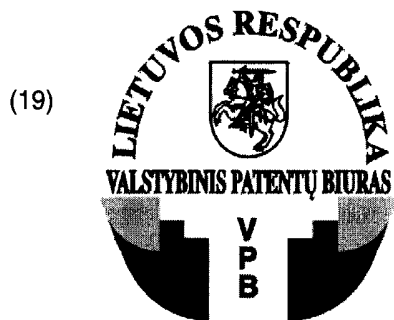




(10) **LT 5340 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **5340** (51) Int. Cl. (2006): **A61K 36/00**

(21) Paraiškos numeris: **2005 071**

(22) Paraiškos padavimo data: **2005 08 12**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2006 02 27**

(45) Patento paskelbimo data: **2006 05 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/BG03/00043**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2003 12 11**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2005 08 12**

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Roika GYULEMETOVA, BG

Daniela SHOPOVA, BG

Valentin DIMOV, BG

(73) Patento savininkas:

SOPHARMA AD, 16, „Iliensko Shose“ Str., 1220 Sofia, BG

(74) Patentinis patikėtinis:

**Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B,
Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

Standartizuotas steroidinių saponinų mišinys, jo gavimo būdas ir taikymas

(57) Referatas:

Išradimas susijęs su standartizuotu steroidinių saponinų mišiniu, gautu iš antžeminės *Tribulus terrestris* L. dalies, turinčiu daugiau nei 80 procentų furostanolio saponinų, jo gavimo būdu ir jo, kaip imunostimuliatoriaus ir imunomoduliatoriaus, panaudojimu.

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas yra susijęs su standartizuotu steroidinių saponinų mišiniu, gaunamu iš antžeminės *Tribulus terrestris* L. dalies, skirtu gaminti vaistams, pasižymintiems jau žinomu afrodiziakų veikimu, šalia naujų vaisto indikacijų. Išradimas taip pat yra susijęs su standartizuoto steroidinių saponinų mišinio, gaunamo iš antžeminės *Tribulus terrestris* L. dalies, gavimo būdu.

IŠRADIMO PRIELAIIDOS

Standartizuoto steroidinių saponinų mišinio, gaunamo iš antžeminės *Tribulus terrestris* L. dalies, gavimo būdas yra žinomas (BG patentas 52085); šis būdas susideda iš augalinės medžiagos ekstrahavimo, naudojant iki 70 proc. žemesniojo alkoholio, konkrečiai, etanolio, tirpalą, po to apdorojimo chloroformu ir ekstrahavimo iš vandeninio tirpalo, naudojant vandeniu prisotintą n-butanolį, po to butanolio ekstraktas sukonzentruojamas iki 1/8 tūrio, ir taip gauta liekana atskiriama ir išdžiovinama, o motininių tirpalų liekana ištirpinama vandenyje ir pridedama tiesiog į chloroformu apdorojamą vandeninį tirpalą. Pagal aprašytus pavyzdžius, taip gaunamas standartizuotas mišinys, turintis 50-55 procentus furostanolio saponinų, skaičiuojant protodioskino pagrindu. Išeiga yra 1,7-2 proc., priklausomai nuo saponinų kiekio augalinėje medžiagoje.

Problema, kurią šis išradimas išsprendė, yra ekstrahavimas iš antžeminės *Tribulus terrestris* L. dalies medžiagos, turinčios didelius kiekius furostanolio saponinų, kurie gali būti panaudoti naujų vaistų su naujomis indikacijomis gamyboje.

SMULKUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Pagal šį išradimą problema išspręsta gaunant standartizuotą steroidinių saponinų mišinį, turintį 80 procentų furostanolio saponinų. Gavimo būdas susideda iš to, kad susmulkintą augalinę medžiagą ekstrahuoja vandeninio metanolio tirpikliu, vandens/metanolio santykiui esant nuo 1:1 iki 1:99, 52-55 °C temperatūroje. Po to ekstraktas veikiamas aktyvinta anglimi ir, nufiltravus vakuume, koncentruojamas pilnai pašalinant metanolį. Vandeninis koncentratas toliau ekstrahuojamas metileno

