



(51) МПК

A23L 1/30 (2006.01)*A23L 1/305* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014136858/13, 10.09.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.09.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.09.2014

(45) Опубликовано: 10.08.2015 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2338541 С1, 20.11.2008. RU 2222997
С1, 10.02.2004. KR 20080079038 А, 29.08.2008.
RU 2176893 С2, 20.12.2001

Адрес для переписки:

630091, г. Новосибирск, Красный пр-кт, 52,
НГМУ, патентоведу Никаноровой С.Н.

(72) Автор(ы):

Верещагин Евгений Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Верещагин Евгений Иванович (RU)

(54) БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА К ПИЩЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к пищевой промышленности. Биологически активная добавка (БАД) содержит 1-10% низкомолекулярной ДНК лососевых рыб, 40-60% аминокислоты глутамина, 0,01-0,05% фолиевой кислоты, 10-25% янтарной кислоты, 20-30% комплексообразователя арабиногалактана. При этом БАД получают путем механохимической обработки смеси вышеуказанных компонентов в следующем режиме: соотношение массы

обрабатываемой смеси и мелющих шаров равно 1/10, скорость вращения привода - 300-500 об/мин; время механической обработки - 5-15 мин. Изобретение позволяет получить БАД, оказывающую направленное действие на синтез нуклеиновых кислот и белков, улучшающую регенерацию тканей, восстанавливающую иммунитет, способствующую увеличению физической активности и выносливости. 1 з.п. ф-лы, 5 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01)*A23L 1/305* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2014136858/13, 10.09.2014**(24) Effective date for property rights:
10.09.2014

Priority:

(22) Date of filing: **10.09.2014**(45) Date of publication: **10.08.2015** Bull. № 22

Mail address:

**630091, g. Novosibirsk, Krasnyj pr-kt, 52, NGMU,
patentovedu Nikanorovoj S.N.**

(72) Inventor(s):

Vereshchagin Evgenij Ivanovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Vereshchagin Evgenij Ivanovich (RU)**(54) BIOLOGICALLY ACTIVE FOOD ADDITIVE**

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: biologically active additive contains 1-10% of low-molecular DNA of salmon fishes, 40-60% of glutamine amino acids, 0.01-0.05% of folic acid, 10-25% of amber acid, 20-30% of arabinogalactan complex forming agent. The biologically active additive is produced by way of the said components mixture mechanochemical treatment in the following mode: the weight ratio of the mixture treated to grinding balls is

equal to 1/10; the drive rotation rate is equal to 300-500 rpm; the mechanical treatment time is equal to 5-15 minutes.

EFFECT: invention allows to obtain a biologically active additive acting directly on nucleic acids and proteins synthesis, improving tissue regeneration, recovering the immune system, promoting enhancement of physical performance and stamina.

2 cl, 5 tbl, 4 ex

Изобретение относится к пищевой промышленности, оно позволяет получить диетический продукт, являющийся источником нуклеиновых и других органических кислот, который имеет направленное действие на синтез нуклеиновых кислот и белков, улучшение регенерации тканей, восстановление иммунитета, способствует увеличению физической активности и выносливости.

Известна биологически активная добавка (БАД) к пище «Биостим». БАД получена из семенников крупного рогатого скота, содержит нуклеиновые кислоты (из них около 98% составляет ДНК, 2% - РНК), выпускается в виде таблеток по 0,2 г. «Биостим» стимулирует функцию кроветворных органов, повышает до нормы показатели периферической крови (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты), сниженные в силу различных причин (кровопотеря, неблагоприятные факторы окружающей среды, в т.ч. ионизирующая радиация), стимулирует неспецифические факторы защиты организма, в частности, фагоцитарную активность нейтрофилов. «Биостим» применяют для профилактики и в комплексном лечении анемий, для реабилитации после перенесенных заболеваний, травм, хирургических операций и т.п. (Л.Н. Федянина, Н.Н. Беседнова, Л.М. Эпштейн, Т.К. Каленик, Ю.Г. Блинов // Тихоокеанский медицинский журнал, 2007, №4, стр. 9-12).

