

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 223

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.07.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.07.1997 30.07.1997**
30.07.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19732866 1997/19732855**
1997/19732822

(33) Země priority: **DE DE DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/04770**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/06057**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 35/78

A 61 P 15/00

A 61 P 25/32

A 61 P 13/08

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

INDENA S. P. A., Milano, IT;

(72) Původce:

Bombardelli Ezio, Milano, IT;

Gabetta Bruno, Milano, IT;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1,

110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Sójový extrakt, způsob jeho přípravy a
farmaceutický prostředek, který jej obsahuje

(57) Anotace:

Nové sójové extrakty s určitým poměrem sójových saponinů
ku glukosidiso flavonům; způsob jejich přípravy; a
farmaceutický prostředek, který obsahuje tyto extrakty.

Sójový extrakt, způsob jeho přípravy a farmaceutický prostředek, který jej obsahuje

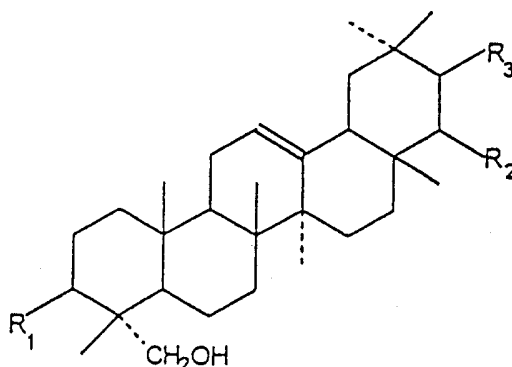
Oblast techniky

Vynález se týká nových extraktů získaných extrakcí zralých celých sójových bobů nebo sójové mouky zbavené oleje (glycin max (L.) MERRIL, třída Leguminosae), způsobu jejich přípravy a prostředků, které obsahují tyto extrakty. Nové extrakty se vyznačují tím, že obsahují v určitém poměru isoflavony a saponiny.

Dosavadní stav techniky

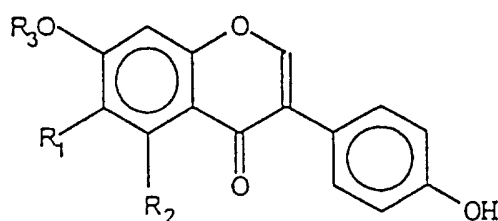
Je známo, že sója obsahuje saponiny a isoflavony a dále sacharidy a aminokyseliny, a také proteiny a minerální soli v množství, které závisí na oblasti původu a podmínkách, za jakých byla rostlina pěstována a sklizena.

Saponinové látky byly rozděleny do tří tříd podle chemické struktury jejich triterpenové části: sójové saponiny skupiny A, B a E (Okubo K. a další, ACS Symp., Ser. 546, 330, 1994).



	R ₁	R ₂	R ₃
skupina A	sacharidový řetězec	sacharidový řetězec	OH
skupina B	sacharidový řetězec	OH	H
skupina E	sacharidový řetězec	-O	H

Isoflavonové sloučeniny se dělí na glukosidisořlavony (daidzin, genistin a glycitin), které mohou obsahovat acylové například malonylové zbytky připojené k řetězci sacharidu.



	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzin	H	H	D-glukosa
Glycitin	OCH ₃	H	D-glukosa
Genistin	H	OH	D-glukosa
Naizdein	H	H	H
Glycitein	OCH ₃	H	H
Genistein	H	OH	H

Podle biomedicínálních publikací a epidemiologických prací publikovaných v nedávné době (hlavně u východních národů, které ve velkém konzumují potraviny na bázi sóji) požívání těchto potravin účinně omezuje premenopausální a postmenopausální symptomy (A. Cassidy, Proceedings of the Nutrition Society,

1996, 55, 339-417). Tato fakta, která dosud postrádají jasný vědecký základ, jsou obvykle přisuzována isoflavon a glykongenisteinu, daidzeinu a glyciteinu, které jsou přítomné v různých sójových potravinách.

Isoflavony se obvykle považují za rostlinné estrogény a řada *in vitro* studií prokázala, že tyto látky působí na mechanismy ovlivňující savčí estrogény s aktivitou řádově (500 až 1000) nižší, než estradiol (D.A. Shutt a R.I. Cox, *Journal of Endocrinology*, 1972, 52, 299-310).

Podle dalších biomedicínálních publikací a epidemiologických prací publikovaných v nedávné době (hlavně u východních národů, které ve velkém konzumují potraviny na bázi sóji) požívání těchto potravin účinně omezuje výskyt rakoviny prsu u žen a rakoviny prostaty u mužů (A. Nomura, B.E., Henderson J. Lee, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1978, 31, 2020-2025; T. Eirayamn v *Diet, Nutrition and Cancer*, 1986 str. 41-53, Y. Hayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Takayana, L. Tomatis, L.W. Wattenberg a G.N. Wogan, Tokyo: Japanese Scientific Society Press; R.K. Severson, A.M.Y. Nomura, I.S. Grove, G.N. Stemmerman, *Cancer Research*, 1989, 49, 1857-1860). I tato fakta, která dosud postrádají jasný vědecký základ, jsou obvykle přisuzována isoflavon a glykongenisteinu, daidzeinu a glyciteinu, které jsou přítomné v různých sójových potravinách.

