (1:2 и 1:5) жидкой композиции по примеру 4 по отношению к буккальным клеткам человека; фиг. 1D: процент мукоадгезивности композиции - неразведенной или разведенной (1:2 и 1:5) жидкой композиции по примеру 3 по отношению к буккальным клеткам человека.

Фиг. 2 - Сопротивление мукоадгезивного слоя (полученное с различными составами по изобретению при различных разведениях и в разное время) в разное время моделированному раствору слюны (0,9% физиологический раствор NaCl).

Фиг. 2A: композиция - (разведенная 1:2,5) твердая композиция по примеру 4 в разное время (0 ч, 0,5 ч, 1 ч и 2 ч) в моделированном растворе слюны (0,9% физиологический раствор NaCl); фиг. 2B: композиция - (разведенная 1:2,5) твердая композиция по примеру 3 в разное время (время: 0 ч, 0,5 ч, 1 ч и 2 ч) в моделированном растворе слюны (0,9% физиологический раствор NaCl); фиг. 2C: композиция - (разведенная 1:2) жидкая композиция по примеру 4 в разное время (время: 0 ч, 0,5 ч, 1 ч и 2 ч) в искусственном растворе слюны.

Фиг. 3 - получение IL6 в барьерном анализе; на графиках показана защита, оказываемая композицией по изобретению на клетки, и данные выражаются в терминах Fold Over (F.O.) по сравнению с контрольным Fold Over C- = [измеренный IL-6]/[C-IL-6].

Фиг. 3A - композиция - твердая композиция по примеру 4, фиг. 3B: композиция - твердая композиция по примеру 3, фиг. 3C: композиция - жидкая композиция по примеру 4, фиг. 3D: композиция - жидкая композиция по примеру 3.

На фиг. 4 графически изображен барьерный эффект, рассчитанный для различных вариантов выполнения описанного изобретения в процентах от ингибирования высвобождения IL6.

Фиг. 4А - композиция - твердая композиция по примеру 4, фиг. 4В: композиция - твердая композиция по примеру 3, фиг. 4С: композиция - жидкая композиция по примеру 4, фиг. 4D: композиция - жидкая композиция по примеру 3.

На фиг. 5 графически изображены значения полученного в клетках IL-6 в терминах Fold Over C- во внутреннем контроле.

Фиг. 5А - композиция - твердая композиция по примеру 4, фиг. 5В: композиция - твердая композиция по примеру 3, фиг. 5С: композиция - жидкая композиция по примеру 4, фиг. 5D: композиция - жидкая композиция по примеру 3.

Фиг. 6 - антиокислительная активность экстракта почек тополя согласно изобретению по сравнению с аскорбиновой кислотой.

Фиг. 7 - ингибирующая активность бактериальной биопленки экстракта почек тополя согласно изобретению.

Подробное описание изобретения

Таким образом, объектом настоящего изобретения является композиция, включающая следующее.

Экстракт почек тополя в процентах по массе от 0,1 до 70% и один или более фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов, ароматизаторов, консервантов для применения в лечении ротоглоточной полости, мочевого аппарата, пищеварительного/выделительного аппарата, повреждений кожи и бактериальных инфекций для применения в лечении ротоглоточной полости, мочевого аппарата, пищеварительного/выделительного аппарата, повреждений кожи и бактериальных инфекций.

Согласно одному варианту выполнения изобретения композиция может содержать или состоять из:

экстракт почек тополя в процентах по массе от 0,1 до 70%,

эксципиенты в процентах по массе от 1 до 80%,

растворители в процентах по массе от 0 до 80%,

природные или лиофилизированные фруктовые соки в процентах по массе от 0 до 50%,

природные или искусственные ароматизаторы в процентах по массе от 0,05 до 2%,

эфирные масла в процентах по массе от 0,01 до 1%.

В соответствии с еще одним вариантом выполнения композиция по изобретению может содержать или состоять из:

лиофилизированный сухой экстракт почек тополя в процентах по массе от 0,5 до 10%,

эксципиенты в процентах по массе от 10-97%,

природные или искусственные ароматизаторы в процентах по массе от 0,5 до 3%,

эфирные масла в процентах по массе от 0,05 до 1%,

порошкообразные или лиофилизированные фруктовые соки и/или натуральные экстракты в процентах по массе от 0,5 до 15%,

подсластители в процентах по массе от 1 до 10%.

Под "экстрактом почек тополя" для целей настоящего изобретения подразумевается экстракт, полученный из листовых почек или преимущественно листовых почек черного тополя (*Populus nigra*).

В частности, экстракт по изобретению представляет собой экстракт нераскрытых листовых почек. Почки могут быть найдены нераскрытыми, в основном, весной, которая в Европе обычно продолжается с марта по май.

Согласно одному варианту выполнения изобретения единственное активное начало композиции представляет собой экстракт почек тополя.

В композиции в соответствии с любым из вышеописанных вариантов выполнения изобретения экстракт почек тополя может быть связан с природной камедью в соотношении экстракт:камедь в интервале от 1:2-1-20.

Композиция, как определено выше и как дополнительно проиллюстрировано в примерах ниже, может быть использована, как указано выше, для лечения заболеваний ротоглоточной полости. Такие заболевания могут быть выбраны, например, из воспаления горла, фарингита, афты, воспаления или инфекции полости рта.

В варианте выполнения изобретения, где указанная композиция применяется для лечения заболеваний пищеварительного/выделительного аппарата, заболевания могут быть выбраны из гастрита, рефлюкса, воспалительных заболеваний кишечника, синдрома раздраженного кишечника, геморроя, инфекций.

Кроме того, композиция по изобретению может использоваться для лечения заболеваний мочевых путей, таких как, например, цистит.

В одном предпочтительном варианте выполнения композиция по изобретению может быть использована для лечения бактериальных инфекций, среди которых особенно предпочтительны инфекции, по меньшей мере, из одного из *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

При лечении инфекций *Streptococcus pyogenes* композиция в соответствии с настоящим изобретением может, например, применяться для лечения фарингита, скарлатины, пиодермии или импетиго, рожи, целлюлита, некротизирующего фасцита, синдрома стрептококкового токсического шока, бактери-

мии, острой ревматической лихорадки, острого гломерулонефрита, узелковой эритемы, P.A.N.D.A.S (педиатрических аутоиммунных нейропсихиатрических расстройств, связанных со стрептококковыми инфекциями), синдрома хронической усталости (cfs) и фибромиалгии, синдрома доброкачественной фасцикуляции (bfs).

Для получения композиции по изобретению предпочтительно можно использовать водно-спиртовой экстракт почек тополя с градусами спирта от 35 до 70. В особенно предпочтительном варианте выполнения изобретения экстракт может быть лиофилизирован. Необязательно, экстракт может быть совместно лиофилизирован с натуральной камедью для того, чтобы повысить растворимость экстракта в воде и сделать сухой экстракт более легко обрабатываемым.

Однако полученные данные и те, которые можно увидеть в экспериментальном разделе, демонстрируют, что совместная лиофилизация (носитель) с натуральной камедью увеличивает мукоадгезивные и защитные характеристики экстракта, что делает особенно эффективными композиции по изобретению, содержащие экстракт, нанесенный на камедь.

В частности, экстракт почек тополя может быть экстрактом, получаемым способом, включающим следующие стадии:

- a) приготовление водно-спиртового экстракта почек тополя путем экстракции 85° этанолом,
- b) приготовление водно-спиртового экстракта почек тополя путем экстракции 13° этанолом,
- c) получение мультифракционного спиртового экстракта, путем смешивания экстрактов, полученных в a) и b),
- d) декантирование и/или центрифугирование и фильтрование указанного спиртового экстракта (c), сбор супернатанта,
- e) отфильтрованный супернатант, полученный в d), подвергают концентрированию и лиофилизации и, необязательно,
- f) в отфильтрованный супернатант, полученный в d), добавляют натуральную камедь (выбранную из смол, указанных ниже в описании, или их комбинаций, в частности, добавляют аравийскую камедь) и затем подвергают концентрированию и лиофилизации.

В частности, экстракты в a) и b) могут быть получены как путем экстракции перколятным расщеплением с движением единственного экстракционного растворителя, так и экстракцией в экстракторе, снабженном лопастной мешалкой, и перемещением как растворителя, так и почек. Экстракцию можно проводить при температуре, составляющей от 35 до 55°C, например, при температуре, составляющей 40-50°C (крайние точки включены), в частности, при температуре около 40°C или 50°C.