Известно, что при растворении в воде нуклеиновые кислоты набухают и образуют вязкие растворы коллоидного типа. Недостатком данного препарата является низкая эффективность, связанная с низкой растворимостью олигонуклеотидов в воде, и низкой биодоступностью препарата. Как следствие, эффективные дозы энтеральных препаратов на основе нуклеиновых кислот составляют около 500 мг/сутки.

Известен препарат «Деринат», представляющий собой высокоочищенный натрия дезоксирибонуклеат (Sodium deoxyribonucleate). Препарат обладает широким спектром действия, рекомендован при следующих заболеваниях: миелодепрессия и резистентность к цитостатикам у онкологических больных, острый фарингеальный синдром, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, гастродуодениты, ИБС, сердечно-сосудистая недостаточность, хроническая ишемическая болезнь нижних конечностей II и III стадии, простатит, вагинит, эндометрит, бесплодие и импотенция, вызванные хроническими инфекциями, хронический обструктивный бронхит (Чернов В.Н., Шарковская Т.Е. Применение отечественного препарата деринат в лечении больных с трофическими язвами нижних конечностей // Биомедицина, 2006, №3, т. 1, стр. 87-88).

Недостатком препарата является то, что он используется в виде инъекционной формы. В курсе лечения предусмотрено от 5 до 10 внутримышечных инъекций. Возможна гиперчувствительность, гипертермия, аллергические реакции.

Раскрытие изобретения

Задачей данного изобретения являлось создание композиции на основе нуклеиновых кислот, обладающей высокой эффективностью, однако лишенной побочных действий. Чтобы удовлетворять этим требованиям, композиция должна обладать высокой растворимостью, а также в композицию необходимо ввести новые компоненты, улучшающие усвоение олигонуклеотидов и усиливающие действие нуклеиновых кислот.

Предлагаемая биологически активная добавка к пище представляет собой композицию, содержащую ДНК, глютамин, фолиевую кислоту, янтарную кислоту и арабиногалактан при следующем соотношении компонентов: низкомолекулярная ДНК лососевых рыб - 1-10%, аминокислота глютамин - 40-60%, фолиевая кислота - 0,01-0,05%, янтарная кислота - 10-25%, комплексообразователь арабиногалактан - 20-30%.

Все компоненты смеси используются в виде сухого порошка.

С целью создания водорастворимых комплексов проводят механохимическую

обработку смеси в следующем режиме:

загрузка обрабатываемого материала по отношению к загрузке мелющих тел - 1:10 (1 массовая часть обрабатываемой смеси и 10 массовых частей мелющих шаров);

- скорость вращения привода - 300-500 об/мин;

5 - время механической обработки - 5-15 мин.

Полученная смесь имеет вид мелкодисперсного порошка серого цвета с размером частиц 0,01-0,001 мм, хорошо растворима в воде, стабильна при хранении.

Сравнение показателей качества композиций, полученных при различной длительности механохимической обработки (оптимизируемый параметр), показало, что при длительности процесса более 15 минут происходит химическое разложение нуклеиновых кислот и арабиногалактана, в результате чего их содержание снижается на величину менее 80% от теоретической. При длительности механохимического процесса менее 5 минут растворимость обработанной смеси достоверно не отличается от растворимости в воде простой смеси арабиногалактана и ДНК.

15 Предложенная нами композиция отличается от вышеуказанных аналогов тем, что в ее состав, кроме нуклеиновых кислот, входят глютамин, фолиевая и янтарная кислоты, оказывающие синергичное действие на синтез нуклеиновых кислот и белка, а также тканевое дыхание и энергетический обмен, что отражается в ускоренной регенерации и восстановлении клеточного состава (пример 5).