Tyto isoflavony byly studovány v *in vitro* modelech s ohledem na jejich schopnost interagovat s proteinkinasami, zejména tyrosinkinasou, což jsou enzymy, které pravděpodobně hrají roli při proliferaci nádorových buněk.

V současné době bylo popsáno mnoho způsobů přípravy léčiv na bázi sójových extraktů pro preventivní léčení premenopausálních

a postmenopausálních symptomů a také rakoviny. Některé patenty nebo patentové přihlášky popisují prostředky s novými sójovými extrakty získanými chemickou nebo enzymatickou hydrolýzou glukosidiso flavonů přítomných v sójových bobech nebo jejich výhoncích (Kikkoman Corp. J-08291191; Kikkoman Corp. J-07173148; Kelly GE WO-9323069; Kikkoman Corp. J-0511707566). Všechny tyto publikace jsou ale považovány pouze za přípravu isoflavonů s vysokou koncentrací a aktivitou (s ohledem na ovlivňování premenopausálních a postmenopausálních poruch a protirakovinnou aktivitu).

Nyní bylo objeveno, že narozdíl od dřívějších popisů jsou samotné isoflavony (s ohledem na prevenci i léčení premenopausálních a postmenopausálních symptomů a prevenci i léčení rakoviny) značně aktivnější než extrakty, které obsahují v určitém poměru glukosidiso flavony a sójové saponiny skupiny B.

Dalším aspektem spojeným s extrakty v souladu s předkládaným vynálezem je zneužívání alkoholu a alkoholová závislost. Toto jsou fenomény, které lze shrnout pod pojmem "alkoholismus" a tvoří závažný problém současné moderní společnosti (Gessa G.L., "Bisogno compulsive di bere e principio del piacerell [Nutkání k pití a princip radosti] v Medicina delle tossicodipendenze [Léčení drogové závislosti] II, 5 (1994)). Například v Itálii jsou víc než 9 % populace (asi 5 milionů osob) tzv. těžcí konzumenti a více než 1 milion osob jsou alkoholově závislí (Calamo-Spechhia F.P., "Epidmiologia dell'alcolismo v Italia" [Epidemiologie alkoholismu v Itálii] v Atti del VII Congresso Nazionale della S.I.A. [Sborník 7. národního kongresu S.I.A.] Mediserve, Řím, 295-301 (1991)). Tato čísla se zvyšují, když vezmeme v úvahu USA, kde je více než 13 milionů osob závislých na alkoholu. Zneužívání alkoholu a současná alkoholová

závislost vedou k velmi vysokým státním výdajům (od roku 1991 bylo v USA takto použito asi 200 miliard dolarů ročně) a jsou příčinou velkých sociálních a psychologických problémů postižených.

Stávající přístupy k léčení alkoholismu kromě psychologických (skupinová terapie apod.) sestávají z podávání léků jako je disulfiram a kalciumkarbamid, které ovlivňují metabolismus alkoholu resp. inhibují jaterní aldehyddehydrogenasu, a tak zvyšují hladinu dávicího acetaldehydu a způsobují výskyt všech nepříjemných jevů spojených s požíváním alkoholu.

Podle dosavadního stavu techniky byla jedinou rostlinou používanou při léčení alkoholismu *Pueraria lobata* (*Radix puerarie*) a *Salvia miltiorrhiza*, které se hojně užívají v tradiční čínské medicíně a tvoří podstatu patentové přihlášky WO 93/00896 a WO 96/35441. Kromě použití extraktů tyto patentové přihlášky nárokují použití čistých látek jako je daidzein a jeho semisyntetické deriváty ve WO 93/00896 nebo diterpenoidy jako jsou tanshinon a miltiron ve WO 96/35441. Účinek na alkoholdehydrogenasu s výše uvedenými postranními efekty byl uveden i u derivátů isoflavonu, zatímco byl stejný mechanismus u diterpenoidických sloučenin vyloučen. Dále uvádí patentová přihláška WO 96/36332 účinek forskolinu na snížení spotřeby alkoholu.

Nyní bylo překvapivě objeveno, že lze s úspěchem pro snížení patologické spotřeby alkoholu použít extrakty obsahující v určitém poměru glukosidiso flavony a sójové saponiny skupiny B. Tyto extrakty jsou značně účinnější než samotné isoflavony a působí jiným mechanismem, než je inhibice alkoholdehydrogenasy, protože plasmová koncentrace alkoholu zůstává nezměněna.