chloridu. Tada metileno chloridas nudistiliuojamas ir regeneruojamas tolesniam panaudojimui šiame būde. Išgrynintas vandeninis tirpalas parūgštinamas hidrochlorido rūgštimi iki pH 4 ir žinomu būdu ekstrahuojamas vandeniu prisotintu n-butanoliu. Butanolio ekstraktas praplaunamas natrio chlorido tirpalu ir sukonzentruojamas vakuume, kad gautų sausą liekaną, kuri ištirpinama žemesniajame alkoholyje. Po to arba koncentratą sulašina į acetoną ir palieka 10-15 °C temperatūroje maždaug 24 val., po to filtruoja, praplauna acetonu ir išdžiovina, arba praplauna 0,5-1,5 proc. natrio hidroksido tirpalu ir, atskyrus sluoksnius, butanolio sluoksnį praplauna vandeniu iki pH 7, po to sukonzentruoja butanolio ekstraktą iki pilno organinio tirpiklio pašalinimo, o vandeninį tirpalą išdžiovina. Tokiu būdu gauna minkštus ir purius šviesiai geltonus miltelius, turinčius daugiau nei 80 procentų furostanolio saponinų. Išeiga yra maždaug 3 procentai, skaičiuojant nuo ore išdžiovintos augalinės medžiagos.

Šis naujas produktas, turintis daugiau nei 80 procentų furostanolio saponinų gali būti panaudotas naujų vaistų, pasižyminčių imunomoduliuojančiu ir/arba imunostimuliuojančiu poveikiu, gavimui.

PAVYZDŽIAI

1 pavyzdys

Viena tona susmulkintos augalinės medžiagos ekstrahuojama 50 °C temperatūroje, naudojant 70 proc. metanolio vandeninį tirpalą iki pilno išekstrahavimo. Ekstraktas nusiurbiamas, tada į jį pridedama aktyvintos anglies ir praleidžiama per filtro presą. Taip gautas vandeninis koncentratas tris kartus ekstrahuojamas metileno chloridu santykiu 1:2, 1:1 ir 1:1, atitinkamai. Organinis tirpiklis nudistiliuojamas ir regeneruojamas, o distiliacijos liekana išmetama. Išgrynintas vandeninis ekstraktas parūgštinamas hidrochlorido rūgštimi iki pH 4 ir aštuonis kartus ekstrahuojamas vandens n- butanolio mišiniu santykiu 1:1. Butanolio ekstraktai praplaunami 5 proc. natrio chlorido tirpalu ir koncentruojami vakuume 60 °C temperatūroje iki sausos liekanos, po to ištirpinama metanolyje. Mišinys lėtai sulašinamas į acetoną, paliekamas 10 oC temperatūroje 20 val. ir pabaigoje filtruojamas per Nutch filtrą, praplaunamas acetonu ir išdžiovinamas.

Gaunami šviesiai geltoni milteliai, turintys 85 proc. furostanolio saponinų. Išeiga yra 3 proc., skaičiuojant nuo ore išdžiovintos augalinės medžiagos.

Produkto analizė atliekama pagal protodioskiną (R. Gyulemetova, M. Tomova, M. Simova, T. Pagarova, Pharmazie, 37 H.4 1982).

2 pavyzdys

Viena tona susmulkintos augalinės medžiagos ekstrahuojama 50 °C temperatūroje, naudojant 70 proc. metanolio vandeninį tirpalą iki pilno išekstrahavimo. Ekstraktas nusiurbiamas, tada į jį pridedama aktyvintos anglies ir praleidžiama per filtro presą. Taip gautas vandeninis koncentratas tris kartus ekstrahuojamas metileno chloridu santykiu 1:2, 1:1 ir 1:1, atitinkamai. Organinis tirpiklis nudistiliuojamas ir regeneruojamas, o distiliacijos liekana išmetama. Išgrynintas vandeninis ekstraktas parūgštinamas hidrochlorido rūgštimi iki pH 4 ir aštuonis kartus ekstrahuojamas vandens n- butanolio mišiniu santykiu 1:1. Butanolio ekstraktai praplaunami 1 proc. natrio hidroksido tirpalu, kai šarminio vandens santykis su butanolio ekstraktu yra 1:1 ir, atskyrus du sluoksnius, butanolio sluoksnis praplaunamas vandeniu iki pH 7. Po to butanolio ekstraktai koncentruojami vakuume iki pilno organinio tirpiklio pašalinimo, po ko vandeninis tirpalas išdžiovinamas.

Gaunami šviesiai geltoni milteliai, turintys 85 proc. furostanolio saponinų. Išeiga yra 3 proc., skaičiuojant nuo ore išdžiovintos augalinės medžiagos.

Produkto analizė atliekama pagal protodioskiną (R. Gyulemetova, M. Tomova, M. Simova, T. Pagarova, Pharmazie, 37 H.4 1982).

