



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2004120434/15, 02.07.2004**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.07.2004(45) Опубликовано: **20.03.2006 Бюл. № 8**(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **TU 08064-19-04-95. RU 2184556 C1,
10.07.2002. RU 2110522 C1, 27.11.1999. RU
2036654 C1, 10.07.2002.**

Адрес для переписки:

**690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостока, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, патентный
отдел, Н.И. Стадниченко**

(72) Автор(ы):

**Стоник Валентин Аронович (RU),
Аминин Дмитрий Львович (RU),
Богуславский Валентин Михайлович (RU),
Авилов Сергей Анатольевич (RU),
Агафонова Ирина Григорьевна (RU),
Сильченко Александра Сергеевна (RU),
Пономаренко Людмила Петровна (RU),
Прокофьева Нина Григорьевна (RU),
Чайкина Елена Леонидовна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

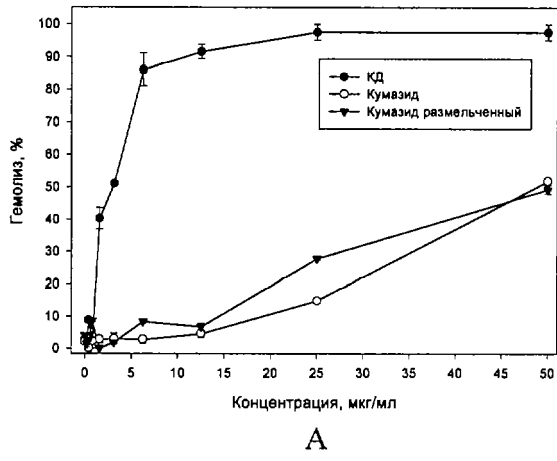
**Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения РАН (RU)**

(54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ СРЕДСТВО "КУМАЗИД" И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ

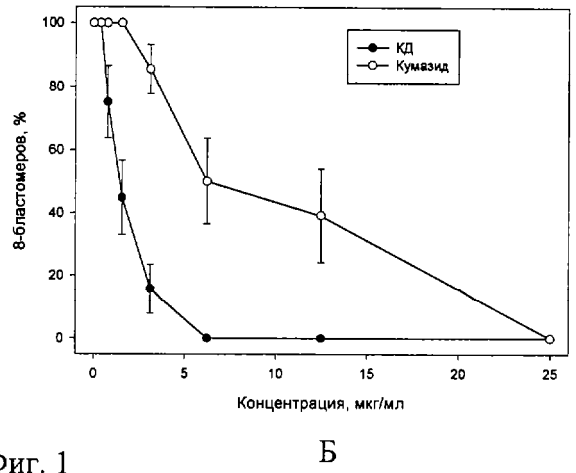
(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к созданию иммуномодулирующих средств и фармацевтических композиций на их основе. Иммуномодулирующее средство представляет собой комплекс моносульфатированных кукумариозидов со стеринном, при молярном соотношении кукумариозиды:стерин 1:2, полученный при добавлении к экстракту кукумари японской *Cuscutaria japonica* или к экстракту выварочных вод - отходов при переработке

кукумари японской или к раствору суммы кукумариозидов раствора стерина. В качестве раствора стерина используют раствор холестерина или раствор ситостерина. Фармацевтическая композиция, обладающая иммуномодулирующей активностью, содержит вышеназванное средство и наполнитель при определенном соотношении компонентов. Фармацевтическая композиция может быть использована для профилактики развития опухоли на ранних стадиях. Средство и композиция на его основе не токсичны. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 1 табл.



Фиг. 1





FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 35/56 (2006.01)**A61P 37/02** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004120434/15, 02.07.2004**(24) Effective date for property rights: **02.07.2004**(45) Date of publication: **20.03.2006 Bull. 8**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, patentnyj
otdel, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Stonik Valentin Aronovich (RU),
Aminin Dmitrij L'vovich (RU),
Boguslavskij Valentin Mikhajlovich (RU),
Avilov Sergej Anatol'evich (RU),
Agafonova Irina Grigor'evna (RU),
Sil'chenko Aleksandra Sergeevna (RU),
Ponomarenko Ljudmila Petrovna (RU),
Prokof'eva Nina Grigor'evna (RU),
Chajkina Elena Leonidovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj
khimii Dal'nevostochnogo otdelenija RAN (RU)**

(54) IMMUNOMODULATING AGENT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION BASED ON THE SAME

(57) Abstract:

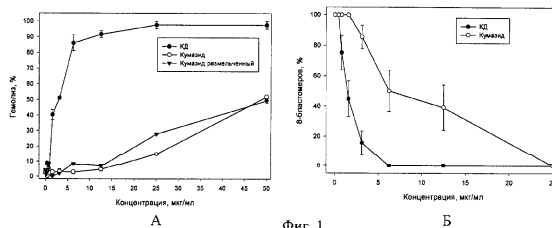
FIELD: pharmaceutical industry, in particular immunomodulating agents and production of pharmaceutical compositions containing the same.

SUBSTANCE: claimed immunomodulating agent represents complex of monosulfated cucumariosides with sterol in molar ratio cucumariosides/sterol of 1:2. Said complex is obtained by addition of sterol solution to extract from *Cucumaria japonica*, or extract of wastewater from *Cucumaria japonica* processing, or cucumarioside solution. As sterol solution cholesterol or sitosterol. Pharmaceutical composition having

immunomodulating activity contains abovementioned agent and filler in specific component ratio.

EFFECT: non-toxic pharmaceutical composition useful as tumor inhibitory agent.

4 cl, 11 ex, 1 tbl



Фиг. 1

Изобретение относится к медицине и ветеринарии, в частности к созданию иммуномодулирующих средств животного происхождения и фармацевтических композиций на их основе, которые могут найти применение в качестве стимуляторов неспецифического иммунитета у животных и человека для профилактики и лечения различных заболеваний.