20 Предложенная композиция отличается от аналогов также тем, что имеет в своем составе арабиногалактан, который в результате механохимической активации образует водорастворимые комплексы с гидрофобными соединениями общей формулы R2-R1-R2, где:

R1 - гидрофобные соединения (нуклеиновые кислоты, глютамин, фолиевая кислота),

25 R2 - комплексующийся за счет Ван-дер-Ваальсовых сил с гидрофобными соединениями арабиногалактан.

Предложенная композиция по сравнению с энтеральными аналогами обладает более высокой растворимостью (пример 1) и эффективностью (примеры 3, 4, 5), а по сравнению с инъекционными аналогами - высокой безопасностью. Она оказывает направленное действие на синтез нуклеиновых кислот и белков, улучшает регенерацию тканей, восстанавливает иммунитет, способствует увеличению физической активности и выносливости.

Примеры

35 Пример 1. Смесь компонентов (низкомолекулярной ДНК лососевых рыб, глютамина, фолиевой кислоты, янтарной кислоты, арабиногалактана) подвергается механохимической обработке в следующем режиме:

- загрузка обрабатываемого материала - 0,2 кг;

- загрузка мелющих тел - стальных шаров диаметром 12 мм - 2 кг;

- скорость вращения привода - 500 об/мин;

40 - время механической обработки - 7 мин.

После проведения обработки в данном режиме конечный размер полученной фракции составил 0,01-0,001 мм, растворимость в воде полученной композиции при комнатной температуре составила 96%.

45 Пример 2. Для получения заявляемой композиции ингредиенты смешивают в следующем соотношении, мас. %: низкомолекулярная ДНК лососевых рыб (5%), аминокислота глютамин (50%), фолиевая кислота (0,05%), янтарная кислота (20%), комплексообразователь арабиногалактан (до 100%), после чего смесь подвергают механохимическому воздействию.

Пример 3. Проведено исследование влияния предлагаемой композиции на восстановление синтеза белка и обмена нуклеиновых кислот у больных с алиментарным дефицитом.

Критерии включения пациентов в исследование: пациенты обоих полов с рубцовым сужением пищевода или ахалазией пищевода, нуждающиеся в коррекции диеты в связи со снижением массы тела; возраст от 18 до 45 лет.

Для оценки нутритивного статуса (НС) использовали клинические и лабораторные методы: анамнестические данные, рост, массу тела, скорость потери массы тела (чем быстрее пациент теряет массу тела, тем выраженнее степень нутритивной недостаточности), расчет идеальной массы тела (ИдМТ) по формуле Лоренца $(X-100-(X-150)/2)$, где X - взятое в сантиметрах числовое значение роста), расчет индекса Кетле (индекс Кетле (масса/рост) = масса тела (кг) / возведенный в квадрат рост пациента в м), дефицит массы тела (ДМТ) от ИдМТ. Учитывались данные определения абсолютного числа лимфоцитов (АЧЛ), содержания в плазме крови общего белка (ОБ), альбумина (Алб), трансферрина (Тр). Обмен нуклеиновых кислот (НК) оценивали по уровню ДНК в сыворотке.

У всех пациентов изменения нутритивного статуса были очевидны вследствие дефицита массы тела - $9,6\% \pm 1,4$.

Исходные концентрации трансферрина и ДНК в сыворотке крови были низкими у всех пациентов. В частности, средние уровни Тр и ДНК были в диапазоне $1,3-1,7 \text{ г/л} \pm 0,1-0,07 \text{ г/л}$ и $0,8-0,9 \text{ нг/мл} \pm 0,06-0,1 \text{ нг/мл}$ соответственно.

Были сформированы две группы пациентов. Распределение по группам было осуществлено слепым случайным способом.

Первую группу составили пациенты (n=11) с традиционной методикой ведения: пациенты питались обычной пищей через гастростому или разбужированный пищевод. Во второй выборке (n=12) пациенты питались также через гастростому или через разбужированный пищевод, причем в обычное питание включалась заявленная композиция в течение 7-10 суток. Доза ДНК составила 50 мг/сутки, общая масса композиции 2 г/сутки.

30

35

40

45

Таблица 1. Нутритивный статус пациентов по клинико-лабораторным данным.