Экстракцию можно проводить в течение времени от 4 до 12 часов, например, около 8 часов.

Экстракты, приготовленные в a) и b), смешиваются, как на стадии c., предпочтительно в соотношении 50:50, но могут быть смешаны также в соотношении 35:65, 40:60, 45:55, 55:45, 60:40, 65:35. Смешивание проводят путем постепенного добавления (скорость добавления: от 15 до 20 л/мин) 13° спиртового экстракта в 85° спиртовом экстракте, но также возможно обратное добавление. Смешивание проводят при температуре 20±5°C.

Мультифракционный экстракт, полученный на стадии c, подвергают очистке путем декантации на контейнерах, снабженных коническим дном, в течение как минимум 72 часов. По истечении указанных часов экстракт выливают и фильтруют на целлюлозном фильтре. Такая фильтрация может быть выполнена, например, на панельном фильтре с отсечением от 0,5 до 50 мкм (крайние точки включены) на единственной стадии или на нескольких последовательных стадиях, например, с отсечением 0,5 мкм, 15 мкм или с отсечением 30 мкм или даже больше.

В конце фильтрации регулируют спиртовой градус и доводят до 50±15° градусов спирта.

В качестве альтернативы декантированию экстракт можно отделить центрифугированием на вертикальной центрифуге с подачей при скорости потока от 5 до 20 л/мин.

Экстракт, очищенный как в d), можно использовать как есть в виде мультифракционного спиртового экстракта.

Экстракт, очищенный как в d), подвергают процессу концентрирования и лиофилизации, как в e), для получения лиофилизованного экстракта, который может быть использован для твердых составов.

Экстракт, очищенный как в d), с добавлением аравийской камеди или натуральной камеди, подвергается концентрированию и лиофилизации, как в f), для получения лиофилизованного экстракта, нанесенного на аравийскую камедь, который может быть использован для твердых составов. Аравийскую камедь или одну или более натуральных камедей используют в таком количестве, чтобы получить процентное содержание 10-20% на твердом веществе.

Диаграмма 1
Блок-схема спиртового мультифракционного экстракта почек тополя

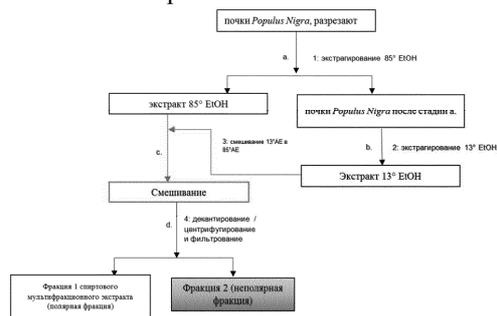


Диаграмма 2
Блок-схема лиофилизированного мультифракционного экстракта почек тополя

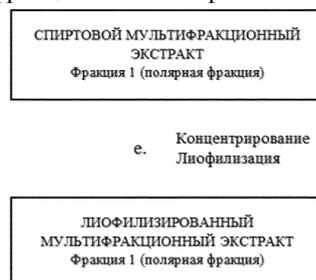
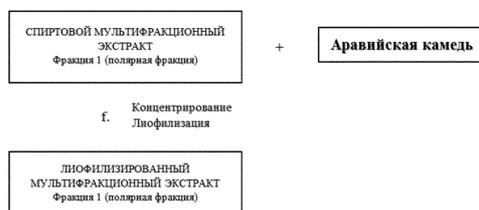


Диаграмма 3
Блок-схема лиофилизированного мультифракционного экстракта почек тополя, нанесенного на аравийскую камедь (или одну или более природных камедей, как указано ниже)



Экстракт, полученный в соответствии с вышеописанным способом, характеризуется следующей композицией.

	Спиртовой мультифракционный экстракт почек тополя (Единица измерения: мг/100мл)
Общее содержание смол	270
Летучие терпены	17,2
Общее содержание флавоноидов	170,6
Пиноцембрин	73,40
Галангин	61,4
Таннины	13,5
Другие ФЕНОЛЫ (общее)	21,9
Органические кислоты	83,9
>20кДа полисахариды	64,5
Лигнины	17,9
Салицилаты	28,1
Минералы	153

Значения приведены средние по анализам различных экстрактов в соответствии с вышеописанной методологией.

Согласно одному варианту выполнения изобретения экстракт почек тополя в любой форме, определенной выше, может находиться в процентном отношении от 0,3 до 45 мас. %.

Например, композиция в жидкой форме может быть представлена в соответствии со следующими примерами.

Пример жидкой композиции 1.

компонент	%мас.
ЭКСТРАКТ ПОЧЕК ТОПОЛЯ	0,70
КСАНТАНОВАЯ КАМЕДЬ	1,00
ВОДА	55,40
ПЕРСИКОВЫЙ АРОМАТИЗАТОР	0,40
ЛИМОННЫЙ АРОМАТИЗАТОР	0,10
ОСВЕТЛЕННЫЙ СОК ЛИМОНА	1,40
СЪЕДОБНЫЙ РАСТИТЕЛЬНЫЙ ГЛИЦЕРИН, в кг	15,00
АПЕЛЬСИНОВЫЙ СОК	26,00
ОБЩ	100,00

Пример жидкой композиции 2.

компонент	%мас.
ЭКСТРАКТ ПОЧЕК ТОПОЛЯ	1,00
ГУАРОВАЯ КАМЕДЬ	1,00
ВОДА	55,10
ПЕРСИКОВЫЙ АРОМАТИЗАТОР	0,40
ЛИМОННЫЙ АРОМАТИЗАТОР	0,10
ОСВЕТЛЕННЫЙ СОК ЛИМОНА	1,40
СЪЕДОБНЫЙ РАСТИТЕЛЬНЫЙ ГЛИЦЕРИН, в кг	15,00
АПЕЛЬСИНОВЫЙ СОК	26,00
ОБЩ	100,00

Пример жидкой композиции 3 (сильнодействующий спрей).

компонент	%мас.
62,7° СПИРТОВОЙ ЭКСТРАКТ ПОЧЕК ТОПОЛЯ	39,76
ДЕИОНИЗИРОВАННАЯ ВОДА	3,92
РАСТИТЕЛЬНЫЙ ГЛИЦЕРИН	55,70
ЭФИРНОЕ МАСЛО ЛИМОНА	0,01
ЭФИРНОЕ МАСЛО СЛАДКОГО АПЕЛЬСИНА	0,01
ЦИТРУСОВЫЙ НАТУРАЛЬНЫЙ АРОМАТИЗАТОР	0,60
ОБЩ	100,00

Пример жидкой композиции 4 (бесспиртовой спрей).

компонент	%мас.
ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЙ ЭКСТРАКТ ПОЧЕК ТОПОЛЯ	0,55
АРАВИЙСКАЯ КАМЕДЬ	4,95
ВОДА	51,30
ВИШНЕВЫЙ АРОМАТИЗАТОР	0,20
КЛУБНИЧНЫЙ АРОМАТИЗАТОР	0,60
ОСВЕТЛЕННЫЙ СОК ЛИМОНА	1,40
СЪЕДОБНЫЙ РАСТИТЕЛЬНЫЙ ГЛИЦЕРИН, в кг	35,00
ОСВЕТЛЕННЫЙ ЯБЛОЧНЫЙ СОК. КОНЦ 70VX	6,00
ОБЩ	100,00

Пример твердой композиции 1.

компонент	%мас.
Лиофилизированный экстракт почек тополя	5,00
Маннит	46,14
Камедь тары	6,56
Инулин	38,60
Лиофилизированный сок малины	0,40
Лиофилизированный сок персика	2,50
Лимонный натуральный ароматизатор	0,80
Вишневый натуральный ароматизатор	1
Лиофилизированный экстракт мальвы	0,8
Общее	100,00

Пример твердой композиции 2.

компонент	%мас.
Лиофилизированный экстракт почек тополя	10,00
Сорбит	46,14
Гуаровая камедь	1,56
Инулин	15,00
Лиофилизированный сок лимона	0,40
Лиофилизированный сок апельсина	25,00
Лимонный натуральный ароматизатор	0,80
Малиновый натуральный ароматизатор	1,10
Лиофилизированный экстракт мальвы	0,8
Общее	100,00

Пример твердой композиции 3 (таблетки для взрослых).

компонент	%мас.
Лиофилизированный экстракт почек тополя	1,08
Коричневый сахар	71,5
Аравийская камедь	10,82
Мёд	3
Экстракт лайма (дерево)	1,5
Лиофилизированный сок апельсина	10,5
Апельсиновый ароматизатор	1,5
Лимон ЕО	0,1
Общее	100

Пример твердой композиции 4 (детские таблетки).