5 Известно, что тритерпеновые гликозиды из кукумарии японской (*Cucumaria japonica*) являются активными иммуномодуляторами, в частности они в низких дозах увеличивают активность макрофагов (Aminin D.L. et. al. Immunomodulatory Properties of Cucumariosides from Edible Far-Eastern Holothurian *Cucumaria japonica*. J. Med. Food. 2001. V.4, №3. P.127-135; Agafonova I.G. et al. Influence of Cucumariosides upon
10 Intracellular $[Ca^{2+}]_i$ and Lysosomal Activity of Macrophages. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003. V.51. P.6982-6986), увеличивают антителообразование и эффективность вакцинирования (Седов А.М. и др. Влияние кукумариозида (тритерпенового гликозида из голотурий *Cucumaria japonica*) на развитие иммунного ответа мышей на корпускулярную коклюшную вакцину. Микробиология, эпидемиология и иммунобиология,
15 1984, №5, с.55-58). Кукумариозиды оказывают стимулирующее влияние на антибактериальную устойчивость на модели экспериментального сальмонеллеза мышей и к условно патогенным грамотрицательным микроорганизмам (Седов А.М. и др. Способность тритерпеновых гликозидов из голотурий стимулировать антибактериальную
20 устойчивость на модели экспериментального сальмонеллеза мышей. Микробиология, эпидемиология и иммунобиология, 1984, №5, с.555-558).

Известно применение тритерпеновых гликозидов голотурий в качестве средства для изучения состояния иммунной системы на экспериментальных моделях (авторское свидетельство №1066602, А 61 К 35/56, 1984).

25 Описана антифунгальная активность кукумариозидов, полученных из отвара голотурии *Cucumaria japonica* путем концентрирования отвара, осаждения белков этиловым спиртом, экстракции гликозидов н-бутиловым спиртом, очистки экстракта этиловым спиртом и осаждения гликозидов ацетоном (авторское свидетельство №1166371, А 61 К 35/56, С 07 Н 15/24, 1985).

30 Известно средство для профилактики и лечения алеутской болезни норки (патент РФ №2036654, А 61 К 35/56, 1995). Описано применение как суммарного препарата тритерпеновых гликозидов (КМ), полученного способом, описанным в авторском свидетельстве №1166371, так и применение индивидуального гликозида - кукумариозида (КМ-2). Последний выделяют из спиртового экстракта голотурии *Cucumaria japonica* последовательно колоночной хроматографией на силикагеле и полихrome.

35 Обнаружена эффективность кукумариозидного препарата как радиопротектора для профилактики и лечения лучевой болезни в экспериментах с лабораторными животными (патент РФ №2141833, А 61 К 35/56, 1999). Показана выраженная активность кукумариозидного препарата против ряда вирусов (патент РФ №2184556, А 61 К 35/56, 31/7048, А 61 Р 31/12, 2002).

40 Известен препарат из кукумарии японской - кукумариозид (КД), использующийся в ветеринарии в качестве иммуномодулирующего и биостимулирующего средства для профилактики заболеваний животных и снижения падежа молодняка (ТУ 08064-19-04-95; Наставление по применению кукумариозида (КД) в ветеринарии N 10.07.184-95 от 26.01.1995, Регистрационное удостоверение N P004-2.0105; Номер государственной
45 регистрации препарата: ПВР 2.01.0001-95). Кукумариозид (КД) представляет собой суммарную фракцию тритерпеновых гликозидов. Препарат получали из отвара голотурии *Cucumaria japonica* способом, описанным в авторском свидетельстве №1166371. В дальнейшем был разработан усовершенствованный способ получения суммы тритерпеновых гликозидов из выварочных вод этого животного, согласно которому целевой
50 продукт выделяют путем соосаждения гликозидов с полисахарид-белковым комплексом при подкислении до pH 2,8 или при добавлении 1% раствора хитозана в качестве флокулянта, а затем экстрагируют их из комплекса и очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии на колонках с гидрофобным сорбентом, а затем с силикагелем (патент РФ

№2110522, С 07 Н 3/06, 1998).

Исследования гликозидов дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica*, проводимые в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН, показали, что кукумария японская содержит сложную смесь тритерпеновых гликозидов голостанового ряда (0,2-0,3% от веса сухого остатка животного), дающего на хроматограмме (ТСХ) семь основных пятен. Каждое из пятен представляет собой подфракцию родственных гликозидов, имеющих одинаковые углеводные цепи, но различающихся строением агликонов. Они объединены в группы и получили обозначения А₀ (~3% от веса суммарной гликозидной фракции), А₁ (5%), А₂ (17%), А₃ (7%), А₄ (13%), А₆ (14%) и А₇ (26%). Гликозиды, входящие в А₀, А₁, А₂ и А₄ группы, относятся к моносulfатированным гликозидам, оликозиды А₃ и А₆ групп - к дисulfатированным гликозидам, а А₇ группы - к трисульфатированным гликозидам (Авилов С.А и др. Структура четырех новых тритерпеновых гликозидов из морской голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соед. 1990. №6. С.787-793; Дроздова О.А. и др. Трисульфатированные гликозиды из морской голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соед. 1993. №3. С.369-374; Drozdova O.A. et. al. Cytotoxic triterpene glycosides from Far-Eastern sea cucumber belonging to the genus *Cucumaria*. Liebigs Ann. 1997, 11, 2351-2356; Stonik V.A. et. al. Toxins from sea cucumbers (Holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. J. Nat. Toxins 1999, 8 (2), 235-248).

Обнаружено, что не все гликозиды кукумарии японской стимулируют иммунную систему, некоторые из них, в частности ди- и трисульфатированные компоненты гликозидной фракции, не активны или даже обладают иммуносупрессивными свойствами (Aminin D.L. et. al. Immunomodulatory Properties of Cucumariosides from Edible Far-Eastern Holothurian *Cucumaria japonica*. J. Med. Food. 2001. V.4, №3. P.127-135). С этим может быть связана неоднозначность действия кукумариозидных препаратов, полученных разными способами и из разных сборов биологического сырья, которая иногда проявляется в диаметрально противоположных иммунотропных эффектах. Кроме того, их медицинское применение тормозится относительно высокой токсичностью. Так, LD₅₀ препарата КД составляет 25-30 мг/кг.

Противоопухолевая активность препарата КД не описана.

Задача изобретения - создание средства животного происхождения и фармацевтической композиции на его основе, обладающих иммуномодулирующей активностью.

Поставленная задача решена новым иммуномодулирующим средством, характеризующимся тем, что оно представляет собой комплекс моносulfатированных кукумариозидов со стеринном при молярном соотношении кукумариозиды:стерин 1:2, полученный при добавлении к экстракту кукумарии японской *Cucumaria japonica*, или к экстракту выварочных вод - отходов при переработке кукумарии японской, или к раствору суммы кукумариозидов раствора стерина.

Новое средство получило название «кумазид».

