



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 84123

(13) C2

(51) МПК (2006)

A23L 1/30

A23K 1/16

A61K 36/185

A61K 36/23 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61K 36/53 (2006.01)

A61K 36/73 (2006.01)

A61K 125/00 (2008.01)

A61K 131/00 (2008.01)

A61K 127/00 (2008.01)

A61K 133/00 (2008.01)

A61K 135/00 (2008.01)

A61P 3/14 (2006.01)

A61P 19/00

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ РОСЛИНИ АБО ЕКСТРАКТУ З РОСЛИНИ ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ КОМПОЗИЦІЇ, ПРИЗНАЧЕНОЇ ДЛЯ ПОПЕРЕДЖЕННЯ, ПОЛЕГШЕННЯ ТА/АБО ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ КІСТОК АБО ДЛЯ ПІДТРИМАННЯ ЗДОРОВ'Я КІСТОК У ЛЮДИНИ АБО ХАТНІХ ТВАРИН

1

2

(21) 20040705594

(22) 10.12.2002

(24) 25.09.2008

(86) РСТ/ЕР02/14120, 10.12.2002

(31) 01204838.5

(32) 11.12.2001

(33) ЕР

(46) 25.09.2008, Бюл.№ 18, 2008 р.

(72) ОФФОРД-КЕЙВІН ЕЛІЗАБЕТ, ФЕДЕРІЧІ ЕР-
МАННО, ЛЕМОР БЕРНАР, КУРТУАДІДЬС

(73) СОСЬЄТЕ ДЕ ПРОДЮІ НЕСТЛЕ С.А.

(56) WO A1 0213840, 21.12.2002.

RU C1 2102460, 20.01.1998.

WO A1 9955351, 04.11.1999.

DE A1 19814725, 07.10.1999.

CN C 1292274, 25.04.2001.

US A 5908628, 01.06.1999.

UK A 2355189, 18.04.2001.

(57) 1. Застосування рослини або екстракту однієї або більше рослин, що містить фітохімічні сполуки, здатні стимулювати кістковий морфогенний білок та/або інгібувати резорбцію кісток, де рослину вибрано з групи, яка включає: надземні частини *Lindera benzoin*, надземні частини *Artemisia vulgaris*, кореневища (різома) *Acorus calamus*, на-

сіння або квіти *Carthamus tinctorius*, плоди *Amelanchier ovalis*, плоди *Amelanchier alnifolia*, листя або коріння *Taraxacum officinalis*, кореневища *Cyperus rotundus*, клітинні культури *Iris pallida*, кореневища *Iris germanica*, *Iris pallida* або *Iris pseudacorus*, насіння *Prunus persica*, клітинні культури сої, надземні частини *Mentha spicata*, надземні частини *Ocimum gratissimum*, надземні частини *Thymus sp.*, ягоди *Vitis vinifera*, надземні частини *Rosmarinus officinalis*, *Carum carvi*, надземні частини *Oxydendron arboretum*, для приготування композиції, призначеної для попередження, полегшення та/або лікування захворювань кісток або для підтримання здоров'я кісток у людини або хатніх тварин.

2. Застосування за п. 1, у якому рослину або екстракт рослини використовують окремо або в комбінації з іншими рослинами, зокрема, такими як цикорій, чай, какао, або з іншими біоактивними молекулами, такими як антиоксиданти, жирні кислоти, пребіотичні волокна, глюкозамін, хондроїтинсульфат.

3. Застосування за п. 1 або 2, у якому композиція знаходиться у вигляді збалансованого по живильних речовинах харчового продукту або корму для

(13) C2

(11) 84123

(19) UA

хатніх тварин, дієтичної добавки, або фармацевтичної композиції.

4. Спосіб лікування, полегшення стану або запобігання захворюванням кісток або підтримання здоров'я кісток, який включає введення ефективної кількості композиції за будь-яким з пп. 1-3.

5. Спосіб посилення кісткоутворення, підвищення мінеральної густини кісток на стадії росту та оптимізації пікової маси кісток у людини або хатніх тварин, який включає стадію згодовування індивідуумові композиції за будь-яким з пп. 1-3.

6. Спосіб лікування, полегшення стану та/або профілактики остеоартриту у людини або хатніх

тварин, який включає стадію згодовування індивідуумові композиції за будь-яким з пп. 1-3.

7. Спосіб лікування або запобігання остеопорозу, який включає введення ефективної кількості композиції за будь-яким з пп. 1-3.

8. Спосіб стимулювання регенерації кісток при лікуванні переломів, який включає стадію згодовування індивідуумові композиції за будь-яким з пп. 1-3.

9. Спосіб зниження розрідження кісток, зокрема, розрідження кісток, обумовленого віком, у людини або хатніх тварин, який включає стадію згодовування індивідуумові композиції за будь-яким з пп. 1-3.

Даний, винахід стосується композиції для підтримання здоров'я кісток або запобігання, полегшення стану та/або лікування захворювань кісток. Він також стосується застосування композиції у виробництві живильного продукту, добавки або лікарського засобу та способу стимулювання росту кісток або підтримання здоров'я кісток, який передбачає прийом усередину ефективної кількості композиції.