Kromě výše uvedeného dosavadního stavu techniky uvádí WO 96/10341 dietetické nebo zdravotnické prostředky obsahující v podstatě čisté hypokotyly sójových semen. Není zde ale uvedena žádná zmínka o postupu extrakce ani o poměru isoflavonů a saponinů v souladu s předkládaným vynálezem.

Patent US 4,428,876 uvádí způsob izolace saponinů a flavonoidů z luštěnin. Uvedená extrakce sójových bobů 0,4% vodným hydroxidem sodným ale poskytuje jiný konečný extrakt než ten v souladu s předkládaným vynálezem. A opět zde není žádný odkaz na poměr isoflavonů a saponinů v souladu s předkládaným vynálezem.

Patent JP 59088064 vede pouze k izolaci a použití samotných saponinů. Téhož se týká DE 34 00 258. Podobně JP 61036225 vede k izolaci a čištění saponinů a JP 62005917 k přípravě čistých saponinů zcela prostých isoflavonů. Práce JP 4036242 se týká přípravy čistého saponinu nebo extraktu obsahujícího vysoký poměr saponin/isoflavone jako protizánětlivého činidla.

Patent EP-A-426 998 uvádí přípravu isoflavonů ze sójových bobů a zejména genistinu a daidzinmalonátu. Není zde žádná zmínka o extrakci saponinů a o poměru isoflavonů a saponinů.

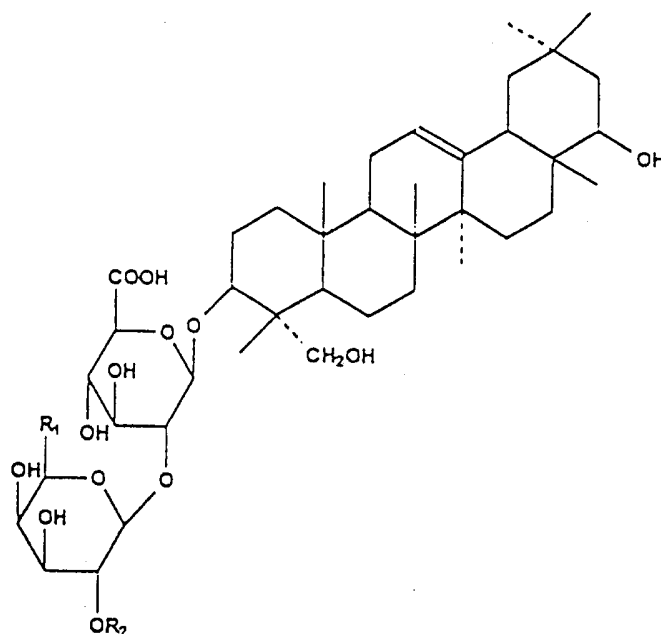
Práce JP 63245648 vede k přípravě sójové potraviny zbavené saponinů a isoflavonů, které jsou shledány způsobujícími pachutí a nepoživatelnost potraviny.

Mark Messina a další, Journal of the National Cancer Institute, Vol. 83, No. 8, 17.4. 1991, strany 541-546, uvádí roli sójových produktů při potlačování rizika rakoviny, která již byla uvedena ve vědecké literatuře. Ani tento ani jiný dokument ale neuvádí extrakt obsahující saponiny a isoflavony v poměru jako předkládaný vynález natož farmakologický účinek dostupný takto specifickým extraktem.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se proto týká extraktu, který obsahuje 0,6 až 1,5 hmotnostního dílu, s výhodou 1 hmotnostní díl sójového saponinů skupiny B na 1 hmotnostní díl glukosidisoflavonů, kdy je obsah glukosidisoflavonů v extraktu alespoň 13 % hmotnostních.

Jak ukázala HPLC-MS analýza, mají sójové saponiny skupiny B, které způsobují výhodný efekt na aktivitu isoflavonové složky, následující strukturu:



	R ₁	R ₂
sójový saponin V	CH ₂ OH	glukosa
sójový saponin II isomer	CH ₃	arabinosa
sójový saponin I	CH ₂ OH	ramnosa
sójový saponin II	H	ramnosa
sójový saponin III	CH ₂ OH	H
sójový saponin IV	H	H

Vynález se dále týká způsobu přípravy výše uvedených extraktů, který se vyznačuje tím, že zahrnuje následující kroky:

- a) extrakce zralých celých sójových bobů nebo sójové mouky zbavené oleje alifatickými alkoholy nebo směsí těchto alkoholů s vodou;
- b) zahuštění extraktu z kroku a);
- c) čištění zahuštěného extraktu z kroku b) od olejovitých a lipofilních látek působením alifatických uhlovodíků;
- d) extrakce aktivních složek pomocí s vodou nemísitelných alifatických alkoholů;
- e) zahuštění extraktu z kroku d) a jeho vysušení.