Анализ кумазида с помощью тонкослойной хроматографии и ЯМР спектров показал, что в его состав входят в основном активные моносulfатированные кукумариозиды А₂ и А₄ групп. В кукумариозид-стериновом комплексе мало активные и обладающие иммуносупрессорным действием ди- и трисульфатированные кукумариозиды являются примесями, содержание которых не превышает 5-10%.

В качестве раствора стерина используют раствор холестерина или раствор ситостерина.

Технический результат заключается в уменьшении токсичности иммуномодулирующего средства.

Кроме того, достигается дополнительный технический результат, заключающийся в проявлении у заявляемого иммуномодулирующего средства противоопухолевой активности.

Задача решена также созданием новой иммуномодулирующей фармацевтической композиции. Она содержит заявляемое средство и наполнитель при следующем их соотношении, %: кумазид - 0,1-1,0 и наполнитель - остальное.

Испытания показали, что действующая доза для мышей весом 20 г составляет от 0,02 мкг до 0,2 мкг на мышь. При пересчете на кг веса действующая доза кумазида составляет (1,0-10,0) мкг. Этот диапазон доз является оптимальным, уменьшение или превышение этих значений приводит к снижению эффективности кумазида. Эффективное количество кумазида в композиции определено исходя из действующей дозы активного начала, которая находится в интервале от 1,0 мкг до 10,0 мкг на кг веса.

Для человека со средним весом 50 кг заявляемая фармацевтическая композиция в виде таблетки весом 50 мг содержит от 0,05 мг (0,1%) до 0,5 мг (1,0%) кумазида и наполнитель - остальное. В качестве наполнителя используют стандартные вещества, нейтральные к кумазиду, выбранные из группы: крахмал, гипс, стеарат кальция, стеарат магния, сорбит, лактоза.

Технический результат заключается в уменьшении токсичности фармацевтической композиции. Кроме того, достигается дополнительный технический результат, заключающийся в проявлении у заявляемой фармацевтической композиции противоопухолевой активности.

Изучение биологической активности заявляемого средства и фармацевтической композиции на его основе в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показало, что они обладают высокой иммуномодулирующей активностью (стимулируют лизосомальную активность макрофагов в 2-2,5 раза по сравнению с контрольными клетками), сравнимой с иммуномодулирующей активностью суммарного гликозидного препарата из *Cuscutaria japonica* (КД), но выгодно отличаются от него низкой гемолитической и цитотоксической активностями (ГК₅₀ порядка 50 мкг/мл для кумазида и порядка 2,5 мкг/мл для КД).

Известно, что токсичность гликозидных препаратов из голотурий определяется в основном их гемолитическими свойствами, а именно чем выше их гемолитическая активность, тем большей токсичностью характеризуются эти препараты (Kalinin V.I. et al. J. Nat. Toxins. 1992. V.1, №2. P.17-30).

Исследования показали, что заявляемое средство и фармацевтическая композиция на его основе отличаются значительно меньшей гемолитической и цитотоксической (эмбриотоксической) активностями, чем известный препарат КД. Как следует из фиг.1А, кумазид показывает приблизительно в 20 раз меньшую гемолитическую активность, чем препарат КД.

Независимо от используемого при образовании комплексов стерина наблюдали приблизительно одинаковое уменьшение цитотоксических свойств в сравнении с препаратом КД. Так, для кумазида, представляющего собой комплекс моносulfатированных кукумариозидов с ситостерином, наблюдалось существенное уменьшение эмбриотоксичности (ЭД₅₀ для препарата КД равна 1,5 мкг/мл, а для кумазида - 6,0 мкг/мл) (фиг.1Б).

Показано, что кумазид при двукратной внутрибрюшинной инъекции в дозе 8,0 мкг/мл вызывает достоверное торможение роста асцитной формы карциномы Эрлиха порядка 27% по сравнению с контрольными животными на ранних стадиях развития опухоли. При двукратной внутрибрюшинной инъекции в дозе 10 мкг/кг существенно в 3,2 раза по сравнению с контролем тормозит развитие солидной формы мышинной карциномы Эрлиха на ранней стадии развития опухоли, оцененной на 6-й день после инокуляции. Однако на более поздних стадиях опухоль быстро прогрессирует.

Во всех типах экспериментов препарат кумазид вводили за несколько дней до имплантации опухоли в животных по так называемой «профилактической» схеме в дозах, гораздо ниже цитотоксических и имеющих иммуностимулирующий эффект. Наблюдаемое торможение роста опухоли (как в асцитной, так и в солидной форме) на ранней стадии ее развития у животных после введения препарата кумазид можно отнести за счет иммуномодулирующих свойств препарата.

Обнаружено, что комплексы кукумариозидов со стеринами более стабильны и отличаются большей всасываемостью по сравнению с аналогичными свойствами суммарного гликозидного препарата из кукумарии японской.

На фиг.1 представлена сравнительная гемолитическая активность кумазида, представляющего собой комплекс кукумариозидов с холестерином в виде водной суспензии и известного кукумариозидного препарата КД по отношению к мышинным эритроцитам (А), и эмбриотоксическая активность кумазида, представляющего собой комплекс кукумариозидов с ситостерином, и препарата КД по отношению к развивающимся эмбрионам морского ежа (Б).

На фиг.2 представлены данные, показывающие величину лизосомальной активности мышинных перитонеальных макрофагов, проявляемой кумазидом в сравнении с КД и с контролем. (А) - пероральное ежедневное введение препарата в виде водной суспензии. 10 Регистрация на 10 день эксперимента. (Б) - интраперитонеальная однократная инъекция препарата в виде водной суспензии. Регистрация на 4 день. Концентрация КД в растворе - 0,02 мкг/мл, концентрация кумазида в суспензии - 0,02 мкг/мл.

На фиг.3 и 4 представлена зависимость величины лизосомальной активности мышинных перитонеальных макрофагов от длительности приема кумазида в таблетированной форме. 15 На фиг.5 представлены данные по влиянию препарата Кумазид на раннюю стадию роста солидной карциномы Эрлиха у мышей. Препарат вводили дважды за 4 и за 1 день до инокуляции опухоли в дозе 0,2 мкг/мышь. Количество клеток вводимой опухоли - 5 млн на мышь. Количество животных в опыте - 2 в каждой группе. Данные представлены как $m \pm sd$ ($n=2$).

20 Получение, физико-химические характеристики и исследование биологической активности кумазида и фармацевтической композиции на его основе представлены в следующих примерах осуществления изобретения.