Здорові кістки мають потребу в ефективному перебудовуванні, яке включає рівновагу між кісткоутворенням і резорбцією кісток. Причиною більшості захворювань кісток є підвищена резорбція кісток, що робить її інгібування основною терапевтичною метою, тому більшість фармацевтичних препаратів, розроблених до теперішнього часу, є протирезорбційними. Наприклад, естрогени блокують утворення цитокінів, які сприяють генерації та диференціації остеокластів. Розробляються SERM (селективні модулятори естрогенової реакції), які мають корисний вплив на здоров'я кісток при зниженні ризику шкідливої гормональної дії на тканини молочної залози або ендометрію. Передбачається, що механізм їхньої дії аналогічний механізму дії естрогенів у кістках. Бісфосфонати (такі як алендронат, ризедронат та ін.) концентруються у кістках і є на сьогоднішній день найефективнішими інгібіторами резорбції кісток. Вони інгібують критичний ферментативний механізм, необхідний для активності та виживання остеокластів. Кальцитонін - це поліпептидний гормон, що інгібує резорбцію кісток за рахунок блокування активності остеокластів. Нові розробки спрямовані на блокування членів сімейства рецепторів/лігандів фактора некрозу пухлин (TNF) та їхніх сигнальних шляхів, зокрема, RANK/RANKL, на інгібування кісткоспецифічних металопротеаз, таких як катепсин K, або інгібування специфічних кіназ.

Створення лікувальних засобів, що стимулюють кісткоутворення, дещо відстало від розробки інгібіторів резорбції. Відомі деякі хімічні або фармацевтичні агенти, які сприяють росту кісток у людини. Наприклад, у [WO 9619246] описаний спосіб стимулювання росту кісток у хворих людей за рахунок періодичного введення їм паратиреоїдного гормону (PTH), PTH-спорідненого білка або агоніста протягом, щонайменше, одного місяця. В [WO 9619501] фактор, що походить з підшлункової за-

лози, інгібує резорбцію кісток і стимулює проліферацію кісткових клітин та посилює кісткоутворення.

Головним відкриттям останніх років стала демонстрація ролі кісткового морфогенного білка 2 (BMP-2) як ключового фактора стимулювання кісткоутворення, а також того, що статини (ефективні засоби для зниження рівня холестерину шляхом інгібування синтезу холестерину) поліпшують кісткоутворення, частково опосередковане за рахунок індукції BMP-2. Показано, що введення рекомбінантного BMP-2 індукуює кісткоутворення та формування хрящів. В [US 6150328] описується спосіб індукції кісткоутворення та формування хрящів, який передбачає введення очищеного кісткового морфогенного білка, одержаного культивуванням клітини, трансформованої ДНК, що кодує BMP. [WO 9711095] також стосується застосування композицій кісткового морфогенного білка для лікування пухлин нервової системи та хвороб росту кісток і для загоєння ран. На додаток до BMP, вивчаються такі фактори росту (GF), як інсуліноподібний фактор росту (IGF-1), трансформуючий фактор росту GF- β (TGF- β), фактори росту фібробластів (FGF), що можуть використовуватися як локальна терапія при лікуванні переломів і дефектів кісток. Однак їхнє систематичне введення досить проблематичне через метаболізм у кишечнику, а також внаслідок можливого впливу на інші тканини. Як одне з можливих рішень пропонується генотерапія. Альтернативою може служити цілеспрямоване регулювання утворення остеобластів за допомогою харчових або фармацевтичних регуляторів експресії генів або білка остеобластів.

Хоча зазначені хімічні й фармацевтичні сполуки підтвердили свою ефективність для лікування захворювань кісток, проте, великий інтерес представляє безпечний та ефективний харчовий шлях стимуляції росту кісток і запобігання, полегшення або лікування кісткових/суглобних захворювань у ссавців.

Відповідно до першого аспекту, даний винахід стосується композиції, призначеної для запобігання, полегшення стану та/або лікування захворювань кісток або для підтримання здоров'я кісток у ссавців, що містить як активний інгредієнт ефективну кількість, щонайменше, однієї рослини або екстракту рослини, спеціально підбраної за її здатністю індукувати експресію кісткового морфогенного білка.

Цікаво, що деякі рослини або екстракти з них, як було встановлено, мають здатність стимулювати ріст кісток за рахунок регулювання ендогенних факторів росту в кістковій або хрящовій тканинах. Вони мають здатність індукувати експресію кісткового морфогенного білка *in vivo* та у локальному оточенні кістки, що має позитивний ефект на кістоутворення й відновлення кісток, на підтримання здоров'я кісток або запобігання, полегшення стану та/або лікування захворювань кісток.

Композиція відповідно до винаходу може використовуватися у виробництві живильного продукту, добавки, страви або лікарського засобу, призначеного для людини або хатніх тварин.