компонент	%мас.
Лиофилизированный экстракт почек тополя	1,14
Коричневый сахар	83,5
Аравийская камедь	6,56
Инулин	1,6
Лиофилизированный сок клубники	2,4
Лиофилизированный сок бузины	2
Клубничный натуральный ароматизатор	1
Вишневый натуральный ароматизатор	1
Лиофилизированный экстракт лайма (дерево)	0,8
Общее	100,00

Композиция по изобретению может быть, например, в виде порошка, таблетки, капсулы, твердого или мягкого желатина, сиропа, спрея, суспензии.

Следовательно, можно использовать один или более из фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов, ароматизаторов, консервантов, известных специалисту в данной области.

В широком смысле, когда ее изготавливают в жидкой форме, композиция будет содержать в качестве активного начала экстракт почек тополя в любом варианте выполнения изобретения, описанном в настоящем документе, и один или более эксципиентов, растворителей, ароматизаторов, консервантов и т.д., известных специалисту в данной области техники. В качестве неограничивающего примера в качестве эксципиентов можно использовать одну или более натуральных камедей, таких как, например, аравийская камедь, ксантановая камедь, гуаровая камедь, камедь тара или их смеси; природные и синтетические полиспирты, такие как, например, сахароза, маннит, сорбит, ксилит или их смеси; целлюлозу и производные целлюлозы, такие как, например, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или их смеси; синтетические полимеры, такие как, например, поливинилпирролидон, полиметакрилаты или их смеси; мальтодекстрины, инулин и/или циклодекстрины.

В качестве растворителей всегда в качестве неограничивающего примера можно использовать этанол, изопропанол, глицерин, пропиленгликоль или их смеси.

Могут также использоваться натуральные или лиофилизированные фруктовые соки, например, яблочный, грушевый, апельсиновый, лимонный, малиновый, черничный сок или их смеси; натуральные или искусственные ароматизаторы, такие как, например, клубничный, лимонный, апельсиновый, малиновый, персиковый, вишневый, ягодное ассорти, апельсиново-мандариновый ароматизатор или их смеси; эфирные масла (Е.О.), такие как, например, лимонное, апельсиновое, мятное, эвкалиптовое эфирное масло или их смеси.

Вообще, при изготовлении в твердой форме композиция будет содержать в качестве активного начала экстракт почек тополя в любом варианте выполнения изобретения, описанном в настоящем документе, и один или более эксципиентов, растворителей, ароматизаторов, консервантов и т.д., известных специалисту в данной области техники. В качестве неограничивающего примера в качестве эксципиентов можно использовать один или более сахаров, таких как, например, сахароза, маннит, сорбит, ксилит

или их смеси; целлюлозу и производные целлюлозы, такие как, например, микрокристаллическая целлюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза или их смеси; мальтодекстрины, циклодекстрины и/или инулин.

Могут быть использованы один или более крахмалов и производных крахмала, такие как, например, рисовый крахмал, картофельный крахмал, кукурузный крахмал, прежелатинизированный крахмал или их смеси; смазывающие вещества, такие как, например, стеариновая кислота, стеарат магния, бегенат глицерина или их смеси; натуральные и синтетические ароматизаторы, такие как, например, клубничный, лимонный, апельсиновый, малиновый, персиковый, вишневый ароматизатор, ароматизатор ягодное ассорти или их смеси; эфирные масла, такие как, например, лимонное, апельсиновое, мятное эвкалиптовое эфирное масло или их смеси; лиофилизированные фруктовые соки, такие как яблочный, грушевый, апельсиновый, лимонный, малиновый, черничный, клубничный, бузиновый сок или их смеси; порошковые или лиофилизированные природные экстракты лайма (дерева), мальвы, алоэ, алтея или их смесей; подсластители, такие как, например, мед, сахара, аспартам, цикламаты, ацесульфам К, экстракты стевии, сукралоза или их смеси.

В любом месте описания и в формуле изобретения термин "содержащий" может быть заменен термином "состоящий из" или "изготовленный из".

Следующие примеры приведены для дальнейшего пояснения изобретения, но не для целей ограничения.

Примеры

1. Анализ мукоадгезии.

Хороший мукоадгезивный эффект является требованием первостепенной важности так, чтобы продукт мог оставаться в предполагаемом месте действия (фарингальная слизистая оболочка) и механически выполнять свои защитные и лечебные функции, как уже объяснялось выше в описании. Основная цель этого анализа состоит в том, чтобы оценить адгезию композиции по изобретению *in vitro* в разных составах на подходящей модели клеток, предусматривающей использование буккальных клеток. Вторая цель анализа состоит в том, чтобы определить устойчивость к биоадгезии во времени по отношению к потоку искусственного раствора слюны. Мукоадгезию композиции по изобретению в разных составах определяли путем оценки способности продукта прилипать к клеткам, ингибируя лектин (белок с высоким сродством к остаткам глюкозида и маннозида), связанный с мембранными гликопротеинами. Степень мукоадгезии измеряется колориметрической реакцией, позволяющей количественно определять сайты на гликопротеинах, не занятые лектином, а занятые мукоадгезивным продуктом. Колориметрическая реакция возможна благодаря особой системе маркировки лектинов, показанной на следующей диаграмме:



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

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

Продукт наносят после разбавления, принимая во внимание тот факт, что в реальном использовании сразу после доставки происходит смешение с слюной, присутствующей в ротоглоточной полости. На следующих графиках представлены результаты, полученные с различными образцами композиции в соответствии с изобретением в различных составах.

Таблица 1

Процент мукоадгезии продукта в форме перорально растворяющихся таблеток в соответствии с примером (твердая композиция по примеру 3), разведенных 1:2,5 по отношению к буккальным клеткам человека

Образцы	Разведенный 1:2,5	Разведенный 1:5
A	69.5	55.3
B	71.4	58.8
C	65.6	52.7
Среднее \pm S.D. (%)	68.8 \pm 3.0	55.6 \pm 1.8

Разведение 1:2,5 против 1:5 $p < 0.01$.

Таблица 2

Процент мукоадгезии продукта - твердой композиции по примеру 4, разведенной 1:2,5 и 1:5 по отношению к буккальным клеткам человека

Образцы	Разведенный 1:2,5	Разведенный 1:5
A	63.8	48.5
B	57.7	40.6
C	66.4	52.3
Среднее \pm S.D.	62.6 \pm 4.5	47.1 \pm 3.5

Разведение 1:2,5 против 1:5 $p < 0.01$.

Таблица 3

Процент мукоадгезии продукта - жидкая композиция по примеру 4, неразведенная или разведенная (1:2 и 1:5) по отношению к буккальным клеткам человека

Образцы	Неразведенный	Разведенный 1:2	Разведенный 1:5
A	74.7	64.2	58.3
B	82.4	73.4	56.6
C	71.8	61.7	48.8
Среднее \pm S.D. (%)	76.3 \pm 5.4	66.4 \pm 6.1	54.6 \pm 5.1

Неразведенный против разведенный 1:2 $p > 0.05$. Неразведенный против 1:5 $p < 0.05$; разведенный 1:2 против разведенный 1:5 $p > 0.05$.

Таблица 4

Процент мукоадгезии продукта - жидкая композиция по примеру 3, неразведенная или разведенная (1:2 и 1:5) по отношению к буккальным клеткам человека

Образцы	Неразведенный	Разведенный 1:2	Разведенный 1:5
A	75.6	61.6	53.6
B	73.8	64.8	49.7
C	70.3	58.7	51.5
Среднее \pm S.D. (%)	73.2 \pm 2.7	61.7 \pm 3.1	51.6 \pm 2.0

Неразведенный против разведенный 1:2 $p < 0.01$; разведенный 1:2 против разведенный 1:5 $p < 0.01$.

Во второй фазе эксперимента способность композиции сохранять сцепление со слизистой оболочкой во времени оценивали, подвергая систему потоку искусственной слюны 2 мл/мин, приготовленной из изотонического водного раствора, содержащего фосфатный буфер с pH 7 и 0,5% муцина. Полученные результаты выявили интересную способность продукта оставаться биоадгезированным на слизистых оболочках в течение первого часа применения.

Сопротивление мукоадгезивного слоя, полученного с использованием твердой композиции по примеру 3, разведенной 1:2,5, в разное время, 0,5 ч 1 ч и 2 ч по отношению к моделированному раствору слюны (0,9% физиологического раствора NaCl) указано в табл. 5 ниже.