Пример 1. Получение кумазида из кожно-мышечных мешков кукумарии японской.

Потрошеную кукумарию японскую (*Sisumaria japonica*) (1 кг) измельчают и экстрагируют 25 спиртом (2 л) при нагревании в течение 4 часов. Экстракт отделяют декантацией, остаток повторно экстрагируют спиртом в тех же условиях. Объединенный экстракт центрифугируют при 4000 об/мин 20 минут. Супернатант отделяют, упаривают до воды и экстрагируют бутанолом (2×200 мл). Верхнюю фазу отделяют, профильтровывают и добавляют к ней раствор холестерина (1 г) в 60 мл водно-насыщенного бутанола. 30 Реакционный раствор концентрируют в вакууме до объема 200 мл, образовавшуюся суспензию выдерживают 10-14 часов при 4-6°C и центрифугируют. Образующийся осадок, представляющий собой кукумариозид-холестериновый комплекс, отделяют от надосадочной жидкости и трижды промывают комплекс равными объемами охлажденного растворителя (спирт, эфир или другие) с последующим центрифугированием. Затем осадок 35 отмытого комплекса несколько раз промывают равными объемами серного эфира с последующим центрифугированием и высушиванием сначала на воздухе до отсутствия запаха эфира, а затем в вакуум-эксикаторе до постоянного веса. Получают 220 мг кукумариозид-холестеринового комплекса (кумазида). Он представляет собой чуть желтоватый или бесцветный аморфный порошок, не растворимый в воде, неполярных 40 растворителях и слабо растворимый в спиртах. Содержание основного вещества не менее 95%. Белковые примеси не более 2%, $[\alpha]_d^{20} = -36^\circ \pm 5^\circ$, пиридин, концентрация 1,5 мг/мл. Молярное соотношение кукумариозиды:стерин равно 1:2. На фиг.6 приведен ЯМР-спектр.

Пример 2. Получение кумазида осуществляют, как описано в примере 1, но в качестве 45 раствора стерина используют раствор ситостерина. Получают 220 мг кукумариозид-ситостеринового комплекса (кумазида). Он представляет собой желтоватый или бесцветный аморфный порошок, не растворимый в воде, неполярных растворителях и слабо растворимый в спиртах. Содержание основного вещества не менее 95%. Белковые примеси не более 2%, $[\alpha]_d^{20} = -32^\circ \pm 5^\circ$, пиридин, концентрация 1,5 мг/мл. Молярное 50 соотношение кукумариозиды:стерин равно 1:2.

Пример 3. Получение кумазида из выварочных вод - промышленных отходов при переработке кукумарии японской.

К выварочным водам (10 л) добавляют уксусную кислоту до pH 4 (по универсальной индикаторной бумаге). Образовавшемуся осадку дают отстояться 10-14 часов.

Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют спирт 1:1 по объему. Экстрагируют 4 часа при нагревании, центрифугируют при 4000 об/мин 20 минут и осадок дважды промывают равными объемами 60% спирта, объединенный экстракт упаривают до воды. Далее процесс ведут, как описано в примере 1. Получают 20 мг кумазида. Он представляет собой чуть желтоватый или бесцветный аморфный порошок, не растворимый в воде, неполярных растворителях и слабо растворимый в спиртах. Содержание основного вещества не менее 95%. Белковые примеси не более 2%, $[\alpha]_d^{20} = -36 \pm 5^\circ$, пиридин, концентрация 1,5 мг/мл. Молярное соотношение кукумариозиды:стерин равно 1:2. На фиг.7 приведен ЯМР-спектр.

Пример 4. Получение кумазида осуществляют, как описано в примере 3, но в качестве раствора стерина используют раствор ситостерина. Получают 13 мг препарата. Он представляет собой желтоватый или бесцветный аморфный порошок, не растворимый в воде, неполярных растворителях и слабо растворимый в спиртах. Содержание основного вещества не менее 95%. Белковые примеси не более 2%, $[\alpha]_d^{20} = -32 \pm 5^\circ$, пиридин, концентрация 1,5 мг/мл. Молярное соотношение кукумариозиды:стерин равно 1:2.

Пример 5. Получение кумазида из раствора суммы кукумариозидов.

А. Получение раствора суммы кукумариозидов.

Свежевыловленную кукумарию (100 кг) нарезают на куски, удаляют воду, пропускают через мясорубку, заливают этиловым спиртом (1:1 по объему). Пассивная экстракция при температуре 25°C проходила 3 дня. Первый экстракт сливают и остаток заливают 80% этиловым спиртом. Последовательно получено три водно-спиртовых экстракта, которые объединяют и упаривают в вакууме при 70°C до воды. Водный остаток (23 л) экстрагируют бутанолом 4 раза в соотношении вода:бутанол - 4:1 по объему. Получают 16 л бутанольного экстракта, который упаривают в вакууме при 50°C до объема в 9 литров. При охлаждении этого экстракта в холодильнике (+5°C) (12 часов) выпадает осадок, который отделяют центрифугированием (15 мин при 2000 об/мин). Осадок промывают 3 раза системой хлороформ-гексан 1:1 (по 70 мл), высушивают на воздухе 48 часов, затем в вакууме до постоянного веса в течение 28 часов. ТСХ - анализ подтвердил наличие моносультатированных гликозидов в осадке (КД5).

5,5 г КД5 растворяют в 70 мл воды, отфильтровывают и прибавляют 400 мл подогретого до 50°C бутанола. После охлаждения добавляют воды так, чтобы образовалось 5-6 мл водного слоя, перемешивают и водный слой убирают. Для дальнейшей работы используют раствор гликозидной фракции в бутаноле при комнатной температуре.

Б. Получение кумазида.

Холестерин (3,5 г) растворяют при нагревании в 50 мл водно-насыщенного бутанола. При охлаждении до комнатной температуры этот раствор должен оставаться прозрачным. Затем растворы холестерина и гликозидной фракции смешивают и оставляют в холодильнике на ночь. Образовавшийся осадок кукумариозид-холестеринового комплекса отделяют центрифугированием 15 мин, 2000 об/мин. Осадок промывают охлажденным этиловым спиртом (2x80 мл), затем серным эфиром (3x40 мл). Выход 2,74 г. Полученный кумазид сушат на воздухе 48 часов, затем в вакууме до постоянного веса (24 часа). ТСХ-анализ подтвердил, что он состоит из комплекса моносультатированных кукумариозидов и холестерина. Он представляет собой желтоватый или бесцветный аморфный порошок, не растворимый в воде, неполярных растворителях и слабо растворимый в спиртах. Содержание основного вещества не менее 95%. Белковые примеси не более 2%, $[\alpha]_d^{20} = -35 \pm 5^\circ$, пиридин, концентрация 1,5 мг/мл. Молярное соотношение кукумариозиды:стерин равно 1:2.