IŠRADIMO STEROIDŲ MIŠINIO ĮTAKOS EKSPERIMENTINIŲ GYVULIUKŲ IMUNINEI SISTEMAI TYRIMŲ REZULTATAI

Medžiagos ir metodai

Augalinė medžiaga

Medžiaga, turinti furostanolio saponinų (FS), išskirta iš *Tribulus terrestris L.* (*Zigophyllaceae*) pagal šį išradimą. Liofilizuoti FS laikomi 4 °C temperatūroje saugant nuo šviesos ir drėgmės. Tirpalas, naudotas eksperimentuose, paruoštas fiziologiniame tirpale *ex tempore*.

Eksperimentiniai gyvuliukai ir tyrimų protokolas

ICR pelių patinėliai (vidutinė kūno masė 18-20 g) gavo įvairias FS dozes peroraliai, sutinkamai su 1 lentelėje pateiktu aprašymu.

Eksperimentinė infekcija

Eksperimentinė infekcija pelėms sukelta inokuliuojant po oda 25-30 bakterines ląsteles iš *Kl. Pneumoniae* kultūros, augintos 18 val. agaru (kamienas Nr. 52145, Pastero institutas, Paryžius). Užkrato dozė parinkta po preliminarių eksperimentų, siekiant nustatyti 50 proc. išgyvenimo santykį. Infekcija stebima aštuonias dienas, atsižvelgiant į subjekto bendrą būklę, mirtingumo procentą, išgyvenimo procentą ir vidutinę išgyvenimo trukmę (ASR_8 , dienomis). Apsauginis FS efektas įvertintas pagal išgyvenimo santykio ir vidutinės išgyvenimo trukmės padidėjimą, apskaičiuotą kaip skirtumą tarp eksperimentinės ir kontrolinės grupių.

In-vitro antibakterinio inhibavimo testas

Kl. Pneumoniae ląstelių jautrumas FS nustatytas naudojant pritaikytą Bauer metodo (Bauer, A.W., Kirby W.M.M., Sherris, J.C., Truck, M. (1966) Am. J. Clin.) versiją. Petri lėkštelės (100 mm) su agaru inokuliuotos 0,2 ml bakterijų suspensija (10 ląstelių/ml). Padaryti šulinėliai (10 mm) užpildyti 0,2 ml įvairios koncentracijos FS tirpalu. Inhibuoti plotai išmatuoti po 24 val. inkubavimo 37 °C temperatūroje. Teigiama kontrole naudotas keflinas (Lilly, JAV), esant minimaliai inhibavimo koncentracijai 0,150 mg/ml.

Alveolinių makrofagų aMa fagocitinis ir mikrobicidinis aktyvumas

Alveoliniai Ma gaunami *in situ* plaučių išplovime, suleidžiant ir ištraukiant 0,1-1,0 ml TCM 199 tirpalo, turinčio 20 mM HEPES, 100 U/ml penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino (Flaw Lab., JK) plus 3 U/ml heparino (G. Richter, Vengrija). Kiekvienoje grupėje nustatytas vidutinis kiekis išplautų aMa ir tada ląstelės užneštos ant inkubavimo plokštelių (BDSL, Škotija), koncentracija 3×10^5 ląstelių/ml jų fagocitinio ir mikrobicidinio aktyvumo įvertinimui H^3 -timidino radiometrinio metodu (Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V.V., Nikolov N., Popov, S. (1991) Apidologie 22, 155).

REZULTATAI

Priešinfekcinis apsauginis poveikis

Gauti rezultatai rodo, kad FS įtakoja eksperimentinės pelės sukeltos *Kl. Pneumonia* infekcijos eigą ir baigtį. Gydytuose gyvuliukuose mirtingumas pasiekė maksimalią 30-40 procentų reikšmę 4-5-tą dieną nuo infekcijos pradžios (Fig. 1). Mirtingumo maksimumas kontrolinėje grupėje buvo žymiai didesnis (70-80 proc.) ir buvo stebimas 2-3-ią dieną nuo infekcijos pradžios. Apibendrinant, FS sąlygoja

gydytų gyvuliukų švelnesnę klinikinę eigą, mažesnę mirtingumo procentą, ilgesnį išgyvenimo laiką.

FS priešinfekcinis poveikis kinta priklausomai nuo dozės ir skyrimo grafiko (1 lentelė). Didžiausia skirta dozė (625,0 mg/kg) pademonstravo stipriausią apsauginį poveikį visuose 10 dienų skyrimo grafikuose, pradedant 35, 25 arba 15 dienų prieš infekciją; poveikio maksimumas stebėtas, kai paskutinė FS dozė buvo įvesta 15-tą dieną prieš infekciją.