Образцы	0 Часов	0.5 Часов	1 Час	2 Часа
A	69.5	63.4	54.7	43.3
B	71.4	55.8	48.8	34.8
C	65.6	52.3	47.5	40.2
Среднее \pm S.D. (%)	68.8 \pm 3.0	57.2 \pm 5.6	50.3 \pm 3.8	39.4 \pm 4.3

Время 0 часов по отношению ко времени 0,5 часа $p < 0,05$; время 0,5 часа по отношению ко времени 1 час $p > 0,05$.

Время 2 часа по отношению ко времени 1 час $p < 0,05$.

Таблица 6

Сопротивление мукоадгезивного слоя, полученного с композицией таблеток для детей формула 150728/1, разведенных 1:2,5, в разное время, 0,5 ч 1 ч и 2 ч по отношению к моделированному раствору слюны (0,9% физиологический раствор NaCl)

Образцы	0 Часов	0.5 Часов	1 Час	2 Часа
A	63.8	58.5	52.3	35.5
B	57.7	52.8	47.9	31.6
C	66.4	62.2	53.5	38.2
Среднее \pm S.D. (%)	62.6 \pm 4.5	57.8 \pm 4.7	51.2 \pm 2.9	35.1 \pm 3.3

Время 0 часов по отношению ко времени 0,5 часа $p > 0,05$; время 0,5 часа по отношению ко времени 1 час $p < 0,05$.

Время 2 часа по отношению ко времени 1 час $p < 0,01$.

Таблица 7

Сопротивление мукоадгезивного слоя, полученного с жидкой композицией по примеру 4, разведенной 1:2, в разное время (0,5-2 ч) по отношению к искусственному раствору слюны

Образцы	0 Часов	0.5 Часов	1 Час	2 Часа
A	64.2	63.5	55.6	47.2
B	73.3	68.9	52.8	43.7
C	61.7	58.4	46.3	38.5
Среднее \pm S.D. (%)	66.4 \pm 6.1	63.6 \pm 5.3	51.6 \pm 4.8	43.1 \pm 4.4

Время 0 часов по отношению ко времени 0,5 часа $p > 0,05$; время 0,5 часа по отношению ко времени 1 час $p < 0,05$.

Время 1 час по отношению ко времени 0 часов $p < 0,01$; время 2 часа по отношению ко времени 1 час $p > 0,05$.

Таблица 8

Сопротивление мукоадгезивного слоя, полученного с помощью продукта в виде жидкой композиция по примеру 3, разведенной 1:2, в разное время (0,5-2 ч) по отношению к искусственному раствору слюны

Образцы	0 Часов	0.5 Часов	1 Час	2 Часа
A	61.6	55.3	50.5	45.2
B	64.8	51.8	48.3	40.6
C	58.7	47.4	41.6	38.5
Среднее \pm S.D. (%)	61.7 \pm 3.1	51.5 \pm 4.0	46.8 \pm 4.7	41.4 \pm 3.4

Время 0 часов по отношению ко времени 0,5 часа $p < 0,05$; время 0,5 часа по отношению ко времени 1 час $p > 0,05$.

Время 1 час по отношению ко времени 0 часов $p = 0,01$; время 2 часа по отношению ко времени 1 час $p > 0,05$.

Результаты, полученные в этом эксперименте, демонстрируют, что различные составы композиции по изобретению обладают высокой способностью мукоадгезивности по отношению к буккальным клеткам. Кроме того, оценка устойчивости мукоадгезивно-защитного слоя по отношению к потоку искусственного раствора слюны позволила установить способность поддерживать хорошую мукоадгезию в течение первого часа применения.

В свете полученных результатов можно утверждать, что композиция по изобретению, демонстрирующая хорошую, устойчивую мукоадгезивность, может играть реальную защитную роль на орофарингеальную слизистую мембрану.

2. Барьерный анализ.

Целью анализа является демонстрация механизма действия композиции по изобретению путем анализа ее пленкообразующей и защитной способности по сравнению с известным раздражающим агентом: используемым агентом является липополисахаридная (LPS) мембрана, классическая модель воспалительной индукции. Указанный анализ нацелен на то, чтобы подчеркнуть эффективную способность продукта ограничить контакт между слизистой оболочкой и внешними раздражающими агентами.

Выбранный раздражающий агент был выделен из клеточной мембраны *Escherichia coli*. Размеры LPS таковы, что позволяют рассматривать барьер как эффективный для защиты слизистой оболочки от пыли, смога, пыльцы и других веществ, вызывающих раздражение, и, следовательно, от возникновения различных патологий, отягощающих эту особую и деликатную среду.

Анализируя экспериментальный протокол более подробно, способность образца действовать в качестве барьера оценивается путем измерения продуцирования IL6, что является следствием контакта между слоем клеток (фибробластов) и LPS. Экспериментальная система обеспечивает использование специальных трансвелл-лунок, снабженных покрытой коллагеном полупроницаемой мембраной, которая предотвращает прямой контакт между клетками, нанесенными на дно, и образцом, стратифицированным на нависающей полупроницаемой мембране, которая представляет собой единственный коммуникационный маршрут между двумя частями лунки. LPS инокулируется в пространство над образцом, в результате чего пересечение мембраны будет тем труднее, чем больше барьерный эффект, создаваемый самим образцом. Поэтому количественная оценка интерлейкинов, полученных при +24 ч от добавления LPS, дает прямое доказательство барьерного эффекта, оказываемого анализируемым образцом. Ингибирование IL6 является прямым измерением барьерного эффекта.

Барьерный эффект (BE) выражается в процентах от уменьшения высвобождения IL-6 и получается путем сравнения со значением, полученным из положительного контроля (C+), т.е. из клеток, обработанных только LPS в отсутствие образца.

$$\% BE = \% \text{ ингибирования полученного IL-6 (пг/мл)}$$

Результаты, полученные в эксперименте, проведенном в трех повторах с различными вариантами выполнения композиции по изобретению, представлены в следующих таблицах. Из-за присутствия каменей в высоких концентрациях барьерный анализ проводили как на разведенном продукте 1:2,5, так и

на разведенном продукте 1:5. Сначала - секретируемые клетками пикограммы IL6 после введения LPS, а в следующей таблице сообщается % ингибирования по сравнению с положительным контролем.

Таблица 9

Продуцирование IL6 в барьерном анализе с составом композиции по изобретению в таблетках для взрослых (твердая композиция по примеру 3) в соответствии с примерами, представленными в разделе подробного описания изобретения.

Образец	IL-6 (пг/мкл)	Среднее	Стд.	Откл.
Таблетки для взрослых	1:5+LPS 1	330.41		
	1:5+LPS 2	357.924	343.814	13.77
	1:5+LPS 3	343.109		
	1:2.5+LPS 1	314.184		
	1:2.5+LPS 2	339.581	329.234	13.336
	1:2.5+LPS 3	333.938		
	1:5+LPS 1	281.027		
	1:5+LPS 2	328.999	308.54	24.752
	1:5+LPS 3	315.595		
	1:2.5+LPS 1	326.883		
	1:2.5+LPS 2	362.862	350.399	20.378
	1:2.5+LPS 3	361.451		
	Контроль +1 (LPS)	638.705		
	Контроль +2 (LPS)	689.499	675.86	32.554
	Контроль +3 (LPS)	699.376		
	Контроль -1 (MEM)	62.328		
	Контроль -2 (MEM)	63.033	64.679	3.48
	Контроль -3 (MEM)	68.677		

Из приведенных результатов видно, что очевидно заметное снижение концентрации IL-6, полученное в экспериментах, в которых присутствует анализируемый продукт при обоих разведениях, с проявлением барьерного действия, продолжающегося во времени, эффективного также в случае частичной потери продукта из-за неспособности медленно растворять таблетку во рту.

Значение IL-6, равное 64,6 пг/мкл, обнаруженное для отрицательного контроля, усимилируется с нормальным базальным значением, то есть с невоспалительным состоянием. График на фиг. 2А ясно показывает защиту, оказываемую продуктом на клетки: данные выражаются в терминах Fold Over (F.O.) по сравнению с контролем С-.

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

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

Таким образом, применяя формулу, получают значение снижения продуцирования IL-6 в присутствии анализируемого образца, которое составляет 54% при разведении 1:5 и 48% при разведении 1:2,5 по сравнению с положительным контролем, описанным в табл. 10, для композиции по изобретению, выполненной в форме таблеток для взрослых (твердая композиция по примеру 3), как описано в разделе подробного описания выше.