Пример 6. Получение кумазида осуществляют, как описано в примере 5, но в качестве раствора стерина используют раствор ситостерина. Получают 2,74 г препарата. Полученный кумазид сушат на воздухе 48 часов, затем в вакууме до постоянного веса (24 часа). ТСХ-анализ подтвердил, что он состоит из комплекса моносультатированных кукумариозидов и ситостерина. Он представляет собой желтоватый или бесцветный

аморфный порошок, не растворимый в воде, неполярных растворителях и слабо растворимый в спиртах. Содержание основного вещества не менее 95%. Белковые примеси не более 2%, $[\alpha]_d^{20} = -32 \pm 5^\circ$, пиридин, концентрация 1,5 мг/мл. Молярное соотношение кукумариозиды:стерин равно 1:2.

5 Пример 7

Фармацевтическая композиция содержит кумазид в качестве активного начала, а также наполнитель, состоящий из картофельного крахмала и гипса, при следующем соотношении компонентов, мг:

| | | |
|----|----------------------|------|
| 10 | Кумазид | 0,05 |
| | Крахмал картофельный | 45,0 |
| | Гипс | 5,0 |

15 Фармацевтическую композицию готовят следующим образом. Соответствующие количества картофельного крахмала и гипса смешивают, а затем вносят в эту смесь соответствующее количество кумазида, перемешивают в течение 15 мин и прессуют в таблетку.

Пример 8

20 Фармацевтическая композиция содержит кумазид в качестве активного вещества и наполнитель, состоящий из сорбита и стеарата кальция, при следующем соотношении компонентов, мг:

| | | |
|--|-----------------|------|
| | Кумазид | 0,5 |
| | Сорбит | 45,0 |
| | Стеарат кальция | 5,0 |

25 Фармацевтическую композицию готовят, как в примере 7.

Пример 9. Изучение гемолитической и цитотоксической (эмбриотоксической) активностей.

30 Известно, что токсичность гликозидных препаратов из голотурий определяется в основном их гемолитическими свойствами, а именно чем выше их гемолитическая активность, тем большей токсичностью характеризуются эти препараты (Kalinin V.I. et al. Hemolytic activity of triterpene glucosides from the Cucumariidae family holothurians and evolution of this group of toxins // J. Nat. Toxins. 1992. V.1, №2. P.17-30).

35 Гемолитическую активность гликозидных препаратов определяли по известной методике [Thron C.D. Hemolysis by holothurin A, digitonin and quiiia saponin: estimates of the required cellular lysin uptakes and free lysin concentrations // J. Pharm. Exp. Therap. 1964. V.145, №2. P.194-202; Segal R., Mansour M., Zaitschek D.V. Effect of ester groups on the haemolytic action of some saponins and sapogenins // Biochem. Pharmacol. 1966. V.15, №10. P.1411-1416].

40 Для определения цитотоксичности (эмбриотоксичности) тестируемых препаратов в качестве клеточной модели использовали развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus nudus nudus* [Бузников Г.А., Подмарев В.К. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachiensis*, *S.nudus*, *S.intermedius* // В кн.: Объекты биологии развития. М.: Наука. 1975. С.188-216; Kobayashi N. Marine ecotoxicological testing with echinoderms // In: Ecotoxicological testing for the marine environment / Eds. Persoone G., Jaspers E., Claus C.: State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium. 1984. V.1. P.798].

45 Исследования показали, что заявляемое средство и фармацевтическая композиция на его основе отличаются значительно меньшей гемолитической и цитотоксической (эмбриотоксической) активностями, чем известный препарат КД. Как следует из фиг.1А, кумазид показывает приблизительно в 20 раз меньшую гемолитическую активность, чем препарат КД ($ГК_{50}$ около 50 мкг/мл для кумазида и около 2,5 мкг/мл для КД).

Независимо от используемого при образовании комплексов стерина наблюдали приблизительно одинаковое уменьшение цитотоксических свойств. Так, для кумазида,

представляющего собой комплекс моносulfатированных кукумариозидов с ситостерином, наблюдалось существенное уменьшение эмбриотоксичности (ЭД₅₀ для препарата КД равна 1,5 мкг/мл, а для кумазида 6,0 мкг/мл) (фиг.1 Б).

Пример 10. Исследование иммуномодулирующей активности.

5 I. Способы введения препаратов.

В тестах использовали лабораторных мышей линии BALB/c. Исследуемые препараты вводили однократно внутривентриально по 0,5 мл в физиологическом растворе в различных концентрациях. В качестве контроля использовали физиологический раствор. Через трое суток после введения препаратов мышам забивали, выделяли перитонеальные макрофаги по стандартной методике. Использовали не менее 5 животных в группе на 1 дозу препарата.

Кроме того, изучаемые препараты вводили перорально. Для этого использовали водные суспензии кумазида в различных концентрациях, которыми экспериментальных животных поили ежедневно. Через определенные промежутки времени (дни), в зависимости от цели эксперимента, мышам забивали и выделяли перитонеальные макрофаги по стандартной методике.

Для перорального применения на мышам использовались также таблетки. Действующая доза для мышам весом 20 г составляла 0,02 мкг на мыш. Кормление животных таблетками проводили ежедневно. Животных отбирали в определенные дни и исследовали лизосомальную активность перитонеальных макрофагов с помощью прижизненного флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый и системы анализа изображения клеток.