Введення індивідуумові харчової композиції за даним винаходом приводить до поліпшення регенерації кісток при лікуванні переломів. Дана композиція, крім того, допомагає інгібувати резорбцію кісток. Вона допомагає збільшувати кістоутворення й мінеральну густину кісток на стадії росту й оптимізувати пікову масу кісток. Крім того, зазначена харчова композиція допомагає знизити ризик розрідження кісток, зокрема, розрідження кісток, обумовленого віком, у ссавців. Таким чином, вона сприяє підтриманню маси кісток з віком і знижує небезпеку остеопорузу.

Крім цього, вона сприяє формуванню хрящів у ссавців, запобіганню остеоартриту у хатніх тварин або людини, що забезпечує підвищену активність або рухливість індивідуума.

Відповідно до іншого аспекту, даний винахід стосується застосування рослини або екстракту рослини, відібраних за їхньою здатністю стимулювати кісткові морфогенні білки та/або інгібувати резорбцію кісток, для виготовлення композиції, призначеної для підтримання здоров'я кісток у ссавців і запобігання, полегшення стану та/або лікування захворювань кісток.

На додаток до цього, винахід забезпечує спосіб запобігання, полегшення стану та/або лікування захворювання кісток або підтримання здоров'я кісток, який передбачає введення ефективної кількості композиції, описаної вище.

Винахід також забезпечує спосіб посилення кістоутворення, мінеральної густини кістки на стадії росту та оптимізації пікової маси кісток, лікування або запобігання остеопорузу, стимулювання регенерації кісток при лікуванні переломів, який передбачає введення ефективної кількості композиції, як описано вище.

Крім того, він стосується способу лікування, полегшення стану та/або профілактики остеоартриту у хатніх тварин або людини, який включає стадію згодовування індивідуумові композиції, як описано вище.

Він також забезпечує спосіб зниження ризику розрідження кісток, зокрема, розрідження кісток, обумовленого віком, у людини або хатніх тварин, який включає стадію згодовування індивідуумові композиції, як описано вище.

Фіг.1. Вимірювання ендогенної експресії мРНК BMP-2 у клітинах hPOB-terf за допомогою полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскриптазою (RT-PCR) після обробки екстрактами з *Lindera benzoin* (P.E. 740, 50мкг/мл) або *Cyperus rotundus* (P.E. 205, 10мкг/мл) протягом 48год., ви-

явили стимуляцію BMP-2 у 3,2 й 2,8 рази, відповідно, порівняно з контролем. Достовірність цієї методики експерименту підтверджують з використанням ловастатину (0,5мкг/мл) як позитивного контролю, який виявляє 2,5-кратну індукцію BMP-2.

Фіг.2. Порівняння вимірюваних показників інгібування в тесті на черепному склепінні (*Calvaria Assay*) (A) і ямковому тесті (*Pit Assay*) (B) при використанні екстрактів *Ocimum gratissimum* (738), *Amelanchier alnifolia* (734), *Glycine max* (768), *Cyperus rotundus* (205), *Carthamus tinctorius* (746).

Відповідно до першої мети даного винаходу, рослина або екстракт рослини відповідно до винаходу містить фітохімічні сполуки, що мають анаболічний потенціал завдяки їхній здатності індукувати експресію кісткового морфогенного білка й, крім того, можуть служити протирезорбційними агентами.

В кращому варіанті втілення, під рослиною або екстрактом рослини розуміють будь-яку частину рослини, наприклад, листя, бульби, плоди, насіння, корінь, зерна, зародки або клітинні культури. Рослина або екстракт рослини може бути сухим ліофілізованим екстрактом з листя, коренів та/або плодів залежно від виду використовуваної рослини, або свіжозібраною рослиною, або збагаченою фракцією, одержаною відомим у даній області методом екстракції неорганічним або органічним розчинником.

Рослину або екстракт рослини відбирають за їхньою здатністю інгібувати резорбцію кісток та/або індукувати кістоутворення, зокрема, вона може бути обрана з групи, що включає *Lindera*, *Artemisia*, *Acorns*, *Carihamus*, *Carum*, *Cnidium*, *Amelanchier*, *Curcuma*, *Taraxacum*, *Cyperus*, *Juniperus*, *Prunus*, *Iris*, *Cichorium*, *Dodonaea*, *Epimedium*, *Eriogonum*, *Soya*, *Mentha*, *Ocimum*, *Thymus*, *Tanacetum*, *Plantago*, *Spearmint*, *Bixa*, *Vitis*, *Rosmarinus*, *Rhus* та *Anethum*. Вона може бути також їстівним грибом.