Группы	Первая группа (n = 11)	Вторая группа (n = 12)
5 Параметры нутритивного статуса		
ДМТ, % от ИдМТ (1-е сутки)	7,3 ± 1,2	7,12 ± 1,78
10 ДМТ, % от ИдМТ (7-е сутки)	7,1 ± 1,1	6,9 ± 1,5
Индекс Кетле (N 20 – 25), 1-е сутки	21,6 ± 0,5	24,15 ± 1,24
Общий белок (N 65 – 75 г/л), 1-е сутки	72,14 ± 0,7	72,34 ± 0,85
15 Альбумин (N 35 – 45 г/л)	37,9 ± 0,9	40,5 ± 0,7
АЧЛ (N 1,8 – 3,5 * 10 ⁹ /л), 1-е сутки	1,25 ± 0,09	1,22 ± 0,11
АЧЛ, 7-е сутки	2,15 ± 0,07	2,92 ± 0,12*
20 Трансферрин исходный (N 2-3,5 г/л)	1,4 ± 0,15	1,37 ± 0,06
Трансферрин, 7-е сутки	1,81 ± 0,15	2,6 ± 0,1*

* – $p < 0,002$ в сравнении с 1-ой группой; Нормальные значения (N) указаны в скобках.

25

Таким образом, индекс Кетле, общий белок крови и концентрация альбумина в сыворотке крови оказались малоинформативны у данных больных. Согласно современным установкам уровни ОБ и Алб действительно не являются абсолютным ориентиром при оценке нутритивного статуса, прежде всего вследствие лабильности концентрации в сыворотке крови и зависимости от водного баланса. Более информативны концентрация Трансферрина и ДНК сыворотки крови. У пациентов обеих групп имел место дефицит Трансферрина, указывающий на тяжелую нутритивную недостаточность (НН) (1,37±0,06-1,4±0,15). Через 7 дней после начала питания уровень Трансферрина увеличился в первой группе до 1,81±0,15, однако это увеличение является статистически недостоверным. При этом в 2-й группе на фоне введения заявляемой композиции концентрация Трансферрина была достоверно выше к 7-му дню как по сравнению с исходными цифрами, так и по сравнению с аналогичными значениями в 1-й группе и составила 2,6±0,1 ($p < 0,05$).

30

35

Для оценки обмена нуклеиновых кислот у пациентов первой и второй групп (всего 40 23 пациента от 20 до 65 лет мужского и женского пола с диагнозом ахалазия пищевода или рубцовое сужение пищевода) определили концентрацию ДНК сыворотки крови на всех этапах исследования (табл. 2).

45

Таблиц 2. Динамика содержания ДНК в сыворотке крови (нг/мл)
при использовании заявляемой композиции.

Этапы исследования	1 группа (n = 11)	2 группа (n = 12)
Исходное состояние	0,50 ± 0,10	0,97 ± 0,06
3-и сут.	1,13 ± 0,18	72,37 ± 4,95*#
7-е сут.	0,82 ± 0,24	84,51 ± 2,50*#

* – $p < 0,0001$ при сравнении динамики концентрации ДНК во 2-й группе (по кр. Фридмана); # – $p < 0,0001$ при сравнении показателей 1-й и 2-й групп (по крит. Манна-Уитни)

При анализе результатов у пациентов первой группы зарегистрирован глубокий дефицит содержания ДНК (для сравнения, у здоровых доноров нормальные значения ДНК сыворотки крови составляют 10-60 нг/мл) в сыворотке крови на протяжении всех 7 дней наблюдения. Вместе с тем во второй группе после назначения в стандартной схеме нутритивной поддержки в виде заявляемой композиции содержание ДНК в сыворотке крови возросло в десятки раз (табл. 2). Это объясняется зависимостью синтеза нуклеиновых кислот от потребления глутамина, фолиевой кислоты и низкомолекулярных олигонуклеотидов.