Konkrétně lze extrakty v souladu s předkládaným vynálezem připravit extrakcí zralých celých sójových bobů nebo sójové mouky zbavené oleje, které obsahují sójové saponiny skupiny B a glukosidisoflavony ve vzájemném poměru 3:2 až 2:3 pomocí alifatických alkoholů samotných nebo ve směsi s vodou, výhodně pomocí směsi ethanol/voda jako je 95% čistý ethanol. Po zahuštění extraktu a čištění od olejovitých a lipofilních látek působením alifatických uhlovodíků (např. n-hexanu nebo n-heptanu) se aktivní složky extrahují pomocí s vodou nemísitelných alifatických alkoholů jako je n-butanol, isobutanol a isoamylalkohol. Po zahuštění na menší objem se organická fáze vysuší za sníženého tlaku. Vynález se dále týká modifikací výše uvedeného postupu, kdy se po krocích b) nebo c) zahuštěný alkoholový extrakt podrobí následujícímu kroku d'), který je následován krokem e):

d') adsorpce aktivních složek na polystyrenovou adsorpční pryskyřici; promytí pryskyřice vodou; vymytí aktivních složek ethanolem.

V souladu s touto modifikací lze typický extrakt podle předkládaného vynálezu připravit adsorpcí aktivních složek (isoflavonů a saponinů), které jsou přítomné v zahuštěném alkoholovém extraktu rostlinného materiálu, na polystyrenové adsorpční pryskyřici jako je duolit nebo jakýkoliv XAD, zejména XAD1180 kvůli svému mírně kyselému pH; a zpětným vymytím směsí isoflavonů a sójových saponinů skupiny B ethanolem po pečlivém promytí sloupce pryskyřice vodou za odstranění solí a dalších neaktivních složek.

Extrakt získaný za těchto podmínek obsahuje 13 až 17 % hmotnostních isoflavonů a 0,6 to 1,5 hmotnostního dílu sójových saponinů skupiny B (v závislosti na kvalitě použitého rostlinného materiálu) na 1 hmotnostní díl glukosidiso flavonů. Tento extrakt obsahuje i velké množství polyfenolických látek, které se ukázaly být nezbytné pro vlastní aktivitu extraktu.

Provedení výše uvedeného postupu a jeho modifikací zahrnuje následující kroky:

- f) suspendování extraktu z kroku e) ve směsi s vodou mísitelného alkoholu a vody a jeho zředění s vodou nemísitelným aprotickým rozpouštědlem;
- g) zahřívání směsi z kroku f) pro dokončení rozpouštění a ponechání při teplotě místnosti;
- h) oddělení vysrážených sójových saponinů skupiny B filtrací;

- i) oddělení organické a vodné fáze a zahuštění organické fáze a její vysušení za získání isoflavonové složky; a
- j) smíchání saponinů z kroku h) a isoflavonů z kroku i) za účelem vytvoření extraktu.

A tak lze získat i extrakty v souladu s předkládaným vynálezem, které se vyznačují velmi vysokým obsahem glukosidiso flavonu a sójových saponinů skupiny B ve výše popsaném poměru, a to z extraktu získaného výše popsaným postupem nebo jeho modifikací. Za tím účelem lze postup provést následovně: uvedený extrakt se suspenduje v alkoholu mísitelném s vodou jako je ethanol nebo methanol s obsahem vody 10 až 50 % objemových a zředí se s vodou nemísitelným aprotickým rozpouštědlem jako je ethylenchlorid nebo ethylacetát. Získaná heterogenní směs se zahřeje pro dokončení rozpouštění extraktu a ponechá se při teplotě místnosti, takže se mohou vysrážet sójové saponiny skupiny B. Saponiny, které mají čistotu vyšší než 90 %, se oddělí filtrací. Isoflavonové složky, které mají čistotu více než 80 % se získají z vodných matečných louhů oddělením organické fáze a jejím zahuštěním a vysušením. Isoflavony a saponiny lze pak smísit za účelem získání extraktu s nejvyšším možným obsahem glukosidiso flavonů a s obsahem sójových saponinů skupiny B od 0,6 do 1,5 hmotnostního dílu na 1 hmotnostní díl glukosidiso flavonů.

Dále jsou uvedeny výhodné podmínky pro provedení jednotlivých kroků postupu v souladu s předkládaným vynálezem. V tomto případě jsou jednotky pro měření objemových dílů „litry“ a hmotnostních dílů „kilogramy“.

Krok a: rostlinný materiál se s výhodou extrahuje 12 až 17 objemy rozpouštědla na 1 hmotnostní díl biomasy. Ex-

trakční teplota je s výhodou nad 55 °C. Každá extrakce se s výhodou provádí v periodě kratší než 4 hodiny. Vhodná rozpouštědla kromě ethanol jsou mj. methanol, propanol a isopropanol. tato rozpouštědla mohou obsahovat do 10 % vody.

Krok b: extrakt se s výhodou zahustí při teplotě do 50 °C za sníženého tlaku. Extrakt se s výhodou zahustí na obsah alkoholu 65 až 75 %.