У найкращому варіанті це можуть бути, наприклад, надземні частини *Lindera benzoin*, надземна частина *Artemisia vulgaris*, кореневище (ризом) *Acorus calamus*, насіння або квіти *Carthamus tinctorius*, плоди *Amelanchier ovalis*, плоди *Amelanchier alnifolia*, корінь *Cichorium intybus*, кореневище *Curcuma longa*, надземна частина *Epimedium brevicomum*, надземна частина *Eriogonum giganteum*, листя або корінь *Taraxacum officinalis*, кореневище *Cyperus rotundus*, листя *Dodonaea viscosa*, клітинні культури *Iris pallida*, кореневище *Iris germanica*, *pallida* або *pseudacorus*, плоди *Juniperus communis*, насіння *Prunus persica*, клітинні культури сої, надземні частини *Mentha spicata*, надземні частини *Ocimum gratissimum*, надземні частини *Thymus sp.*, надземні частини *Rhus glabra*, анісу, *Bixa*, ягоди *Vitis vinifera*, надземні частини *Rosmarinus officinalis*, надземні частини *Tanacetum vulgare*, *Carum carvi*, *Plantago major*, надземні частини *Oxydendron arboreum*.

Фітохімічні сполуки можуть бути геністеїном, даїдзейном, лактуцином, лактукопікрином, 3-дезоксилактуцином, гераніолом або карвоном.

Рослина або екстракт рослини відповідно до винаходу може використовуватися для виготов-

лення харчової композиції. Зазначена композиція може мати вигляд збалансованого по живильних речовинах харчового продукту або корму для хатніх тварин або живильної добавки, страви чи фармацевтичної композиції.

Рослина або екстракт рослини може використовуватися як окремо, так й у комбінації з іншими рослинами, такими як, наприклад, цикорій, чай, какао, або з іншими біоактивними молекулами, такими як антиоксиданти, жирні кислоти, пребіотики, цні волокна, глюкозамін, хондроїтинсульфат.

В одному з варіантів втілення виготовляється харчова композиція для споживання людиною. Зазначена композиція може бути повністю збалансованою по живильних речовинах сумішшю, молочним продуктом, охолодженим напоєм або напоєм з тривалим терміном зберігання, супом, харчовою добавкою, замінником їжі в рамках повсякденного раціону та висококалорійним батончиком або кондитерським виробом.

Крім екстракту рослини відповідно до винаходу, живильний склад може містити джерело білка. Як джерело білка краще використовуються харчові білки. Вони можуть бути будь-якими придатними для даної мети харчовими білками, наприклад, тваринними білками (такими як білки молока, м'ясний білок та яєчний білок), рослинними білками (соевий білок, пшеничний білок, рисовий білок і білок гороху), сумішами вільних амінокислот або їхніми комбінаціями. Особливо кращими видами білків є, зокрема, білки молока (казеїн, білки молочної сироватки) і соєвий білок. Композиція може містити також джерело вуглеводів і джерело жиру.

Якщо живильний склад містить джерело жиру, то це джерело жиру краще забезпечує приблизно від 5% до 55% енергетичної цінності живильного складу, наприклад, від 20% до 50%. Ліпіди як джерело жиру можуть бути будь-яким придатним для даної мети жиром або сумішшю жирів. Найбільш придатними є рослинні жири, наприклад, соєва олія, пальмова олія, кокосова олія, сафлорова олія, соняшникова олія, кукурудзяна олія, олія каніоли, лецитини і т.п. При необхідності можна додавати також тваринні жири, наприклад, молочний жир.

До живильного складу можна додати джерело вуглеводів. Воно краще забезпечує приблизно від 40% до 80% енергетичної цінності живильного складу. Може використовуватися будь-який придатний для даної мети вуглевод, наприклад, сахароза, лактоза, глюкоза, фруктоза, суха кукурудзяна патока й мальтодекстрини, а також їхні суміші. При необхідності можна додати також харчові волокна. У випадку додавання харчових волокон, вони краще становлять приблизно до 5% енергетичної цінності живильного складу. Харчові волокна можуть бути будь-якого придатного походження, включаючи, наприклад, сою, горох, овес, пектин, гуарову камедь, гуміарабік і фруктоолігосахариди. До живильного складу можуть бути включені відповідні вітаміни й мінеральні речовини в кількості, що відповідає нормативним показникам.

При необхідності в живильний склад може бути введений один або кілька емульгаторів харчової якості, наприклад, діацетилів складні ефіри винної кислоти та моно- і дигліцеридів, лецитин та

моно- і дигліцериди. Так само можуть бути включені придатні солі та стабілізатори. Вітаміни та мінеральні речовини також можуть комбінуватися з екстрактом рослини.

Живильний склад краще призначений для ентерального введення, наприклад, у вигляді порошку, таблетки, капсули, рідкого концентрату, твердого продукту або готового до вживання напою. Якщо потрібно приготувати сухий, порошкоподібний живильний склад, то гомогенізовану суміш пропускають через відповідну сушарку, наприклад, розпилювальну сушарку або сублімаційну сушарку, з одержанням порошку.

В іншому варіанті втілення живильна композиція включає молочно-зерновий продукт у суміші із пребіотичним складом. Молочно-зерновий продукт краще є продуктом дитячого харчування, що служить носієм для пребіотичного складу.

Відповідно до наступного варіанта втілення, звичайний харчовий продукт може бути збагачений, щонайменше, однією рослиною або екстрактом рослини за даним винаходом, наприклад, кисломолочний продукт, йогурт, свіжий сир, молочний зсідок сичугового згортання, кондитерський виріб, солодкий або підсолоджений напій, кондитерський батончик, зернові пластівці або зернові батончики до сніданку, напої, сухе молоко, продукти на соєвій основі, немолочні ферментовані продукти або живильні добавки для клінічного харчування.