Таким образом, при включении заявляемой композиции в нутритивную поддержку пациентов с алиментарным дефицитом отмечено быстрое достоверное восстановление уровней Трансферрина и ДНК сыворотки крови, являющихся основным критерием эффективности белкового обмена и обмена нуклеиновых кислот. Заявленная композиция обладает достоверным анаболическим эффектом даже у пациентов с исходными нарушениями обмена нуклеиновых кислот.

Пример 4. Оценка физической работоспособности с помощью гарвардского степ-теста.

После окончания дозированной физической нагрузки испытуемый отдыхает сидя. Начиная со 2-й минуты у него 3 раза по 30-секундным отрезкам времени подсчитывается ЧСС: с 60-й до 90-й, со 120-й до 150-й и со 180-й до 210-й секунды восстановительного периода. Значения этих трех подсчетов суммируются и умножаются на 2 (перевод из уд/30 с в уд/мин). Результаты тестирования выражаются в условных единицах в виде индекса гарвардского степ-теста (ИГСТ), величина которого рассчитывается из уравнения:

$$\text{ИГСТ} = T(100/(f_2 + f_3 + f_4)) \times 2,$$

где T - фактическое время выполнения физической нагрузки в секундах; f₂, f₃, f₄ - сумма ЧСС за первые 30 с каждой (начиная со 2-й) минуты восстановительного периода.

Оценка результатов тестирования. Величина ИГСТ характеризует скорость восстановительных процессов после напряженной физической нагрузки и оценивается по шкале. Чем быстрее восстанавливается ЧСС после степ-теста, тем меньше величина f₂+f₃+f₄ и, следовательно, выше ИГСТ. Оценка физической работоспособности по результатам гарвардского степ-теста (Карпман В.Л. и др. // Тестирование в спортивной медицине. М.: ФиС, 1988. 120 с.) в ИГСТ, ед.:

- меньше 55 - плохой результат,
- 55-64 - ниже среднего,
- 65-79 - средний результат,

80-89 - хороший,

90 и больше - отличный результат.

В опытную группу входило 9 человек мужского пола в возрасте 25-40 лет. Заявленная композиция принималась в дозе 2000 мг (в пересчете на ДНК - 50 мг) утром, за 15 мин до еды 1 раз в сутки ежедневно на протяжении всего периода исследования.

В группу сравнения входило 10 человек мужского пола в возрасте 25-40 лет. Композиция ДНК + глютамин + фолиевая кислота + янтарная кислота + арабиногалактан в аналогичных весовых соотношениях, но не подвергнутая механохимическому воздействию принималась также в дозе 2000 мг (в пересчете на ДНК - 50 мг) утром, за 15 мин до еды 1 раз в сутки.

Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3. Значения гарвардского степ-теста (в ИГСТ, ед.) при использовании заявленной композиции

Группа	1-й день	7-й день	14-й день	30-й день
Сравнения	69±5	67±6	73±4	75±4
Опытная	67±4	77±6	85±4	89±3*

* $P < 0.05$ по сравнению с 1-м днем

Таким образом, простая смесь компонентов не приводила к достоверному увеличению выносливости/работоспособности. Использование заявленной композиции в указанной дозе достоверно увеличивало работоспособность/выносливость уже через 30 дней после начала приема.

Пример 5. Эффект заявленной композиции на восстановление костного мозга и уровень лимфоцитов у мышей после воздействия цитостатиком.

Миелосупрессия у самцов мышей СВА/CaLac (масса тела 20-25 г) осуществлялась однократным введением фторурацила (5-ftoruracil) в дозе 150 мг/кг массы тела.