II. Оценка лизосомальной активности мышинных перитонеальных макрофагов.

Оценку активности внутриклеточных лизосом проводили путем окрашивания и локализации лизосом флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым [Millot C., Millot J.M., Morjani H., Desplacard A., Montait M. Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorometry // J. Histochem. Cytochem. 1997. V.45, №9. P.1255-1264; Zoccarato F., Cavallini L., Alexandre A. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes // J. Neurochem. 1999. V.72, №2. P.625-633]. Измерение интенсивности флуоресценции клеток в монослой проводили модифицированным методом Лоу. Макрофаги получали из перитонеальной жидкости мышам линии BALB/c. Мышам забивали методом перивисцеральной дислокации, в брюшную полость немедленно вводили 1 мл фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ, pH 7.4) и интенсивно пальпировали брюшную полость в течение 1-2 мин. Затем с помощью шприца собирали перитонеальную жидкость и по 250 мкл этой жидкости наносили на покровные стекла микроскопа и оставляли на 1 час при 37°C в термостате. После адгезии макрофагов покровные стекла трижды промывали в ФСБ (pH 7.4) и на клеточный монослой наносили 250 мкл раствора акридинового оранжевого ("Calbiochem", 100 мкг/мл в фосфатном буферном растворе) и оставляли стекла в термостате при 37°C еще на 30 мин. После этого клеточный монослой трижды отмывали ФСБ и покровные стекла монтировали на предметном столе системы анализа изображения клеток, состоящей из инвертированного микроскопа "Axiovert 200" (Zeiss, Германия), источника возбуждения флуоресценции и монохроматора "Optoscan" (Cairn Research Ltd, Англия) и цифровой CCD видеоканеры "ORCA-ER" (Hamamatsu Photonics K.K., Япония).

Флуоресценцию акридинового оранжевого возбуждали при $\lambda=489$ нм. Набор светоделительных фильтров для ФИТЦ (флуоресцеин изотиоционат) был установлен для визуализации флуоресценции акридинового оранжевого в лизосомах. Захваченные видеоканерой изображения переносили в IBM-совместимый компьютер Pentium-IV с помощью специализированной платы видеозахвата Firewire (США) и сохраняли в компьютерном жестком диске в виде графических файлов. Интенсивность уровня флуоресценции лизосом была определена инструментальными средствами программы "AQM Advance 6" (Kinetic Imaging Ltd., Англия). Флуоресценция случайно выбранных

изображений 100-150 клеток для каждой концентрации исследуемых соединений была измерена как средняя интенсивность серого цвета для каждой клетки и выражалась в пикселях.

Средние значения и стандартная ошибка эксперимента рассчитывались графически с помощью компьютерной программы "SigmaPlot 3.02" (Jandel Corporation, США).

Иммунomodулирующие свойства препаратов оценивали по повышению активности перитонеальных макрофагов. Как следует из фиг.2, кумазид в такой же степени стимулирует макрофагальную активность, как и КД, причем он активен как при пероральном применении, в том числе при поении животных водной суспензией или при применении кумазид-содержащих таблеток, так и при интраперитонеальной инъекции. Так, таблетки скармливали ежедневно мышам линии BALB/c, каждое животное получало приблизительно 0,02 мкг активной субстанции в день. Стимуляцию иммунной системы оценивали по активации макрофагов (фиг.3).

Исследования показали, что лизосомальный компартмент мышей резко активировался после 5-го дня с начала эксперимента и активация достигала максимума на 10-й день. В течение 4 недель с начала эксперимента макрофаги оставались в активированном состоянии, причем их активность в 3-4 раза превышала таковую в контрольном эксперименте.

После прекращения приема таблеток не наблюдали угнетения активности макрофагов (фиг.4). Так, при прекращении приема таблеток на 12-й день эксперимента у мышей наблюдалось медленное снижение активности макрофагов, но даже на 30-й день их активность оставалась более высокой, чем у контрольной группы.

Таким образом, заявляемое средство и фармацевтическая композиция на его основе при пероральном введении стимулировали клеточный иммунитет даже при использовании чрезвычайно низких доз (менее 0,1 мкг активной субстанции на животное), причем за стадией стимуляции не следовала стадия угнетения.

Пример 11. Исследование противоопухолевой активности.

I. Исследование противоопухолевой активности в экспериментах с асцитной формой мышинной карциномы Эрлиха.

Опыты проведены на белых беспородных мышах массой 20-21 г. Препарат суспендировали в стерильном физиологическом растворе и вводили внутривентриально 1 раз (за 4 дня до прививки опухоли) или 2 раза (за 6 дней и 2 дня до прививки опухоли). Группе контрольных животных вводили по 0,5 мл физиологического раствора. Клетки асцитной карциномы Эрлиха (тетраплоидный штамм) вводили внутривентриально в количестве $1,0-1,5 \times 10^6$ клеток/мышь. Противоопухолевый эффект оценивали по увеличению средней продолжительности жизни (УПЖ) мышей, которым вводили препарат, выраженной в процентах по отношению к контролю, и по общему числу опухолевых клеток в асцитической жидкости в пересчете на целое животное. В каждой подопытной группе было 7 животных.

Показано, что двукратное введение препарата в дозе 8,0 мкг/кг вызывает достоверное торможение роста опухоли карциномы Эрлиха порядка 27% по сравнению с контрольными животными на ранних стадиях развития опухоли. В таблице представлены данные по влиянию препарата кумазид на рост асцитной формы карциномы Эрлиха у мышей.

| Таблица Влияние препарата кумазид* на рост асцитной карциномы Эрлиха у мышей | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------|-----------------------------|
| Воздействие | Доза, мкг/кг | Число клеток/мышь** (1×10^7) | Торможение роста опухоли, % |
| Кумазид* | 8.0 | 76.0 \pm 12 | 27.0 |
| Контроль | - | 104.0 \pm 8 | - |

* Кумазид вводился дважды, за 6 и 2-е суток до трансплантации опухоли.
 ** Оценка на 6-е сутки после трансплантации опухоли. Вводили 1.0×10^6 кл/мышь. Данные представлены как $m \pm se$ (n=7).

В то же время было отмечено, что начиная с 10 дня после инокуляции опухоли показатели объема асцитической жидкости и количества опухолевых клеток у контрольных животных и животных, получивших инъекцию препарата кумазид, выравнивались, а

средняя продолжительность жизни у контрольных и опытных животных достоверно не различались.