Priešingai žymiam *in-vivo* aktyvumui, FS nedemonstruoja antibakterinio aktyvumo *in-vitro*. FS tirpalas fiziologiniame serume, esant 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 2,0, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 100,0, 250,0 ir 500,0 mg/ml koncentracijoms, neslopino *Kl. Pneumoniae* augimo, skirtingai nuo ženklaus slopinimo, stebėto Keflin grupėje, vidutiniame $21,5 \pm 1,0$ mm plote.

aMa stimuliavimas

625,0 mg/kg dozės sąlygojo aMa skaičiaus ir fagocitinio bei mikrobicidinio aktyvumo padidėjimą, maksimaliai reikšmei esant 20-tą dieną nuo FS paskutinio pavartojimo (2 lentelė).

APTARIMAS

Priešingai nei kiti saponinai (Cambell, J.B., Bede J.C. (1989) E.A.G. Lett., 5, 12), FS nedemonstruoja baktericidinio poveikio. FS veikia pagrindinius ląstelės efektorinius mechanizmus ir humoralinį imunitetą, tokiu būdu suteikdami ženklią apsaugą nuo infekcijos. Optimali 625,0 mg/kg dozė, įvedama per 10 dienų seką, yra labai artima grafikui, naudotam žmonių atveju (Zarkova, S. (1984) Rev.Port. Cienc. Veter., 79, 117). Stipriausias apsauginis efektas, gautas pagal grafiką, kai laiko tarpas tarp paskutinio FS pavartojimo ir infekcijos yra 15 dienų, gali būti paaiškintas aMa aktyvavimo dinamika. Jų funkcinio aktyvumo maksimalus padidėjimas stebimas 20-tą dieną, kas sutampa su ūmia infekcijos faze (3-5 diena). Didelis skaičius aMa su padidintu fagocitiniu ir mikrobicidiniu aktyvumu užkertą kelią infekcijos pasunkėjimui ir sumažina mirtingumo procentą, tuo pat metu padidinant išgyvenimo procentą. Paprastai apsauginis FS poveikis pilnai pasiekiamas tik po tam tikro laiko tarpo, reikalingo, kad sureaguotų imuninė sistema. FS aktyvuoja aMa, kurie vaidina svarbų vaidmenį plaučių antibakterinėje apsaugoje, ypač valdant infekcijas, sąlygotas

prisitaikančių patogenų, tokių kaip Kl. Pneumoniae (Zarkova, S. (1984) Rev.Port. Cienc. Veter., 79, 117).

LITERATŪRA

1. Yamada, H. (1991) Curr. Opin. Biotechnol., 2, 203.
2. Wagner, H. (1990) Pure Appl. Chem. 131 q 117.
3. Cambell, J.B., Bede J.C. (1989) E.A.G. Lett., 5, 12.
4. Bauer, A.W., Kirby W.M.M., Sherris, J.C., Truck, M. (1966) Am. J. Clin.
5. Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V.V., Nikolov N., Popov, S. (1991) Apidologie 22, 155.
6. Zarkova, S. (1984) Rev.Port. Cienc. Veter., 79, 117.

Imunostimuliuojančios FS savybės

1 lentelė. FS indukuotas anti-infekcinis poveikis eksperimentinei *Kl. Pneumoniae* infekcijai.

Dozė ^a	Poveikio trukmė Poveikio trukmė ^b	Apsauginis poveikis		
		Visa dozė ^c	Išgyvenimo padidėjimo % ^d	VIL pokytis ^e
62,5	15,14,13,12,11,10,9,8,7,6	625,0	32,6	0,8
	25,24,23,24,21,20,19,18,17,16		45,6	1,8
	35,34,33,32,31,30,29,28,27,26		28,5	0,9
	10,9,8,7,6	312,5	10,0	0,4
	20,19,18,17,16		20,0	0,4
	30,29,28,27,26		15,5	0,5
	18,17,16	187,5	42,9	1,2
	7,6	125,0	14,3	3,5
	17,16		33,9	0,4
	27,26		27,3	2,1
50,0	25,23,21,19,17			
	25,24,23,22,21,20,19,18,17,16	250,0	16,2	0,4
12,5		125,0	10,0	0,4

^a viena FS dozė (mg/kg per dieną)

^b dienos

^c dozė (mg/kg)

^d Išgyvenimo trukmės pokytis (Δ), %

^e vidutinio išgyvenimo laiko pokytis (Δ), dienos

Aukščiau pateikti rezultatai yra tipiniai duomenys, gauti trijuose nepriklausomuose eksperimentuose, naudojant skirtingus eksperimentinius gyvuliukus.