Кількість рослини або екстракту рослини в композиції може змінюватися залежно від виду рослини й використовуваної частини рослини. У кращому варіанті втілення ефективна добова доза дорівнює щонайменше приблизно 1мг, ще краще - від 1мг до 200мг активних молекул.

В одному з втілень може бути виготовлена фармацевтична композиція, яка містить, щонайменше, екстракт або фітохімічну сполуку, як зазначено вище, у кількості, достатній для досягнення необхідного ефекту у індивідуума. Ця композиція може мати вигляд таблетки, рідини, капсул, м'яких капсул, пасти або пастилок, гумі або придатних для питва розчинів або емульсій, сухої добавки для орального вживання, вологої добавки для орального вживання. Фармацевтична композиція буде містити також носії й наповнювачі, придатні для транспортування відповідних активних молекул різної природи до тканини-мішені. Вид носія/наповнювача та його кількість будуть залежати від природи речовини й передбачуваного способу доставки та/або введення ліків. Зрозуміло, що фахівці в даній області можуть вибрати відповідні компоненти й галенові форми, опираючись на свій досвід і знання.

Рослина або екстракт рослини відповідно до винаходу може використовуватися для виготовлення композиції корму для хатніх тварин. Зазначена композиція може згодовуватися хатній тварині як добавка до звичайного раціону або як компонент збалансованого по живильних речовинах корму для хатніх тварин або, ще краще, низькокалорійного корму для хатніх тварин. Вона може бути також фармацевтичною композицією.

Рослина або екстракт рослини може використовуватися як окремо, так і в комбінації з іншими рослинами, такими як, наприклад, цикорій, чай,

какао, або з іншими біоактивними молекулами, такими як антиоксиданти, жирні кислоти, пребіотичні волокна, глюкозамін, хондроїтинсульфат.

Краще, композиція корму для хатніх тварин містить приблизно від 0,01 до 0,5г висушених рослин на один грам сухого корму для собак з масою тіла 15кг і від 0,001 до 0,1г висушених рослин на один грам вологого корму для собак з масою тіла 15кг.

Збалансована по живильних речовинах композиція корму для хатніх тварин відповідно до винаходу може бути приготовлена в порошкоподібному, сухому виді, у вигляді страви або вологого, охолодженого чи стійкого при зберіганні продукту для хатніх тварин. Вона може бути охолодженим продуктом або продуктом тривалого зберігання. Зазначені продукти для хатніх тварин можна виготовляти будь-яким відомим способом.

Композиція корму для хатніх тварин може, при необхідності, містити також пребіотик, пробіотичні мікроорганізми або інший активний агент, наприклад, довголанцюгову жирну кислоту. Кількість пребіотика в композиції корму для хатніх тварин, краще, складає менш ніж 10%мас. Наприклад, пребіотик може складати приблизно від 0,1% до 5%мас. від маси корму. Якщо корм містить цикорій як джерело пребіотика, то цикорій може додаватися таким чином, щоб його кількість у кормовій суміші становила приблизно від 0,5% до 10%мас, краще - приблизно від 1% до 5%мас.

Якщо використовується пробіотичний мікроорганізм, то 1 грам корму для хатніх тварин у кращому варіанті містить приблизно від 10^4 до 10^{10} клітин, краще - приблизно від 10^6 до 10^8 клітин пробіотичного мікроорганізму. Корм для хатніх тварин може містити приблизно від 0,5% до 20%мас. суміші пробіотичних мікроорганізмів, краще - приблизно від 1% до 6%мас, наприклад, приблизно від 3% до 6%мас.

При необхідності в корм для хатніх тварин додають мінеральні речовини й вітаміни так, щоб він був повністю збалансований по живильних речовинах. Крім того, у корм для хатніх тварин можна вводити, при необхідності, інші інгредієнти, наприклад, цукор, сіль, спеції, прянощі, ароматизатори і т.п.

Відповідно до іншого варіанта втілення можна приготувати живильні добавки, які поліпшують якість кормів для хатніх тварин. Ці живильні добавки можуть бути поміщені у капсулу або виготовлені у вигляді порошку й упаковані разом або окремо від основного корму, незалежно від того, вологий він або сухий. Як приклад, порошок, що містить екстракти відповідно до винаходу, може бути упакований в саше у вигляді порошку або введений до гелю чи ліпиду або іншого придатного носія. Ці окремо розфасовані добавки можна потім надавати разом з основним кормом або у багато-секційних упаковках для наступного використання разом з основним кормом або стравою, відповідно до інструкції для користувача.

Кількість корму, що має бути спожита хатньою твариною для досягнення необхідного ефекту, буде залежати від розмірів, виду й віку хатньої тварини. Однак, кількість корму для хатніх тварин, що забезпечує добову дозу приблизно від 0,5 до

5г висушених рослин на 1кг маси тіла тварини, звичайно буде адекватною для собак і кішок.