Krok c: čištění se s výhodou provádí za použití 0,3 až 0,6 objemů alifatického uhlovodíku na 1 hmotnostní díly rostlinného materiálu. Vhodný postup je extrakce olejovitých a lipofilních látek.

Krok d: aktivní složky se s výhodou extrahují 0,2 až 0,4 objemy alkoholického s vodou nemísitelného rozpouštědla na každou extrakci počítáno na 1 hmotnostní díl rostlinného materiálu; s výhodou se provedou 3 extrakce.

Krok e: extrakt z kroku d se s výhodou zahustí při teplotě do 50 °C za sníženého tlaku.

Krok f: extrakt z kroku e) se s výhodou suspenduje v 5 až 10 objemech (na 1 díl extraktu) ve s vodou mísitelném alkoholu za použití poměru alkohol/voda v rozsahu od 2:8 do 3:7 objem/objem. Aprotické s vodou nemísitelné rozpouštědlo se s výhodou použije v množství 2 až 5 objemů na 1 hmotnostní díl extraktu z kroku e.

Krok g: k dosažení úplného rozpuštění se směs s výhodou zahřívá k varu. Směs se pak s výhodou ponechá stát při teplotě místnosti 15 až 24 hodin.

Krok i: organická fáze se s výhodou zahustí odpařením při teplotě do 30 °C za sníženého tlaku.

Krok j: saponiny z kroku h a glukosidisoflavony z kroku g se s výhodou použijí k přípravě alkoholického roztoku, který obsahuje saponiny a glukosidisoflavony v poměru 1:1. Roztok se pak s výhodou zahustí do sucha při teplotě do 50 °C za sníženého tlaku.

Množství isoflavonů a sójových saponinů skupiny B se stanoví HPLC analýzou za použití Supelco-Sil LC-ABZ kolony (250 mm x 4,6 mm), 5 µm, a ternárního elučního média s gradientem, které obsahuje A) H₂O (CF₃COOH 0,01 %), B) acetonitril (CF₃COOH 0,01 %) a C) methylalkohol (CF₃COOH 0,01%). Jednotlivé složky lze identifikovat a charakterizovat hmotnostní spektroskopií v kombinaci s HPLC a termosprej interface.

Extrakty v souladu s předkládaným vynálezem se liší od dříve známých extraktů kvůli svému zvláštnímu působení. Z poruch v menopauze jsou nejčastější klimakterické poruchy, kterými ženy trpí v menopauze, návaly horkosti, nespavost a deprese. Jsou spojeny se snížením nebo zastavením činnosti vaječníků a spojenou sníženou tvorbou estrogenu a zvýšenou tvorbou luteinizačního hormonu (LH) a folikulus stimulujícího hormonu (FSH).

Současné studie (Duker E.M. a další; Planta Med. 57, 420, 1991) uvádějí spojitost mezi příležitostným zvýšením LH a teplotními změnami kůže samic krys po vynětí vaječníků. Tato spojitost mezi hladinou LH a návaly horkosti, která byla pozorována nejen v případě krys, ale i žen, napovídá, že množství vylučovaného LH může být vhodným parametrem pro studování psychoneurotického a endokrinního účinku aktivních endokrinních sloučenin.

Tabulka 1 uvádí výsledky získané u kryš po vyjmutí vaječníků při podávání dvou oddělených frakcí (isoflavony a sójové saponiny skupiny B) a extraktu v souladu s předkládaným vynálezem.

Tabulka 1: Koncentrace luteinizačního hormonu (LH) v plasmě u kryš po vyjmutí vaječníků po perorálním podávání sójového extraktu

Podávaný produkt	Dávka (mg/kg/den)	LH (ng/ml)
Nosič	10 ml/kg	6,2±0,01
Sójové saponiny skupiny B	1000	5,8±0,02
Sójové isoflavony	1000	3,4±0,001
Sójový extrakt připravený podle příkladu 1	1000	2,1±0,001
Sójový extrakt připravený podle příkladu 3	1000	1,3±0,001

Samice kryš byly podrobeny ovariometri známým způsobem. Po 15 dnech po operaci byla zvířatům podávána testovaná látka: jednorázově, perorálně, 15 dnů. Zvířata byla usmrcena 3 hodiny po poslední dávce. Krev byla odstředěna hned nato a získané sérum bylo až do stanovení LH radioimunologickým testem podle Niswender a další (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 807, 1986) skladováno při -25 °C.

Jek je vidět, podávání extraktu v souladu s předkládaným vynálezem vedlo ke statisticky významnému snížení hladiny LH, které bylo větší než součet jednotlivých složek (synergický efekt).

Extrakty použité u opakovaného léčení zdravých zvířat nevedly k žádným makroskopickým ani mikroskopickým změnám orgánů ani

systémů u samců krys, když u samic došlo ke změně hmotnosti dělohy a kostry, což potvrzuje estrogení aktivitu.