FS imunomoduliuojančios savybės

2 lentelė. aMa aktyvavimas FS paveiktose pelėse.

Tyrimo diena ^a	Skaičius ^b	Fagocitozė ^c	Mikrobicidinis poveikis ^d
1	202 ± 62 e	22,1 ± 2,0 e	10,1 ± 1,2
5	213 ± 81 e	25,0 ± 3,7	13,3 ± 1,9
10	318 ± 120	29,2 ± 4,4	15,0 ± 2,7
15	323 ± 202	33,0 ± 4,4	16,6 ± 4,8
20	476 ± 88	37,2 ± 1,7	18,0 ± 4,7
30	371 ± 191	32,2 ± 5,8	17,2 ± 2,2
Kontrolė ^f	176 ± 31	21,2 ± 1,9	9,0 ± 1,2

^a diena nuo paskutinio FS vartojimo per 10 nuoseklaus vartojimo dienų dozėmis po 62,5 mg/kg peroraliai

^b tūkstančiai (x10³)

^c aMa fagocitinių bakterinių ląstelių procentas

^d bakterinių ląstelių, žuvusių per vieną valandą po aMa fagocitozės, procentas

^e statistškai nepatikima (Stjudento kriterijus p>0,05)

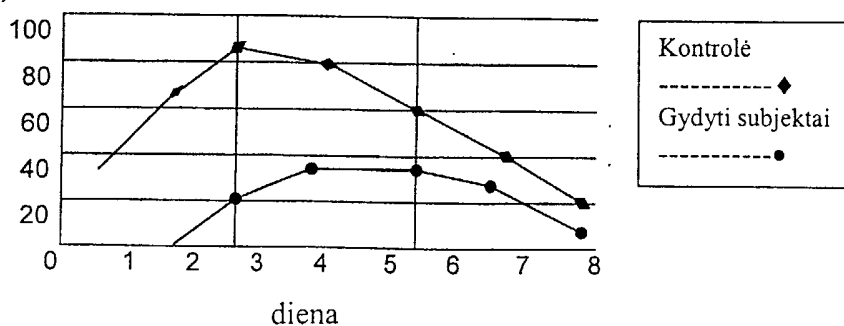
^f kontrolei naudota vien tik fiziologinis serumas.

Rezultatai atspindi vidutinius duomenis iš keturių nepriklausomų eksperimentų, naudojant 10 eksperimentinių gyvuliukų kiekvienoje grupėje.

Imunomoduliuojančios FS savybės

Fig. 1. Mirtingumas indukuotos pelėse *Kl. Pneumoniae* infekcijos atveju

Mirtingumas, (%)



IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Standartizuotas steroidinių saponinų mišinys b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra gautas iš *Tribulus terrestris* L. antžeminės dalies ir turi daugiau nei 80 proc. furostanolio saponinų.

2. Standartizuoto steroidinių saponinų mišinio pagal 1 punktą gavimo iš *Tribulus terrestris* būdas, ekstrahuojant vandeniu prisotintu butanoliu, sukonzentruojant ir džiovinant, besiskiriantis tuo, kad pirmasis ekstrahavimas vykdomas naudojant vandeninį metanolį, santykiu vanduo : metanolis 1:1 52-55 °C temperatūroje, po to gryninant aktyvinta anglimi ir filtruojant; sukonzentravus ir pilnai pašalinus metanolį ir vėliau išekstrahavus metileno chloridu, išgrynintas vandeninis ekstraktas parūgštinamas iki pH 3-5 hidrochlorido rūgštimi, po to, išekstrahavus n-butanoliu ir sukonzentravus, vyksta arba: sulašinimas į acetoną, paliekant 24 val. 10-15 °C temperatūroje, nufiltravimas, praplovimas acetonu ir išdžiovinimas, arba : koncentrato praplovimas 0,5-1,5 proc. natrio hidroksido tirpalu ir atskyrus du sluoksnius, butanolio sluoksnio praplovimas vandeniu iki pH 7, butanolio ekstrakto sukonzentravimas vakuume iki pilno organinio tirpiklio pašalinimo ir vandeninio tirpalo išdžiovinimas.

3. Standartizuoto steroidinių saponinų mišinio pagal 1 punktą panaudojimas vaistų, pasižyminčių imunomoduliuojančiu ir/arba imunostimuliuojančiu poveikiu, sintezėje.