Барьерный эффект

Образец	Ингибирование высвобождения IL6 %	Среднее	Стд.	Откл.
Таблетки для взрослых	1:5+LPS 1	58.419		
	1:5+LPS 2	51.321	54.348	3.662
	1:5+LPS 3	53.305		
	1:2.5+LPS 1	51.635		
	1:2.5+LPS 2	46.311	48.155	3.015
	1:2.5+LPS 3	46.52		
	Контроль +1 (LPS)	0		
	Контроль +2 (LPS)	0	0	0
	Контроль +3 (LPS)	0		

Таблица 11

Продуцирование ПЛ6 в барьерном анализе с составом композиции по изобретению в таблетках для детей (твердая композиция по примеру 4) в соответствии с примерами, представленными в разделе подробного описания изобретения.

Образец	ПЛ-6 (нг/мкл)	Среднее	Стд.	Откл.
Таблетки 1:5+ЛПС 1	330.41			
для детей 1:5+ЛПС 2	357.924	343.814		13.77
1:5+ЛПС 3	343.109			
1:2.5+ЛПС 1	314.184			
1:2.5+ЛПС 2	339.581	329.234		13.336
1:2.5+ЛПС 3	333.938			
КОНТРОЛЬ + 1 (ЛПС)	638.705			
КОНТРОЛЬ + 2 (ЛПС)	689.499	675.86		32.554
КОНТРОЛЬ + 3 (ЛПС)	699.376			
КОНТРОЛЬ - 1 (МЕМ)	62.328			
КОНТРОЛЬ - 2 (МЕМ)	63.033	64.679		3.48
КОНТРОЛЬ - 3 (МЕМ)	68.677			

Из средних значений ПЛ-6, измеренных в барьерном анализе и в положительном контроле, рассчитывается процент снижения высвобождения ПЛ-6: $100 - [(ПЛ-ОБРАЗЕЦ) / ПЛ-6С+] \times 100$.

Таким образом, применяя формулу, получают значение снижения продуцирования ПЛ-6 в присутствии анализируемого образца, которое составляет 49% при разведении 1:5 и 51% при разведении 1:2,5 по сравнению с положительным контролем, приведенное в табл. 12 для композиции по изобретению, изготовленной в виде таблеток для детей (твердая композиция по примеру 4), как описано в разделе подробного описания выше.

Барьерный эффект

Образец	Ингибирование высвобождения ПЛ 6 %	Среднее	Стд.	Откл.
Таблетки 1:5+ЛПС 1	51.113			
для Детей 1:5+ЛПС 2	47.042	49.129		2.037
1:5+ЛПС 3	49.234			
1:2.5+ЛПС 1	53.513			
1:2.5+ЛПС 2	49.756	51.287		1.973
1:2.5+ЛПС 3	50.591			
Контроль +1 (ЛПС)	0			
Контроль +2 (ЛПС)	0	0		0
Контроль +3 (ЛПС)	0			

Значения округлены до 3-десятичного знака.

Таблица 13

Продуцирование ПЛ6 в барьерном анализе с составом композиции по изобретению в виде сильнодействующего спрея (жидкая композиция по примеру 3) в соответствии с примерами, представленными в разделе подробного описания изобретения.

Образец	ПЛ-6 (нг/мкл)	Среднее	DS
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + ЛПС 1	392.915		
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + ЛПС 2	409.888	413.188	22.109
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + ЛПС 3	436.761		
КОНТРОЛЬ + 1 (ЛПС)	639.728		
КОНТРОЛЬ + 2 (ЛПС)	690.646	676.973	32.634
КОНТРОЛЬ + 3 (ЛПС)	700.547		
КОНТРОЛЬ - 1 (МЕМ)	61.945		
КОНТРОЛЬ - 2 (МЕМ)	62.652	64.303	3.489
КОНТРОЛЬ - 3 (МЕМ)	68.310		

Из средних значений ПЛ-6, измеренных в барьерном анализе и в положительном контроле, рассчитывается процент снижения высвобождения ПЛ-6: $100 - [(ПЛ-ОБРАЗЕЦ) / ПЛ-6С+] \times 100$.

Таким образом, применяя формулу, получают значение снижения продуцирования ПЛ-6 в присутствии анализируемого образца, которое составляет 39% по сравнению с положительным контролем, приведенное в табл. 14 для композиции по изобретению, изготовленной в форме сильнодействующего спрея (жидкая композиция по примеру 3), как описано в разделе подробного описания выше.

ОБРАЗЕЦ	Ингибирование Высвобождения ПЛ 6 %	СРЕДНЕЕ	D.S
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + ЛПС 1	41.960		
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + ЛПС 2	39.453	38.965	3.266
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + ЛПС 3	35.483		

Таблица 15

Продуцирование IL6 в барьерном анализе с составом композиции по изобретению в виде бесспиртового спрея (жидкая композиция по примеру 4) в соответствии с примерами, представленными в разделе подробного описания изобретения

ОБРАЗЕЦ	IL-6 (пг/мл)	СРЕДНЕЕ	DS
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS 1	286,128	297,914	11,054
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS 2	308,051		
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS 3	299,564		
КОНТРОЛЬ + 1 (LPS)	639,728	676,973	32,634
КОНТРОЛЬ + 2 (LPS)	690,646		
КОНТРОЛЬ + 3 (LPS)	700,547		
КОНТРОЛЬ - 1 (MEM)	61,945	64,303	3,489
КОНТРОЛЬ - 2 (MEM)	62,652		
КОНТРОЛЬ - 3 (MEM)	68,310		

Из средних значений IL-6, измеренных в барьерном анализе и в положительном контроле, рассчитывается процент снижения высвобождения IL-6: $100 - [(IL-6 \text{ ОБРАЗЕЦ}) / (IL-6 \text{ C+}) \times 100]$.

Таким образом, применяя формулу, получают значение снижения продуцирования IL-6 в присутствии анализируемого образца, которое составляет 56% по сравнению с положительным контролем, приведенное в табл. 16 для композиции по изобретению, изготовленной в виде бесспиртового спрея (жидкая композиция по примеру 4), как описано в разделе подробного описания выше.

Образец	Ингибирование Высвобождения IL6 %	СРЕДНЕЕ	DS
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS1	57,734	55,993	1,633
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS2	54,496		
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS3	55,749		

Для того чтобы валидировать используемый способ и убедиться, что результаты зависят только от барьерного эффекта анализируемых образцов и исключаются любые фармакологические, иммунологические или метаболические эффекты (например, модуляция синтеза цитокинов), барьерному анализу помогали ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ (IC), одновременно выполняемый с каждым образцом.

В анализе IC вначале клетки стимулируют LPS, тогда как образец добавляют к трансвелл только впоследствии: в этом случае ничтожный % ингибирования IL6 ясно указывает на то, что присутствие анализируемой композиции обеспечивает механическую защиту, никоим образом не мешая синтезу цитокинов в клетках.

Значения концентрации IL-6, измеренные в экспериментах по внутреннему контролю, где указанная обработка композицией в виде таблеток для взрослых (твердая композиция по примеру 3) проводится после введения LPS, приведены в табл. 17 ниже.

Fold over по сравнению с C- во внутреннем контроле.

ОБРАЗЕЦ	Ф.О. (C-)	Среднее (%)	Стд. Откл. (%)
Таблетки для Взрослых 1:5+LPS 1	11,821	12,059	0,229
1:5+LPS 2	12,278		
1:5+LPS 3	12,076		
1:2.5+LPS 1	10,97	11,112	0,185
1:2.5+LPS 2	11,321		
1:2.5+LPS 3	11,045		
КОНТРОЛЬ + 1 (LPS)	13,767	12,427	1,207
КОНТРОЛЬ + 2 (LPS)	12,087		
КОНТРОЛЬ + 3 (LPS)	11,427		
КОНТРОЛЬ - 1 (MEM)	1,099	1	0,096
КОНТРОЛЬ - 2 (MEM)	0,908		
КОНТРОЛЬ - 3 (MEM)	0,993		

Значения округлены до 3-десятичного знака.

Значения концентрации IL-6, измеренные в экспериментах по внутреннему контролю, где указанная обработка композицией в виде таблеток для детей (твердая композиция по примеру 4) проводится после введения LPS, приведены в табл. 18 ниже.

Fold over по сравнению с C- во внутреннем контроле.