Введення людині або хатній тварині харчової композиції або композиції корму, як описано вище, приводить до поліпшення регенерації кісток при лікуванні переломів. Вона здатна стимулювати кісткоутворення, підвищувати мінеральну густину кістки на стадії росту та оптимізувати пікову масу кісток. Зокрема, вона може забезпечити оптимальний ріст кісток у дитячому віці. Зазначена харчова композиція допомагає запобігти розрідженню кісток, зокрема, розрідженню кісток, обумовленому віком, у ссавців, або розрідженню кісток, пов'язаному із тривалою госпіталізацією. Вона знижує небезпеку остеопорозу й поліпшує відновлення після перелому. Крім того, вона сприяє формуванню хрящів у ссавців, запобігає остеоартриту у людини й хатніх тварин, що приводить до підвищення активності або рухливості індивідуума.

Наведені нижче приклади даються лише з метою ілюстрації даного винаходу, однак їх не слід інтерпретувати як такі, що обмежують об'єкт даної заявки. Процентна кількість скрізь зазначена в %мас, якщо немає посилання на іншу розмірність. Прикладам передують стислий опис фігур.

Приклади

Приклад 1: Тести на кісткоутворення й резорбцію кісток

1. Кісткоутворення

91 екстракт піддавали скринінгу на кісткоутворення шляхом аналізу експресії репортерного гена для BMP-2 (кістковий морфогенний білок) і на резорбцію кістки за допомогою тесту на черепному склепінні (Calvaria Assay). Зазначені 91 екстракти були одержані з 30 різних рослин.

Матеріали й методи

- Приготування екстрактів для скринінг-анализу:

Подрібнену рослинну сировину знежирюють гексаном, потім екстрагують сумішшю спирту з водою з різним процентним вмістом води - від 10 до 90%, краще, 50%. Як спирт можна використати метиловий або етиловий спирти, одержуючи екстракт 1a.

Відбирають аликвотну кількість залишку зазначеного першого екстракту й проводять його ферментативний гідроліз із використанням α - і β -глюкозидаз. Замість ферментного гідролізу можна проводити кислотний гідроліз. Зазначений процес можна проводити у м'яких умовах (при кімнатній температурі) або в умовах зворотного холодильника при різній концентрації кислоти. Водну гідролізну фазу екстрагують незмішуваним розчинником, краще, етилацетатом, з одержанням екстракту 2a:

Екстракт можна висушити розпиленням або сублімацією або одержати в рідкому виді.

У деяких випадках можливе видалення поліфенолів шляхом обробки полівінілполіпіролідом (PVPP) для уникнення артефакту при скринінг-аналізі.

Після одержання екстрактів кожний екстракт зважують, повторно розчиняють у диметилсульфоксиді (DMSO) до кінцевої концентрації 20мг/мл і зберігають у вигляді аліквот при -20°C . Ці розчини використовують як маточні розчини, згодом розба-

вляючи їх у середовищах для кожного аналізу. У ході аналізів випробовували широкий спектр доз.

- Тест на кісткоутворення

BMP-2-люциферазний тест: активність екстрактів визначають з використанням клітин 2T3, які містять промотор BMP-2, функціонально зв'язаний з геном люцифери. Підвищення активності люцифери в клітинних лізатах відображає збільшення активності промотору BMP-2. Екстракти

випробовують при початковому розведенні 100мкг/мл з наступними двократними розведеннями до 0,2мкг/мл. Активність промотору BMP-2 визначають шляхом вимірювання активності люцифери в клітинних екстрактах.

13 рослин показали високий позитивний результат у стимулюванні експресії BMP-2 (Таблиця 1).

Таблиця 1

Латинська назва	Переклад англійської назви	Використовувана частина рослини	Концентрація мкг/мл	Активний екстракт/№
<i>Acorus calamus</i>	Аірний корінь (лепеха)	Кореневище	5	MeOH/вода/731
<i>Amelanchier ovalis</i>	Ірга круглолиста	Плоди	10	MeOH/вода/219
<i>Artemisia vulgaris</i>	Полінь звичайна/чорнобил	Надземні частини	10	Етилацетат/225
<i>Cyperus rotundus</i>	Смикавець круглий	Кореневище	10	Етилацетат/205
<i>Taraxacum officinalis</i>	Кульбаба звичайна	Листя	50	Етилацетат/750
<i>Lindera benzoin</i>	Ліндера (сімейство лаврові)	Надземні частини	50	Етилацетат/740
<i>Prunus persica</i>	Персик	Насіння	25	Етилацетат/772
<i>Glycine max</i>	Соя	Клітинні культури	50	Етилацетат/768
<i>Iris pallida</i>	Ірис садовий	Бульби	100	MeOH/вода/239
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Розмарин звичайний	Листя	50	MeOH/вода/2004 Етилацетат/2005
<i>Carvi</i>	Кмин	Насіння	25	Етилацетат/2074
<i>Thyme</i>	Чебрець	Листя	25	Етилацетат/2067
<i>Mentha spicata</i>	Мята	Листя	100	Етилацетат/2072
<i>Vitis vinifera</i>	Виноград	Ягоди	100	Етилацетат/2069

Прикладами нових препаратів тих же рослин та їхніх субфракцій, що стимулюють BMP-2, є:

Lindera benzoin, активний екстракт/№ етилацетат/740/2059; активна субфракція/№2060;

Taraxacum officinalis, активний екстракт/№ етилацетат/750/2034; активна субфракція/№2035;

Cyperus rotundus, активний екстракт/№ етилацетат/205/2011; активна субфракція/№ 2012, 2013;

Ins pallida, активний екстракт/№ MeOH/вода/239; активна субфракція/№760/762/2021,2022.