Když byly extrakty v souladu s předkládaným vynálezem podávány ženám v menopauze (bez ohledu jestli k ní došlo přirozeně nebo chirurgicky), došlo ke změně hladiny LH v plasmě a omezení menopausálních poruch, jako jsou návaly horkosti nebo deprese apod. v několika dnech podávání a při dlouhodobější léčbě došlo i ke snížení demineralizace kostí.

Extrakty v souladu s předkládaným vynálezem mají i značnou antiproliferační aktivitu. Tabulka 2 uvádí antiproliferační *in vitro* aktivitu u kmene nádorových buněk vaječníku (OVCA 433).

Tabulka 2: Antiproliferační aktivita sójových extraktů proti nádorovým buňkám vaječníku (OVCA 433) *in vitro*.

Sloučenina	IC ₅₀ μM
Sójové saponiny skupiny B	6,2
Sójové isoflavony	4,5
Sójový extrakt připravený podle příkladu 1	1,6
Sójový extrakt připravený podle příkladu 3	1,1

Buňky byly kultivovány v monovrstvě na minimu esenciálního média obsahujícího přidané telecí sérum a 200 jednotek/ml penicilinu pro udržení sterility média. Za účelem reprodukovatelnosti testů byly buňky každý týden trypsinizovány a naneseny na desku s hustotou 8×10^4 buněk/ml a inkubovány při 37 °C na vzduchu s obsahem 5 % CO₂ a vlhkosti. Za účelem testování aktivity sloučenin byly buňky naneseny do jamek (Falcon 3046, Becton Dickinson NY) při koncentraci 1×10^5 /ml v minimálním množství substrátu. Po 24 hodinách byl substrát vyměněn za čerstvý a byly přidány sloučeniny rozpuštěné v absolutním ethanolu. Kontrolní pokus byl proveden s excipientem za absence

aktivní sloučeniny. Výše uvedený postup byl opakován ve 24hodinových intervalech po dobu 72 hodin. Inhibice proliferace buněk byla stanovena přímým počítáním buněk za porovnání testovaného a kontrolního vzorku. Ukázalo se, že extrakty v souladu s předkládaným vynálezem mají antiproliferační aktivitu, která je větší než součet antiproliferačních aktivit jejich složek (synergická aktivita). Sloučeniny v souladu s předkládaným vynálezem inhibovaly buněčnou proliferaci *in vivo*, což bylo ověřeno měřením velikosti nádorů transplantovaných nahým atymickým myším podle běžných postupů popsanych v literatuře. Podávání dávek v rozsahu 10 až 500 mg/kg vedlo ke značné degeneraci studovaných nádorů až po jejich zmizení u vysokého procenta jedinců.

Inhibiční efekt na spotřebu alkoholu byl stanoven pomocí alkoholických krys druhu „Sardinská alkoholička“ (Sp) (Fadda F., Mosca E., Colombo G., Gessa G.L., Alcohol Preferring rats; Genetic sensitivity to alcohol-induced stimulation of dopamin metabolism, v Fysiol. Behav. 47, 727 (1990)). Tato zvířata, která měla volný výběr mezi vodou a alkoholem, požívala denně 6 až 7 g alkoholu na 1 kg tělesné hmotnosti (při poměru voda: alkohol více než 2:1), byla v posledních letech použita ke stanovení účinku různých látek na dobrovolnou spotřebu alkoholu, viz. např. Balakleevsky A., Colombo G., Padda F., Gessa G.L., Ro 19-4603, a benzodiazepine receptor inverse agonist, attenuates voluntary ethanol consumption in rats selectively bred for high ethanol preference, Alcohol Alcohol 25, 449-452 (1990); Fadda F., Garau B., Colombo G., Gessa G.L., Isradipine and other calcium channel antagonists attenuate ethanol consumption in ethanol-preferring rats, Alcoholism: Clinical and Experimental Research 16 (3), 449-452 (1992).

Zvířata chovaná za normálních podmínek měla volný výběr mezi vodou (která byla vždy k dispozici) a alkoholem (10% roztok objem/objem), který byl nabízen ve 4 hodinových periodách každý den (tj. první 4 hodiny temna během cyklu den/noc). Každý den ve stejnou dobu byla zaznamenána spotřeba vody a alkoholu. Potrava byla k dispozici dle libosti. Když byla dosažena stabilní spotřeba alkoholu a vody, začalo perorální podávání extraktu v dávce 1000 mg/kg suspendovaného ve vodě (2 ml/kg, jednou za den, 7 po sobě jdoucích dnů). Jako kontrolní pokus byl použit stejný objem excipientu. Na konci podávání byla zaznamenávána spotřeba alkoholu, dokud nedosáhla hodnot před podáváním.

Tabulka 3 ukazuje účinek opakovaného perorálního podávání 1000 mg/kg sójového extraktu na spotřebu alkoholu.

Tabulka 3 vede k závěru, že sójový extrakt významně snižuje spotřebu alkoholu. Snížená spotřeba alkoholu zůstává během 7 dnů podávání konstantní a zpátky narůstá až po ukončení léčení. Dále je vidět, že snížení spotřeby alkoholu je významnější než jen součet účinků jednotlivých složek (synergický efekt).