ОБРАЗЕЦ	Ф.О. (C-)	Среднее (%)	Стд. Откл. (%)
Таблетки для Детей +LPS 1	11,172	10,002	1,015
+LPS 2	9,481		
+LPS 3	9,353		
.5+LPS 1	11,598	11,903	0,339
.5+LPS 2	12,268		
.5+LPS 3	11,842		
КОНТРОЛЬ + 1 (LPS)	13,767	12,427	1,207
КОНТРОЛЬ + 2 (LPS)	12,087		
КОНТРОЛЬ + 3 (LPS)	11,427		
КОНТРОЛЬ - 1 (MEM)	1,099	1	0,096
КОНТРОЛЬ - 2 (MEM)	0,908		
КОНТРОЛЬ - 3 (MEM)	0,993		

Значения округлены до 3-десятичного знака.

Значения концентрации П-6, измеренные в экспериментах по внутреннему контролю, где указанная обработка композицией в виде сильнодействующего спрея (твердая композиция по примеру 3) проводится после введения LPS, приведены в табл. 19 ниже.

ОБРАЗЕЦ	П-6 (пг/мкл)	СРЕДНЕЕ	D.S
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + LPS 1	839,865	839,158	4,637
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + LPS 2	843,401		
СИЛЬНОД. СПРЕЙ + LPS 3	834,208		
КОНТРОЛЬ + 1 (LPS)	914,828	825,721	80,223
КОНТРОЛЬ + 2 (LPS)	803,091		
КОНТРОЛЬ + 3 (LPS)	759,244		
КОНТРОЛЬ - 1 (MEM)	72,553	65,953	6,378
КОНТРОЛЬ - 2 (MEM)	59,824		
КОНТРОЛЬ - 3 (MEM)	65,481		

Значения концентрации П-6, измеренные в экспериментах по внутреннему контролю, где указанная обработка композицией в форме бесспиртового спрея (жидкая композиция по примеру 4) проводится после введения LPS, приведены в табл. 20 ниже.

ОБРАЗЕЦ	П-6 (пг/мкл)	СРЕДНЕЕ	D.S
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS 1	759,244	744,157	22,557
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS 2	755,001		
БЕССПИРТОВОЙ СПРЕЙ + LPS 3	718,227		
КОНТРОЛЬ + 1 (LPS)	914,828	825,721	80,223
КОНТРОЛЬ + 2 (LPS)	803,091		
КОНТРОЛЬ + 3 (LPS)	759,244		
КОНТРОЛЬ - 1 (MEM)	72,553	65,953	6,378
КОНТРОЛЬ - 2 (MEM)	59,824		
КОНТРОЛЬ - 3 (MEM)	65,481		

Установлено, что значения, полученные в этих экспериментах, являются однородными с величинами положительного контроля для барьерного анализа (в отсутствии образца) и подтверждают, что образец, введенный после введения LPS, не влияет на образование медиаторов воспаления и поэтому не имеет прямого противовоспалительного эффекта. Это лучше представлено на графиках, представленных на фиг. 5, на которых значения П-6, продуцируемого клетками, выражены в терминах Fold Over C.

3. Анализ DPPH на активность поглощения свободных радикалов.

Антиоксидантная поглотительная активность под началом экстракта почек тополя в соответствии с настоящим описанием (полученная с использованием вышеописанного способа и имеющая вышеописанные характеристики), оценивалась с помощью анализа DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); DPPH представляет собой окрашенный стабильный радикал: он меняет цвет при химическом взаимодействии с антиоксидантным соединением и может быть обнаружен с помощью спектрофотометрического считывания. Таким образом, целью этого анализа является демонстрация того, что анализируемые образцы обладают хорошей антиокислительной активностью, которая проводится чисто химическим способом (перенос водорода на свободный радикал) без применения фармакологических, иммунологических или метаболических механизмов, когда применяются на биологические субстраты. Проанализированный образец представляет собой экстракт почек тополя согласно настоящему описанию при концентрациях 1000, 100 и 10 мкг/мл. Активность сравнивали с активностью витамина С, используемого в качестве положительного контроля.

Как видно из фиг. 6, экстракт почек тополя согласно изобретению обладает превосходной антиоксидантной активностью при более высоких концентрациях 1000 и 100 мкг/мл и хорошей активностью при меньшей концентрации 10 мкг/мл.

4. Анализ ингибирования образования биопленки.

В методологии, применяемой в этом анализе, используется способность микроорганизмов прилипать и образовывать биопленки на лунках из пенополистирола: тогда масса биопленки будет определяться окрашиванием аристаллического-фиолетового. Бактерия, используемая в анализе, является наиболее частой инфекцией слизистой оболочки глотки, т.е. *Streptococcus pyogenes*; анализируемый образец представляет собой экстракт почек тополя в соответствии с настоящим описанием (можно получить с помощью вышеописанного способа и с вышеописанными характеристиками). Первая фаза анализа состоит в оценке минимальной ингибирующей концентрации (МИС), т.е. Самой низкой концентрации, ингибирующей рост микроорганизмов. В качестве положительного контроля был выбран антибиотик гентамицин. Во второй фазе измеряется способность ингибировать образование биопленки; анализируемые образцы добавляют к среде в концентрациях, равных или меньших, чем МИС, для того чтобы исключить то, что активность антибиопленки можно приписывать ингибированию роста микроорганизмов. После соответствующего периода инкубации образовавшаяся биопленка окрашивалась Кристаллическим-фиолетовым; после окрашивания избыток красителя удаляли водой, а приклеившееся к биопленке растворяли в этаноле. Полученный раствор анализировали спектрофотометром при 570 нм: интенсивность поглощения в этом анализе будет тем больше, чем больше будет сформирована масса биопленки; соответственно, антибиопленочная активность и записанная абсорбция обратно пропорциональны друг другу. Для каждого образца использовались концентрации 1x МИС, 0,5 x МИС и 0,1 МИС. Представленные данные являются средними по 9 измерениям, выполненным в трех повторах. Статистическая значимость,

рассчитанная с помощью t-теста, * $p < 0,01$ и ** $p < 0,001$ (обработанные бактерии против необработанных бактерий). Анализ показывает, как экстракт по изобретению более эффективен по сравнению со стандартным 50% водно-спиртовым экстрактом.

5. Сравнительный анализ мукоадгезии и устойчивости к стиранию между композицией в соответствии с изобретением в различных вариантах ее выполнения и прополисным спреем.

Прополисный спрей.

деионизированная вода в %	33
прополис d.e. мульти-ф. %	41,6
растительный глицерин а %	55
эфирное масло лимона %	0,1

Бесспиртовой прополисный спрей.

деионизированная вода в %	57,2
прополиса лиоф. экстракт е %	4
ВИШНЕВЫЙ АРОМАТИЗАТОР нат. р %	0,8
клубничный натуральный ароматизатор %	1,2
осветленный сок лимона %	1,8
растительный глицерин а %	35

Анализы проводили, как описано выше для примера 1, анализируя композиции по изобретению и прополисный спрей при различных разведениях.

Данные, представленные в таблицах, показывают, что прежде всего при более высоких разведениях композиции по изобретению обладают большим мукоадгезивным эффектом по сравнению с прополисом.

Таблица 21

		Прополисный спрей
МУКОАДГЕЗИЯ	Разведенный 1:2 : 68.8 ± 3.0	Неразведенный : 57.5 ± 3.1
	Разведенный 1:5 : 55.6 ± 1.8	Разведенный 1:5 : 36.8 ± 5.0
Сопротивление стиранию	Разведенный 1:2 : 68.8 ± 3.0	Разведенный 1:2 : 57.5 ± 3.1
	30 мин : 57.2 ± 5.6	30 мин : 54.4 ± 2.1
	60 мин : 50.3 ± 3.8	60 мин : 52.5 ± 2.7
	120 мин : 39.4 ± 4.3	120 мин : 34.1 ± 1.6

Таблица 22

	Таблетки для детей	Прополисный спрей
МУКОАДГЕЗИЯ	Разведенный 1:2 : 62.6 ± 4.5	Неразведенный : 57.5 ± 3.1
	Разведенный 1:5 : 47.1 ± 3.5	Разведенный 1:5 : 36.8 ± 5.0
Сопротивление стиранию	Разведенный 1:2 : 62.6 ± 4.5	Разведенный 1:2 : 57.5 ± 3.1
	30 мин : 57.8 ± 4.7	30 мин : 54.4 ± 2.1
	60 мин : 51.2 ± 2.9	60 мин : 52.5 ± 2.7
	120 мин : 35.1 ± 3.3	120 мин : 34.1 ± 1.6