Субфракції одержують фракціонуванням на оберненофазових картриджах із силікагелем при

елюванні розчинниками різної полярності. Чисті ізофлавоїди сої - геністеїн та даїдзеїн (10^{-6} M) - стимулюють BMP-2, а естрадіол - ні.

Очевидно, індукція BMP-2 не обмежується естрогеноподібною активністю, оскільки вона стимулюється фітоестрогеном, але не самим естрогеном. Це означає, що активність фітоестрогена (такого як геністеїн або даїдзеїн) може опосередковуватися через неестрогенний механізм. Активність промотору BMP-2 не стимулюється естрадіолом, тому даний експеримент не потребує естрогенної активності рослинних сполук.

Рослина	Активний екстракт/№	Концентрація (мкг/мл)
<i>Glycine max</i>	Етилацетат/2001	10,50
<i>Rosmarinus officinalis</i>	MeOH/вода/2004	10,50
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Етилацетат/2005	10
<i>Cyperus rotundus</i>	Субфракція/2012	10,50
<i>Ins pallida</i>	Субфракція/2022	10
Чебрець	Етилацетат/2067	10
Кмин	Етилацетат/2074	10

Приклад кісткоутворення в органічній культурі черепного склепіння. Використаний метод описаний у [Science 286: 1946-1949 (1999)]. Екстракти оцінюють на 4 день в експериментах *in vitro* на черепному склепінні новонароджених мишей. Кістки інкубують з екстрактами протягом повних 4 днів. Кісткоутворення оцінюють гістологічним методом.

2. Резорбція кісток, тест на черепному склепінні

Здатність екстрактів, приготовлених відповідно до Приклада 1, інгібувати стимульовану IL-1 (10^{-10}) резорбцію кісток оцінюють за допомогою тесту на резорбцію кісток у новонароджених мишей. Кожний екстракт оцінюють за його здатністю

інгібувати резорбцію кісток у концентрації 10мкг/мл.

Екстракти з рослин, що показали позитивний результат, наведені у Таблиці 2.

Таблиця 2

Латинська назва	Переклад англійської назви	Використовувана частина рослини	Активний екстракт/№
<i>Amelanchier alnifolia</i>	Ірга вільхолиста	Плоди	Етилацетат/734
<i>Ocimum gratissimum</i>	Різновид василька	Листя	MeOH/вода/737
<i>Ocimum gratissimum</i>	Різновид василька	Листя	Етилацетат/738
<i>Carthamus tinctorius</i>	Сафлор фарбувальний	Насіння	Етилацетат/746
<i>Cyperus rotundus</i>	Смикавець круглий	Кореневище	Етилацетат/205
<i>Glycine max</i>	Соя	Клітинні культури	768

Перелічені рослини виявили активність у тесті на резорбцію кісток: *Amelanchier alnifolia*, *Ocimum gratissimum*, *Carthamus tinctorius* та *Glycine max*. *Cyperus rotundus* інгібував резорбцію кісток та індукував BMP-2.

Приклад 2: Вплив екстрактів рослин на ендогенну експресію BMP-2 у остеобластах людини

Рослини, що показали позитивні результати індукування BMP-2 у Прикладі 1, випробовувалися додатково на лінії клітин періосту/періостеобластів людини (hPOB-tert) й їхню здатність індукувати ендогенну експресію BMP-2. Даний тест на клітинах остеобластів підтвердив результати, одержані в Прикладі 1

Наприклад, обробка клітин hPOB-tert екстрактами *Lindera benzoin* (екстракт 740, 50мкг/мл) і *Cyperus rotundus* (екстракт 205, 10мкг/мл) протягом 48 год. стимулювала експресію BMP-2 у 3,8 та 2,8 рази, відповідно, у порівнянні з контролем (див. Фіг.1). Перевірку результатів тесту проводили з використанням ловастатину (0,5мкг/мл) як позитивного контролю, що показав індукцію BMP-2 у 2,5 рази.

Після досягнення стадії злиття клітини інкубують з 0,05 мкг/мл ловастатину або з екстрактами рослин. Загальну РНК екстрагують реагентом TRIzol (від фірми Gibco). 10мкг РНК піддають зворотній транскрипції, використовуючи набір 1st Stand cDNA Synthesis Kit (від фірми Boehringer). Послідовності кДНК BMP-2 ампліфікують у 35 циклах при температурі відпалу 55°C за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів (5': TTGCGGCTGCTCAGCATGTT; 3': CATCTTGATCTGTTCTCGGAA). Продукти полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) розділяють методом електрофорезу в агарозному гелі й проявляють шляхом фарбування бромистим етидієм. Їхню кількісну оцінку проводять за допомогою програмного забезпечення NIH Image, а результати нормують з використанням актину як гена «домашнього господарства».