Были сформированы следующие группы исследования:

- интактные животные (7 особей),
- контрольная группа животных (7 особей). После воздействия фторурацилом вводили физиологический раствор,
- опытная группа 1 (7 особей): животных после однократного воздействия фторурацилом каждый день однократно поили раствором, содержащим 30 мг/кг низкомолекулярной ДНК лососевых рыб,
- опытная группа 2 (7 особей): животных после однократного воздействия фторурацилом ежедневно, на протяжении всего периода наблюдения, поили один раз в день раствором, содержащим смесь нижеуказанных компонентов без механохимической обработки смеси: низкомолекулярная ДНК лососевых рыб - 2,5%, аминокислота глютамин 57,97%, фолиевая кислота 0,03%, янтарная кислота 14%, арабиногалактан 25,5%. Общая доза ДНК - 30 мг/кг,
- опытная группа 3 (7 особей): животных после однократного воздействия фторурацилом ежедневно поили раствором, содержащим прошедшую механохимическую обработку согласно примеру 1 смесь: низкомолекулярная ДНК лососевых рыб - 2,5%, аминокислота глютамин 57,97%, фолиевая кислота 0,03%, янтарная кислота 14%, арабиногалактан 25,5%. Общая доза ДНК 30 мг/кг.

Оценивалось содержание лимфоцитов в периферической крови и костном мозге. Результаты приведены в табл. 4 и табл. 5.

Таблица 4. Содержание лимфоцитов в периферической крови у мышей, подвергнутых воздействию 5-фторурацила.

Группа	Исходные значения (%)	3 сутки	7	14
Интактные	100	100	100	
Контроль	100	25	30	52
Низкомолекулярная ДНК лососевых рыб, 30 мг/кг per os (опытная группа 1)	100	30	40	60
Опытная группа 2	100	30	50*	85*
Опытная группа 3	100	50*	80 [#]	140 [#]

* P < 0.01 по сравнению с контрольной группой

P < 0.01 по сравнению с группой 2

Таблица 5. Содержание лимфоцитов в костном мозге у мышей, подвергнутых воздействию 5-фторурацила.

Группа	Исходные значения (%)	3 сутки	7 сутки	14 сутки
Интактные	100	100	100	100
Контроль	100	20	28	56
Низкомолекулярная ДНК лососевых рыб, 30 мг/кг per os (опытная группа 1)	100	34	45	62
Опытная группа 2	100	33	52*	87*
Опытная группа 3	100	54*	86 [#]	152 [#]

* P < 0.01 по сравнению с контрольной группой

P < 0.01 по сравнению с группой 2

Из табл. 4 и 5 видно, что низкомолекулярная ДНК обладает положительным эффектом на скорость восстановления костного мозга и уровня лимфоцитов периферической крови у мышей. Добавление органических кислот глутамина, фолиевой кислоты и янтарной кислоты потенцирует данное действие ДНК. Наиболее выраженным действием обладал комплекс, подвергнутый механохимической обработке. Достоверный миелостимулирующий эффект в этой группе отмечен уже на 3 сутки после введения 5-фторурацила. На 14 сутки отмечена гиперкоррекция с лимфоцитозом, тогда как в контрольной группе уровень лимфоцитов достиг только 52% от исходных значений. К 14 суткам в группе 5 достигнута достоверная разница по сравнению со всеми другими опытными группами. Таким образом, доказано, что низкомолекулярная ДНК наиболее эффективна в комплексе с арабиногалактаном, а также обладающими синнергичным действием глутамином, фолиевой кислотой и янтарной кислотой после механохимической обработки смеси.

Формула изобретения

1. Биологически активная добавка (БАД) к пище, включающая ДНК, отличающаяся тем, что дополнительно содержит глютамин, фолиевую кислоту, янтарную кислоту и арабиногалактан при следующем соотношении компонентов: низкомолекулярная ДНК лососевых рыб - 1-10%, аминокислота глютамин - 40-60%, фолиевая кислота - 0.01-0,05%, янтарная кислота - 10-25%, комплексообразователь арабиногалактан - 20-30%, причем БАД получают путем механохимической обработки смеси вышеуказанных компонентов в следующем режиме: соотношение массы обрабатываемой смеси компонентов и мелющих шаров равно 1/10, скорость вращения привода - 300-500 об/мин; время механической обработки - 5-15 мин.
2. БАД к пище по п. 1, отличающаяся тем, что она представляет собой мелкодисперсный порошок с размером частиц 0,01-0,001 мм.

15

20

25

30

35

40

45