II. Исследование противоопухолевой активности в экспериментах с солидной формой мышинной карциномы Эрлиха.

5 Опыты проводили на белых беспородных мышах массой 20-21 г. Препарат
 суспендировали в стерильном физиологическом растворе и вводили внутривентриально
 дважды за 4 и за 1 день до инокуляции опухоли в дозе 0,2 мкг/мышь (10 мкг/кг) в
 объеме 0,5 мл. Группе контрольных животных вводили по 0,5 мл физиологического
 раствора. Клетки асцитной карциномы Эрлиха (тетраплоидный штамм) вводили подкожно
 10 под левую переднюю лапу в количестве 5×10^6 клеток/мышь. Противоопухолевый эффект
 оценивали по уменьшению объема солидной опухоли у мышей, которым вводили препарат,
 выраженный в см³. Регистрацию размеров солидной опухоли проводили через день,
 начиная с 6-го дня после инокуляции, методом томографии с использованием ЯМР-
 томографа для животных Pharmascan 70/16 US (Брукер, Германия). С этой целью животных
 15 анестезировали инъекцией ксилозана внутривентриально (0,3 мл/кг, Spora, PRAHA). T2-
 взвешенные изображения получали при следующих параметрах томографа: TR/TE,
 3535,4/44ms; полем обзора 7,7² см; временем захвата 3,4 мин; размером матрицы 256² см;
 толщиной среза 1 мм. Объем опухоли рассчитывался путем измерения геометрических
 параметров опухоли в серии слайдов из двух ортогональных изображений с помощью
 20 программных средств томографа ParaVision 3.0.1.

Показано (фиг.5), что кумазид при двукратной внутривентриальной инъекции в дозе 10
 мкг/кг существенно, в 3,2 раза по сравнению с контролем, тормозит развитие солидной
 формы мышинной карциномы Эрлиха на ранней стадии развития опухоли, оцененной на 6-й
 25 день после инокуляции.

Формула изобретения

1. Иммуномодулирующее средство, характеризующееся тем, что оно представляет
 собой комплекс моносульфатированных кукумариозидов со стеринном при молярном
 соотношении кукумариозиды:стерин 1:2, полученный при добавлении к экстракту кукумари
 30 японской *Cuscutaria japonica*, или к экстракту выварочных вод - отходов при переработке
 кукумари японской, или к раствору суммы кукумариозидов раствора стерина.

2. Средство по п.1, где в качестве раствора стерина используют раствор холестерина
 или раствор ситостерина.

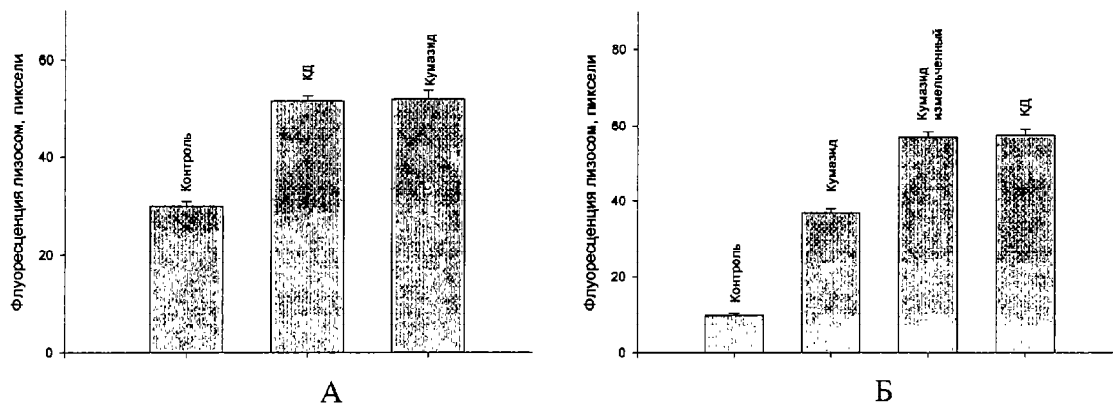
3. Фармацевтическая композиция, обладающая иммуномодулирующей активностью,
 35 характеризующаяся тем, что она содержит средство по п.1 и наполнитель при следующем
 соотношении компонентов, мас. %:

| | |
|-----------------|-----------|
| Средство по п.1 | 0,1-1,0 |
| Наполнитель | Остальное |

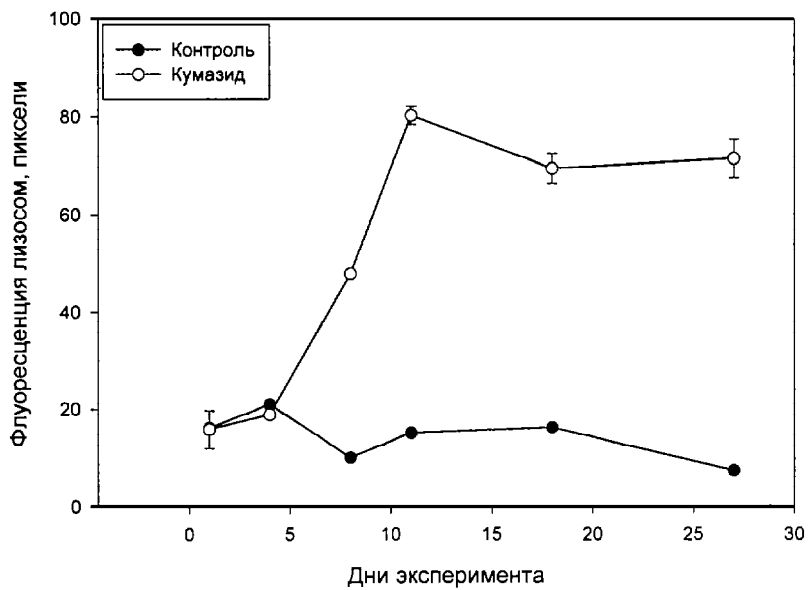
40 4. Фармацевтическая композиция по п.3 может быть использована для профилактики
 развития опухоли на ранних стадиях.