Tabulka 3 - Účinek opakovaného perorálního podávání sójových extraktů na spotřebu alkoholu u Sp krys (Sardinské alkoholičky)

SLOUČENINA	Dávka (mg/kg)	Spotřeba alkoholu (g/kg)				
		den 1	den 2	den 3	den 4	den 5
Nosič	2 ml/kg	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,6 ± 0,2
Saponiny skupiny B	1000	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,2* ± 0,1
Sójové isoflavony	1000	2,6 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,3	1,9* ± 0,2
Extrakt z příkladu 1	1000	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,3	2,0* ± 0,1	1,8* ± 0,1
Extrakt z příkladu 3	1000	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,3	2,1* ± 0,1	1,6** ± 0,1

POKRAČOVÁNÍ		den 6	den 7	den 8	den 9	den 10
Nosič	2 ml/kg	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,2	2,6 ± 0,2
Saponiny skupiny B	1000	2,2* ± 0,1	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2
Sójové isoflavony	1000	1,9* ± 0,2	2,0* ± 0,1	1,9* ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,6 ± 0,3
Extrakt z příkladu 1	1000	1,6** ± 0,1	1,4** ± 0,2	1,5** ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,4 ± 0,3
Extrakt z příkladu 3	1000	1,7** ± 0,1	1,2** ± 0,2	1,2** ± 0,1	1,9* ± 0,2	2,2 ± 0,3

* p < 0,05, ** p < 0,01; Dunnettův t-test pro násobné porovnání s kontrolním vzorkem

30.100

Vynález se proto týká i farmaceutických prostředků, které obsahují jako aktivní složku výše uvedený extrakt. Konkrétně se vynález týká: farmaceutického prostředku obsahujícího tento extrakt pro prevenci nebo léčení premenopausálních nebo postmenopausálních symptomů; farmaceutického prostředku obsahujícího tento extrakt pro prevenci nebo léčení rakoviny prsu žen a prostaty mužů; a farmaceutického prostředku obsahujícího tento extrakt pro prevenci nebo léčení alkoholismu.

Prostředky nebo extrakty v souladu s předkládaným vynálezem lze vhodným způsobem upravit do formy tablet, měkkých nebo tvrdých želatinových kapslí, granulovaného prášku pro přípravu instantních roztoků nebo tekutin nebo kapalin, které odpovídají jejich rozpustnosti. Dávky extraktu v souladu s předkládaným vynálezem jsou v rozsahu 30 mg až 500 mg za den v případě jednorázového nebo opakovaného podávání, s výhodou 200 mg při podávání dvakrát denně. Výhodná forma podávání je perorální.

Příklady provedení vynálezu

Vynález ilustrují následující příklady.

Příklad 1 Příprava sójového extraktu s obsahem isoflavonu 15 % hmotnostních a poměrem glukosidiso flavonu ku sójovým saponinům B skupiny 1:1,5 čištěním rozpouštědly.

10 kg sójové mouky zbavené oleje obsahující 0,2 % glukosidiso flavonů a 0,3 % sójových saponinů skupiny B se pětikrát zahřívá k varu vždy ve 30 litrech 95% ethylalkoholu. Alkoholové extrakty se spojí a zahustí za sníženého tlaku na objem 5 litrů. Koncentrát se zředí 1,5 litrem vody a čtyřikrát se extrahuje 5 l n-hexanu. Hexanová fáze se odloží a zahuštěná alkoholová fáze se čtyřikrát extrahuje 2,5 l n-butanolu.

Organická fáze se zahustí a vysuší za sníženého tlaku. Získá se 133 g extraktu obsahujícího 15 % hmotnostních isoflavonu a 22,5 % hmotnostních sójových saponinů skupiny B.

Chromatogram z HPLC extraktu získaného postupem podle tohoto příkladu je uveden na obrázku 1.

Příklad 2 - Příprava sójového extraktu s obsahem isoflavonu 15 % hmotnostních a poměrem glukosidiso flavonu ku sójovým saponinům B skupiny 1:1,5 čištěním na polystyrenové pryskyřici

Vodný koncentrát připravený podle příkladu 1 se neextrahuje n-butanolem, ale podrobí se působení polyethoxylovaného ricínového oleje (Cremofo[®]), a to za účelem rozpuštění pryskyřičných zbytků po zahuštění alkoholové fáze. Směs se potom aplikuje suspendovaná v čištěné vodě (5 l) na kolonu pryskyřice XAD1180. Kolona se promyje vodou za úplného odstranění solí, sacharidů a povrchově aktivních látek, a pak se vymývá 10 litry 95% ethylalkoholu. Po zahuštění a vysušení ethanolové fáze se získá 130 g extraktu se stejným složením jako v příkladu 1.