Таблица 23

	СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИЙ СПРЕЙ	Прополисный спрей
МУКОАДГЕЗИЯ	Неразведенный : 76.3 ± 5.4	Неразведенный : 57.5 ± 3.1
	Разведенный 1:2 : 66.4 ± 6.1	Разведенный 1:2 : 57.5 ± 3.1
	Разведенный 1:5 : 54.6 ± 5.1	Разведенный 1:5 : 36.8 ± 5.0
Сопротивление стиранию	Разведенный 1:2 : 66.4 ± 6.1	Разведенный 1:2 : 57.5 ± 3.1
	30 мин : 63.6 ± 5.3	30 мин : 54.4 ± 2.1
	60 мин : 51.6 ± 4.8	60 мин : 52.5 ± 2.7
	120 мин : 43.1 ± 4.4	120 мин : 34.1 ± 1.6

Таблица 24

	Бесспиртовой спрей	Прополисный спрей
МУКОАДГЕЗИЯ	Неразведенный : 73.2 ± 2.7	Неразведенный : 57.5 ± 3.1
	Разведенный 1:2 : 61.7 ± 3.1	Разведенный 1:2 : 57.5 ± 3.1
	Разведенный 1:5 : 51.6 ± 2.0	Разведенный 1:5 : 36.8 ± 5.0
Сопротивление стиранию	Разведенный 1:2 : 61.7 ± 3.1	Разведенный 1:2 : 57.5 ± 3.1
	30 мин : 51.5 ± 4.0	30 мин : 54.4 ± 2.1
	60 мин : 46.8 ± 4.7	60 мин : 52.5 ± 2.7
	120 мин : 41.4 ± 3.4	120 мин : 34.1 ± 1.6

Как видно из вышеприведенных анализов, анализируемые композиции демонстрируют в любом варианте выполнения (твердое вещество, спрей со спиртом, спрей без спирта), что экстракт почек тополя обладает мукоадгезивной способностью, большей, чем у прополиса, в частности, заметной при более высоких разведениях анализируемых продуктов, что видно из данных, полученных с разведениями 1:5.

6. Приготовление водно-спиртового мультифракционного экстракта.

Почки черного тополя (*Populus nigra*) были фрагментированы и подвергнуты двум этапам экстракции в экстракторе, снабженном механической мешалкой, в этаноле при пониженных концентрациях, с выполнением первой стадии с 85% этанолом и второй стадии с 13% этанолом. Используемое соотношение D/S составляет 1:6. Температура экстракции составляет 40°C. Продолжительность экстракции с 85% этанолом составляет 8 ч, продолжительность экстракции с 13% этанолом составляет 8 часов.

Спиртовые экстракты, полученные, как описано, соединяли в соотношении 50:50. Смешивание предусматривало добавление 13° спиртового экстракта в 85° спиртовой экстракт (со скоростью добавления, равной 16 л/мин). Смешивание проводили при $20\pm 5^\circ\text{C}$. По окончании добавления смесь подвергали декантации в течение 72 часов при $20\pm 5^\circ\text{C}$, затем супернатант извлекали и дополнительно фильтровали на панельном фильтре, снабженном целлюлозным фильтром с отсечением 30 мкм. В конце фильтрации проверяется градус спирта и регулируется до $62\pm 1^\circ$ спиртовых градусов.

7. Получение лиофилизированного мультифракционного экстракта.

Очищенный спиртовой экстракт, полученный, как описано в примере 1, без коррекции градусов спирта, концентрируют путем выпаривания этанола с использованием системы тонкопленочной дистилляции в соответствии со стандартным протоколом, предусматривающим подачу экстракта, который должен быть сконцентрирован, при скорости потока около 500 л/ч; операцию проводят путем установки остаточного вакуума 0,6-0,8 бар, а температуру жидкости, нагревающую стенки испарителя, доводят до 140°C , в результате чего после удаления этанола получают концентрированный водный экстракт. Полученный таким образом водный экстракт подвергали лиофилизации.

8. Получение лиофилизированного многокомпонентного экстракта, нанесенного на аравийскую камедь.

Осветленный спиртовой экстракт, полученный, как описано в примере 1, смешивают с аравийской камедью и подвергают концентрированию и лиофилизации, как описано в примере 2.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая мультифракционный спиртовой лиофилизированный экстракт почек тополя в процентах по массе от 0,3 до 45% и один или более фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов, ароматизаторов и консервантов, причем композиция предназначена для лечения полости ротоглотки, мочевого аппарата, пищеварительного или выделительного аппарата, поражений кожи и бактериальных инфекций, где указанные поражения полости ротоглотки выбраны из фарингита, афты, воспаления или инфекции полости рта, указанные поражения пищеварительного/выделительного аппарата выбраны из гастрита, рефлюкса, воспалительных заболеваний кишечника, синдрома раздраженного кишечника, геморроя, инфекций, указанными бактериальными инфекциями являются инфекции, вызванные одним или более из *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

2. Композиция по п.1, состоящая из:

экстракт почек тополя - 0,70 мас.%;
ксантановая камедь - 1,00 мас.%;
вода - 55,40 мас.%;
персиковый ароматизатор - 0,40 мас.%;
лимонный ароматизатор - 0,10 мас.%;
осветленный сок лимона - 1,40 мас.%;
съедобный растительный глицерин - 15,00 мас.%;
апельсиновый сок - 26,00 мас.%;
общее - 100,00 мас.%;

или

экстракт почек тополя - 1,00 мас.%;
гуаровая камедь - 1,00 мас.%;
вода - 55,10 мас.%;
персиковый ароматизатор - 0,40 мас.%;
лимонный ароматизатор - 0,10 мас.%;
осветленный сок лимона - 1,40 мас.%;
съедобный растительный глицерин - 15,00 мас.%;
апельсиновый сок - 26,00 мас.%;
общее - 100,00 мас.%;

или

лиофилизированный экстракт почек тополя - 0,55 мас.%;
аравийская камедь - 4,95 мас.%;
вода - 51,30 мас.%;
вишневый ароматизатор - 0,20 мас.%;
клубничный ароматизатор - 0,60 мас.%;
осветленный сок лимона - 1,40 мас.%;
съедобный растительный глицерин - 35,00 мас.%;
осветленный яблочный сок. конц. - 6,00 мас.%;
общее - 100,00 мас.%;

где указанная композиция находится в жидкой форме.

3. Композиция по любому из п.1, состоящая из:

лиофилизированный экстракт почек тополя - 5,00 мас.%;

маннит - 46,14 мас.%;

камедь тары - 6,56 мас.%;

инулин - 38,60 мас.%;

лиофилизированный сок малины - 0,40 мас.%;

лиофилизированный сок персика - 2,50 мас.%;

лимонный натуральный ароматизатор - 0,80 мас.%;

вишневый натуральный ароматизатор - 1 мас.%;

лиофилизированный экстракт мальвы - 0,8 мас.%;

общее - 100,00 мас.%;

или

лиофилизированный экстракт почек тополя - 10,00 мас.%;

сорбит - 46,14 мас.%;

гуаровая камедь - 1,56 мас.%;

инулин - 15,00 мас.%;

лиофилизированный сок лимона - 0,40 мас.%;

лиофилизированный сок апельсина - 25,00 мас.%;

лимонный натуральный ароматизатор - 0,80 мас.%;

малиновый натуральный ароматизатор - 1,10 мас.%;

лиофилизированный экстракт мальвы - 0,8 мас.%;

общее - 100,00 мас.%;

или

лиофилизированный экстракт почек тополя - 1,08 мас.%;

коричневый сахар - 71,5 мас.%;

аравийская камедь - 10,82 мас.%;

мёд - 3 мас.%;

экстракт лайма - 1,5 мас.%;

лиофилизированный сок апельсина - 10,5 мас.%;

апельсиновый ароматизатор - 1,5 мас.%;

эфирное масло лимона - 0,1 мас.%;

общее - 100 мас.%;

или

лиофилизированный экстракт почек тополя - 1,14 мас.%;

коричневый сахар - 83,5 мас.%;

аравийская камедь - 6,56 мас.%;

инулин - 1,6 мас.%;

лиофилизированный сок клубники - 2,4 мас.%;

лиофилизированный сок бузины - 2 мас.%;

клубничный натуральный ароматизатор - 1 мас.%;

вишневый натуральный ароматизатор - 1 мас.%;

лиофилизированный экстракт лайма - 0,8 мас.%;

общее - 100,00 мас.%;

где указанная композиция находится в твердой форме.