Результати представлені на Фіг.1.

Резорбція кісток

Екстракти рослин, що показали позитивні результати в тесті на черепному склепінні, оцінювали повторно в другому тесті на резорбцію кісток, а саме, ямковому тесті (pit assay), з використанням змішаних кісткових клітин кролів, культивованих на зрізах кісток великої рогатої худоби [Tezuka K., et al., 1992, Biochem. Biophys.

Res. Commun. 186 (2): 911-917, та Lorget F., et al., 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 268(3): 899-903]. Резорбційні лунки візуалізують шляхом фарбування на TRAP (тартратрезистентна кисла фосфатаза). Позитивні клітини підраховують.

Порівняльна оцінка активності екстрактів у концентрації 10мкг/мл у двох тест-системах представлена на Фіг.2.

Приклад 3: Сухий корм для хатніх тварин

Кормова суміш складається з приблизно 58%мас. кукурудзи, приблизно 5,5%мас. кукурудзяної клейковини, приблизно 22%мас. кормового борошна з відходів переробки птаха, 2,5% сухого цикорію, близько 10% екстракту з бульби *Cyperus rotundus*, решта - солі, вітаміни й мінеральні речовини.

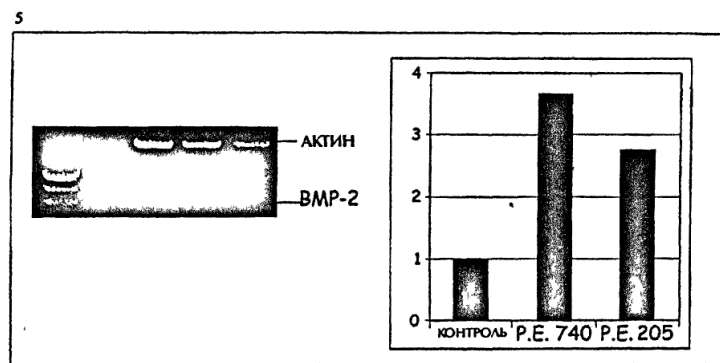
Кормову суміш подають в апарат для попереднього кондиціонування та зволожують. Вологий корм піддають екструзійному варінню та желатинуванню. Вихідну з екструдера желатиновану матрицю видавлюють через голівку екструдера. Екструдат нарізають на шматочки, зручні для згодовування собакам, висушують при приблизно 110°C протягом приблизно 20 хвилин і охолоджують, одержуючи гранули.

Одержаний сухий корм для собак мав позитивний вплив на здоров'я кісток і хрящів та збільшував їхню рухливість.

Приклад 4: Вологий консервований корм для хатніх тварин с добавкою

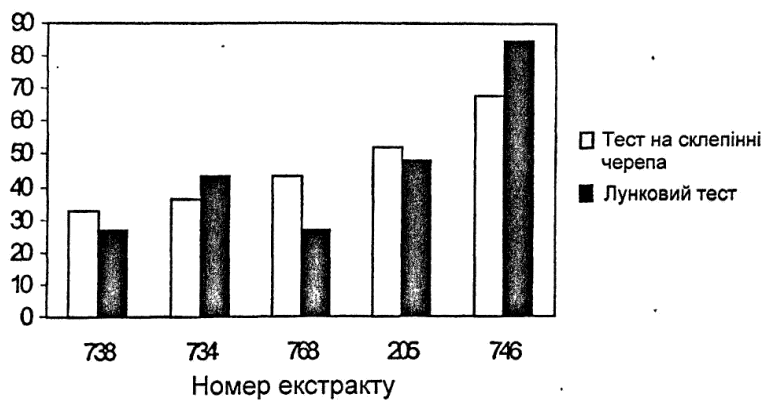
Готують суміш з 73% тушок птаха, свинячих легенів та яловичої печінки (подрібненої), 16% пшеничного борошна, 2% барвників, вітамінів і неорганічних солей. Одержану суміш емульгують при 12°C та екструдують у вигляді пудингу, який потім піддають варінню при температурі 90°C. Продукт охолоджують до 30°C і розрізають на шматки. 45% одержаних шматків змішують з 55% соусу, приготовленого з 98% води, 1% барвника та 1% гуарової камеді. Розфасовують в бляшані консервні банки і стерилізують при 125°C протягом 40хв.

Додаткова упаковка (наприклад, саше), містить 25г порошку з надземної частини *Cyperus rotundus* як добавку, призначену для додавання в щоденний раціон хатньої тварини. Відповідна кількість її для хатньої тварини становить, приблизно, 25г/добу; і вона може надаватися як додаток (наприклад, на кришці) до консервної банки.



ФІГ. 1

% інгібування



ФІГ. 2