45

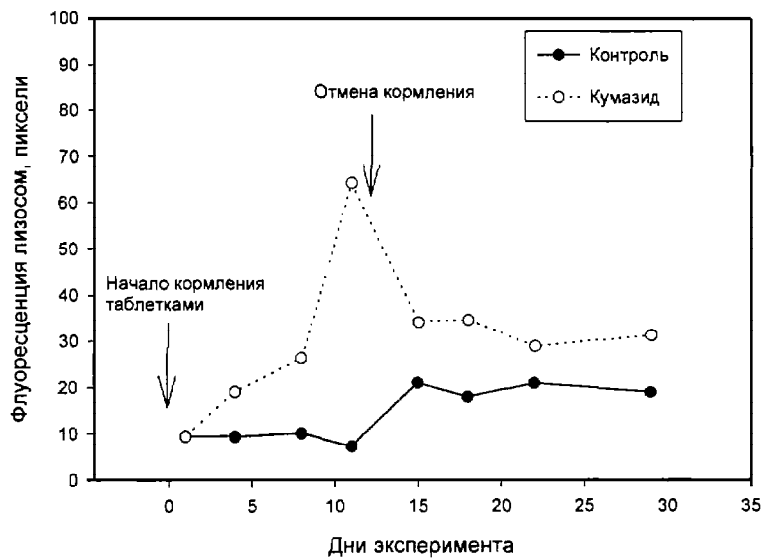
50



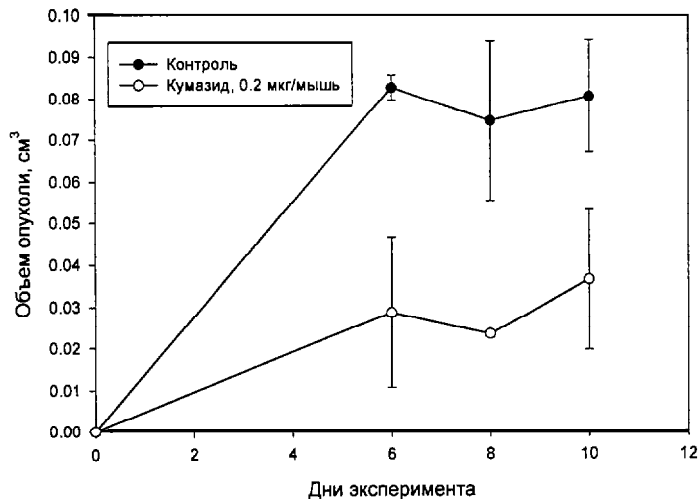
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

5.306
5.287
5.138
5.128
4.977
4.865
4.850
4.829
4.809
4.789
4.771
4.750
4.430
4.412
4.396
4.286
4.278
4.267
4.249
4.230
4.206
4.206
4.192
4.183
4.157
4.138
4.112
4.106
4.089
4.072
4.054
4.039
4.020
4.004
3.988
3.988
3.905
3.884
3.867
3.855
3.851
3.842
3.824
3.720
3.703
3.689
3.666
3.623
3.623
3.606
3.250
3.235
3.227
2.927
2.927
2.858
2.847
2.647
2.637
2.493
2.482
2.462
2.446
2.120
2.105
2.100
2.089
2.089
2.069
2.044
2.044
2.023
2.023
2.027
2.020
2.001
2.001
1.986
1.986
1.972
1.961
1.954
1.876
1.876
1.864
1.864
1.857
1.850
1.841
1.841
1.830
1.830
1.812
1.812
1.799
1.799

```

Current Data Parameters
NAME      bozkum1
EXPNO    2
PROCNO   1

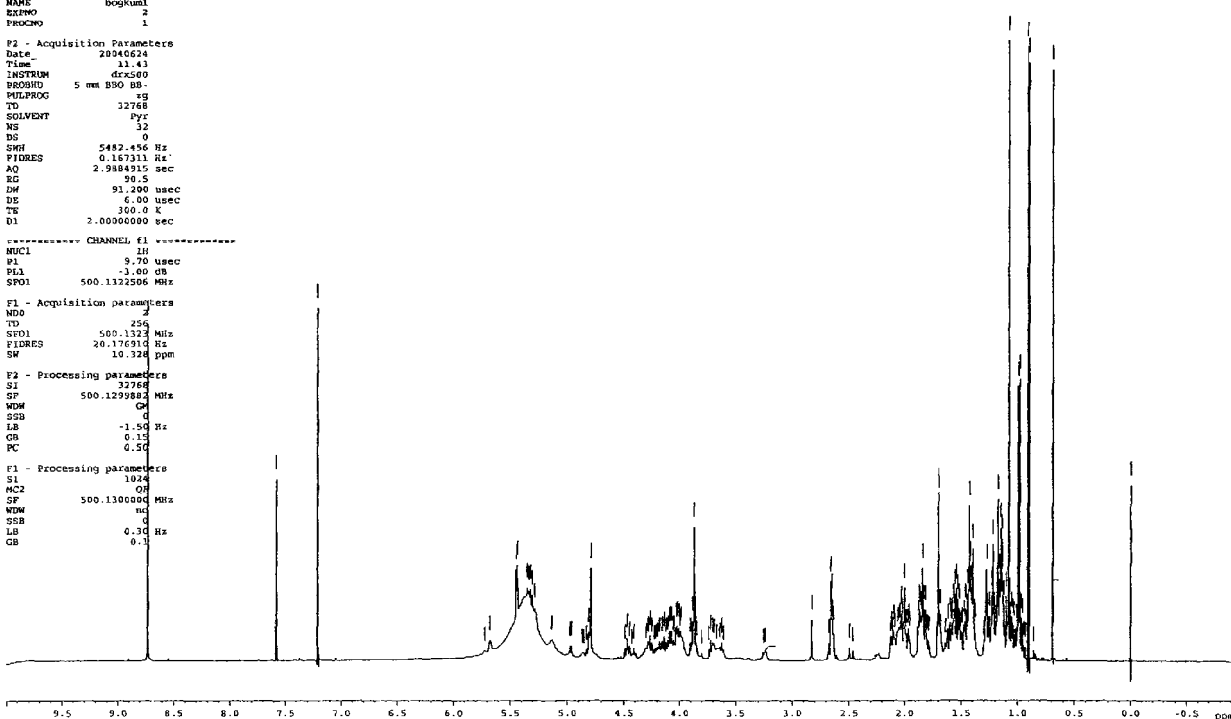
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20040624
Time     11.43
INSTRUM  dx500
PROBHD   5 mm BBO BB-
PULPROG  zgpg30
TD        32768
SOLVENT  Pyr
NS        32
DS        0
SWH       5482.456 Hz
FIDRES   0.167311 Hz
AQ        2.9884915 sec
RG        90.5
DM        91.200 usec
DE        6.00 usec
TE        300.0 K
D1        2.0000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1      1H
P1        9.70 usec
PL1       -1.00 dB
SFO1      500.1322506 MHz

F1 - Acquisition parameters
ND0       2
TD        32768
SFO1      500.1322506 MHz
FIDRES   20.176910 Hz
SW        10.328 ppm

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        500.1299882 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        -1.50 Hz
GB        0.15
PC        0.50

F1 - Processing parameters
SI        32768
SF        500.1300000 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0.15
    
```



Фиг. 6