4. Композиция по любому из пп.1-3, в которой указанные инфекции *S. pyogenes* выбраны из фарингита, скарлатины, пиодермии или импетиго, рожи, целлюлита, некротизирующего фасцита, синдрома стрептококкового токсического шока, бактериемии, острой ревматической лихорадки, острого гломерулонефрита, узелковой эритемы, P.A.N.D.A.S (педиатрических аутоиммунных нейропсихиатрических расстройств, связанных со стрептококковыми инфекциями), синдрома хронической усталости (CFS), фибромиалгии, синдрома доброкачественной фасцикуляции (BFS).

5. Композиция по любому из пп.1 или 2 в форме сиропа, аэрозоля или суспензии.

6. Композиция по любому из пп.1 или 3 в форме порошка, таблетки, капсулы или твердого или мягкого желатина.

7. Способ получения экстракта из почек тополя для получения композиции по любому из пп.1-6, включающий следующие стадии:

а) приготовление водно-спиртового экстракта почек тополя путем экстракции 85° этанолом;

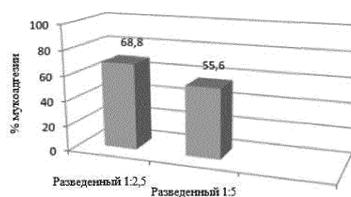
б) приготовление водно-спиртового экстракта почек тополя путем экстракции 13° этанолом;

в) получение мультифракционного спиртового экстракта путем смешивания экстрактов, полученных в а) и б);

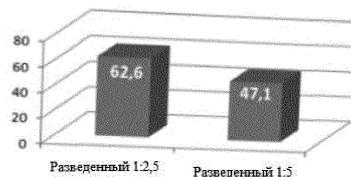
д) декантирование и/или центрифугирование и фильтрование указанного спиртового экстракта (в), сбор супернатанта;

е) отфильтрованный супернатант, полученный в д), подвергают концентрированию и лиофилизации.

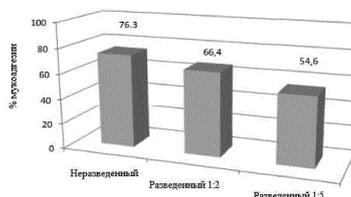
8. Способ по п.7, дополнительно включающий стадию, при которой в отфильтрованный супернатант, полученный в d), добавляют натуральную камедь и затем подвергают концентрированию и лиофилизации.



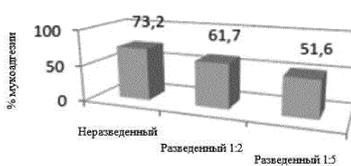
Фиг. 1А



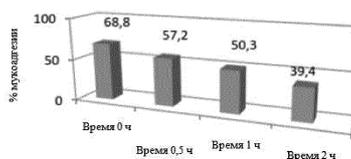
Фиг. 1В



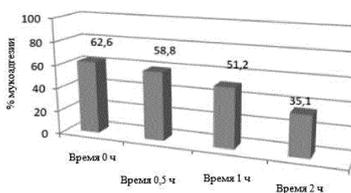
Фиг. 1С



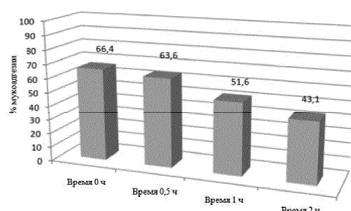
Фиг. 1D



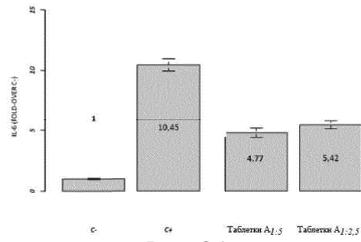
Фиг. 2А



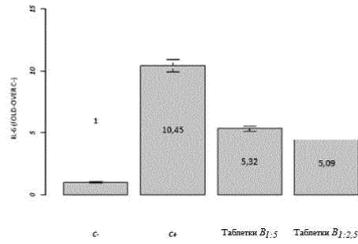
Фиг. 2В



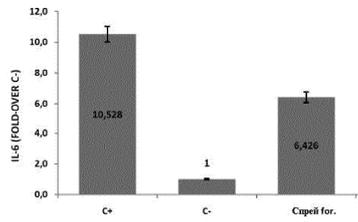
Фиг. 2С



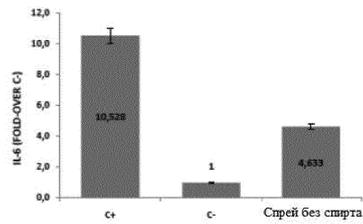
Фиг. 3А



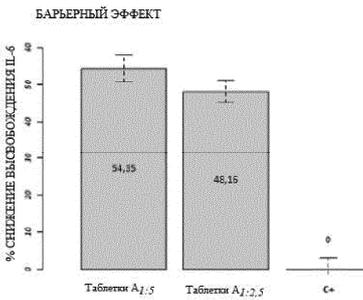
Фиг. 3В



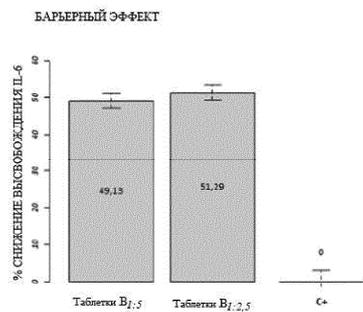
Фиг. 3С



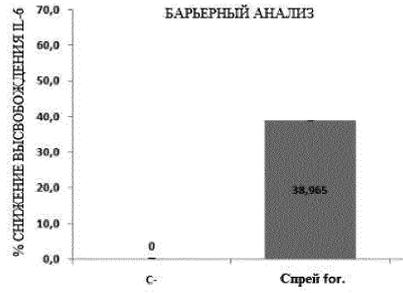
Фиг. 3Д



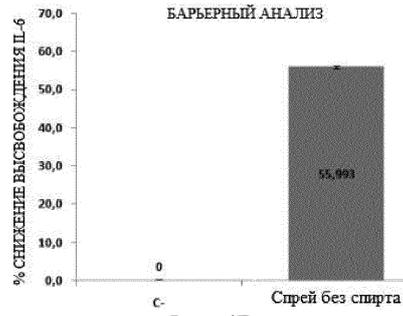
Фиг. 4А



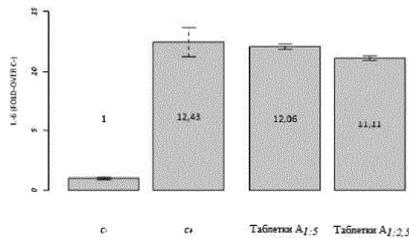
Фиг. 4В



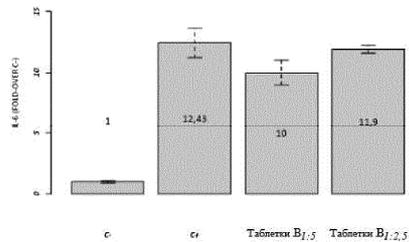
Фиг. 4С



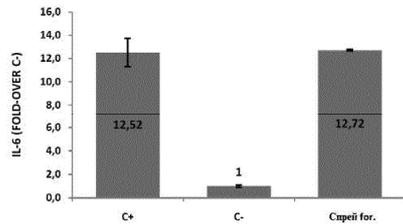
Фиг. 4D



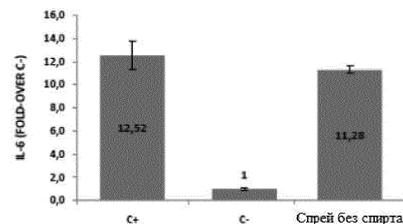
Фиг. 5А



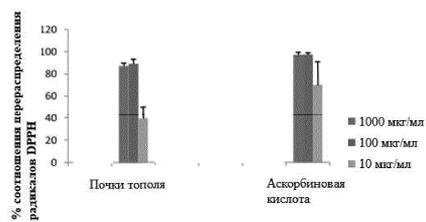
Фиг. 5B



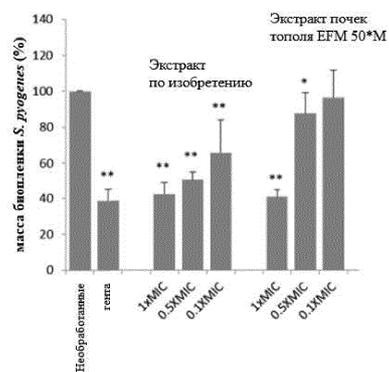
Фиг. 5С



Фиг. 5D



Фиг. 6



Фиг. 7