Příklad 3 - Příprava sójového extraktu s obsahem isoflavonu 43 % hmotnostních a poměrem glukosidiso flavonu ku sójovým saponinům B skupiny 1:1

Extrakt (200 g) získaný v příkladu 1 nebo 2 se suspenduje v 1 l 20% vodného ethylalkoholu a zředí se 0,5 l ethylacetátu. Suspenze se za intenzivního míchání zahřívá k varu až do úplného rozpuštění, a pak se nechá stát přes noc. Tím dojde k vysrážení saponinů (38 g, 93% čistota), které se oddělí filtrací, a oddělení vodných matečných louhů, které obsahují ethylacetát a vodu. Organická fáze se zahustí za sníženého

tlaku a vysuší se. Isoflavonový zbytek (37 g) o čistotě 81 % se rozpustí v 1 l ethylalkoholu a přidá se 32 g krystalických saponinů za účelem získání produktu, který obsahuje isoflavony a saponiny v hmotnostním poměru 1:1. Alkoholový roztok se zahustí do sucha za sníženého tlaku a poskytne 69 g extraktu s obsahem glukosidisořlavonů 43 % hmotnostních a obsahujícího 43 % hmotnostních sôjových saponinů skupiny B.

Příklad 4 - Příprava tvrdých řelatinových tobolek obsahujících sôjový extrakt

Sôjový extrakt připravený podle příkladu 1	200,0 mg
Laktosa	67,5 mg
Mikrokrystalická celulosa	22,5 mg
Koloidní oxid křemičitý	3,0 mg
Sodná sůl kroskarmelosy (zesítěný polymer sodné soli karboxymethylcelulosy)	21,0 mg
Mastek	8,0 mg
Stearan hořečnatý	3,0 mg

Příklad 5 - Příprava tablet obsahujících sôjový extrakt

Sôjový extrakt připravený podle příkladu 3	400,0 mg
Sôjové polysacharidy	155,5 mg
Mikrokrystalická celulosa	57,0 mg
Hydroxypropylmethylcelulosa	12,0 mg
Ztužený rostlinný tuk	19,5 mg
Koloidní oxid křemičitý	3,0 mg
Stearan hořečnatý	3,0 mg

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sójový extrakt v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje 0,6 až 1,5 hmotnostního dílu sójových saponinů skupiny B na 1 hmotnostní díl glukosidiso flavonů a že obsah glukosidiso flavonů v extraktu je alespoň 13 % hmotnostních.
2. Sójový extrakt podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje 1 hmotnostní díl sójových saponinů skupiny B na 1 hmotnostní díl glukosidiso flavonů.
3. Způsob přípravy extraktu podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje následující kroky:
 - a) extrakce zralých celých sójových bobů nebo sójové mouky zbavené oleje, obsahujících sójové saponiny skupiny B a glukosidiso flavony ve vzájemném poměru 3:2 až 2:3, alifatickými alkoholy nebo směsí těchto alkoholů a vody;
 - b) zahuštění extraktu z kroku a);
 - c) čištění zahuštěného extraktu z kroku b) od olejovitých a lipofilních látek působením alifatických uhlovodíků;
 - d) extrakce aktivních složek pomocí s vodou nemísitelných alifatických alkoholů;
 - e) zahuštění extraktu z kroku d) a jeho vysušení.
4. Modifikace způsobu podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , že po kroku b) nebo kroku c) se zahuštěný alkoholový extrakt podrobí následujícímu kroku d'), který je následován krokem e):

- d') adsorpce aktivních složek na polystyrenovou adsorpční pryskyřici; promytí pryskyřice vodou; vymytí aktivních složek ethanolem.
5. Způsob podle nároku 3 nebo 4 v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje následující další kroky:
- f) suspendování extraktu z kroku e) ve směsi alkoholu mísitelného s vodou a vody a jeho zředění aprotickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou;
 - g) zahřívání směsi z kroku f) pro dokončení rozpouštění a ponechání směsi při teplotě místnosti;
 - h) oddělení vysrážených sójových saponinů skupiny B filtrací;
 - i) oddělení organické a vodné fáze; a zahuštění organické fáze a její sušení za získání isoflavonových složek; a
 - j) smísení saponinů z kroku h) a isoflavonů z kroku i) za účelem vytvoření extraktu.
6. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako aktivní složku obsahuje extrakt podle nároku 1 nebo 2.
7. Farmaceutický prostředek podle nároku 6 pro prevenci nebo léčení premenopausálních a postmenopausálních symptomů.
8. Farmaceutický prostředek podle nároku 6 pro prevenci nebo léčení rakoviny.
9. Farmaceutický prostředek podle nároku 6 nebo 8 pro prevenci nebo léčení rakoviny prsu žen.

10. Farmaceutický prostředek podle nároku 6 nebo 8 pro prevenci nebo léčení rakoviny prostaty mužů.
11. Farmaceutický prostředek podle nároku 6 pro prevenci nebo léčení alkoholismu.

20.01.00

1/1

PV 2000 - 223

Obr. 1

