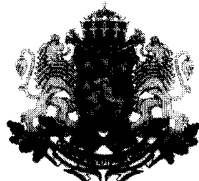


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 97371A
(51) A61K 35/78

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 97371				(71) Заявител(и):			
(22) Заявено на 28.01.1993				D'ARRIGO , CLAUDIO . , ROMA ,			
(24) Начало на действие				ROMA (IT) ;			
на патента от:				(72) Изобретател(и):			
				D'ARRIGO , CLAUDIO . , ROMA (IT)			
				;			
				(74) Представител по индустриална			
				собственост:			
				Румяна Стефанова Слабова , 1124			
				София , ул. "Леонардо да Винчи" 3			
Приоритетни данни							
(31)	RM91A000372	(32)	29.05.1991	(33)	IT		
(41) Публикувана заявка в							
бюлетин № 2 24.03.1994							
(45) Отпечатано на							
(46) Публикувано в бюлетин №							
на							
(56) Информационни източници:							
(62) Разделена заявка от рег. №							

**(54) АНТИНЕОПЛАСТИЧЕН ХЕМОТЕРАПЕВТИК ОТ РАСТИТЕЛЕН ПРОИЗХОД
И МЕТОД ЗА НЕГОВОТО ПОЛУЧАВАНЕ**

(57) Антинеопластичният химиотерапевтик включва активни вещества с антинеопластично действие, екстрахирани от растения от семейство Pittosporaceae, или препарати на основата на поне едно вещество или състав , съдържащи се в посочените екстракти. В сравнение с други известни антитуморни лекарства той показва по-висока селективност по отношение на изродените клетки и по-малко разсейване успоредно с метабол изма на здравите клетки. Методът за екстракция и разделяне на компонентите на екстрактите намира приложение за получаване на антинеопластични лекарства или медикаменти за лечение на други патологии.

38 претенции , 0

BG 97371A

EK 405/92

АНТИНЕОПЛАСТИЧЕН ХЕМОТЕРАПЕВТИК ОТ РАСТИТЕЛЕН
ПРОИЗХОД, ~~ПРИТЕЖАВАЩ ВИСОКА СЕЛЕКТИВНОСТ И СИЛНО ПОНИЖЕНА~~
~~ТОКСИЧНОСТ~~ И МЕТОД ЗА НЕГОВОТО ПОЛУЧАВАНЕ

Предмет на настоящето изобретение са вещества и състави, притежаващи антинеопластична активност, екстрахирани от растения от семейство Pittosporaceae, фармацевтични препарати на основата на поне едно от споменатите вещества и състави, метод за тяхното екстрахиране и, респективно техни рецептури.

Както е известно, една от най-перспективните насоки в изследването на неопластичните заболявания, поне от теоретична гледна точка, е антитуморната хемотерапия. Антипролиферационните агенти, изолирани до сега, са от най-различен произход и с различни химични характеристики. Сред тези агенти са, също така, различни растителни екстракти като colchicine и vincallescoblastin, първият екстрахиран от *Colchicum Autumnale*, а вторият от *Vinca Rosea*. Въпреки, че тези вещества повече или по-малко се отличават със специфична антитуморна активност, тяхната селективност по отношение на изродените клетки обикновено е твърде лоша. Опасността от възможното им разсейване успоредно с метаболизма на здравите клетки е важна пречка за тяхната широка употреба.

3 Изненадващо е установено, че с помощта на настоящето изобретение, осигуряващо хемотерапевтичен антинеопластичен агент на основата на активен компонент от растителен произход с високо селективна антитуморна активност и много по-ниска в сравнение с други антитуморни лекарства токсичност, е възможно да се превъзмогнат гореспоменатите ограничения.

Преди всичко, обект на настоящето изобретение е метод за получаване на вещества и/или състави, притежаващи антинеопластична активност, характеризиращ се с това, че части и/или продукти на растения от семейство Pittosporaceae, в които и да е стадий на тяхното развитие или зрелост, се подлагат на следната обработка:

- а) екстракция на компонентите чрез нахисване в органичен разтворител;
- б) възможно разбъркване или разклащане на разтвора, съдържащ екстракта с друг разтворител, поне частично смесваем с

първия с цел разделяне на компонентите на екстракта в образуваните фази;

- в) възможна обработка на всяка фаза, независимо една от друга, с поне една органична течност със свойства на разтворител по отношение на поне един от компонентите на екстракта, последвана от филтруване на всяка суспензия, която може да се образува, отделяне на твърдата фаза и внимателно пречистване;
- г) възможно разделяне на компонентите във всяка от течните фази; и
- д) отделяне на разделените компоненти с антинеопластична активност от тези без антинеопластична активност.

Екстрактите могат да се сушат и пречистват преди всеки следващ етап на метода.

Растенията от семейство Pittosporaceae са за предпочитане от рода *Pittosporum*. В този аспект растенията могат да бъдат подбрани например от групата, съдържаща *Pittosporum undulatum*, *Pittosporum coriaceum*, *Pittosporum viridicolor*, *Pittosporum rhombopholium*, *Pittosporum eugenoides*, *Pittosporum crossifolium* и *Pittosporum Tobira* и техни комбинации.

Разтворителят може да бъде алкохол. Добри резултати са получени при използване на етилов алкохол.

Обемното съотношение между органичния разтворител и обработваните части на растенията е за предпочитане между 1:10 и 10:1.

Времето за обработка е за предпочитане между 5 минути и 3 месеца. Температурата на обработка може да варира за предпочитане между 5°C и 100°C.

За предпочитане е компонентите на екстракта да се раз-

делят хроматографски. Добри резултати са получени при използване на колонна хроматография през силикагел или препаративна колонна HPLC.

Екстракцията може да се осъществи с помощта на етанол и времената на задържане при отделяне на компонентите посредством HPLC са около следните стойности: 1.157, 1.545, 1.883, 2.051, 2.273, 2.572 и 2.743.

(Трябва да се уточни, че аналитичните тестове, и в този случай и при следващите, се извършват на хроматограф Perkin-Elmer 250 снабден с колона 125 mm 4 mm RP 18 с подвижна фаза, съдържаща метанол и вода в съотношение 80:20 и дължина на вълната равна на 210 nm).

След екстракцията с етанол, така полученият разтвор се разклаща с хлороформ до получаване на две фази, алкохол-хлороформена фаза с интензивен зелен цвят и водна фаза с оранжево-жълт цвят. В този случай, компонентите с антинеопластична активност се намират в алкохол-хлороформената фаза. Отделянето на компонентите с антинеопластична активност се извършва хроматографски след изсушаване на алкохол-хлороформената фаза и разтваряне в метанол. При хроматографиране на метанолния разтвор чрез HPLC се отделят компонентите, които имат времена на задържане около 1.969, 2.296 и 2.756.

Алкохол-хлороформеният разтвор може да се концентрира чрез изпарение и да се прибави изопропилов алкохол за образуване на суспензия, която се филтрува, твърдата фаза се изсушава термично и се разпрашава в хаван. След последващо разтваряне в етанол-вода, се пречиства през хроматографска колона с активен въглен. Двете твърди фракции (замърсена и чиста), разтворени в етанол-вода или метанол могат да се хроматографират посредством HPLC като се отделят компонен-

тите, които имат времена на задържане около 1.157, 1.545 и 2.264.

Изобретението също така се отнася до самите вещества и състави, което е следствие от факта, че те могат да се получат по описания по-горе метод.

Предмет на настоящето изобретение са също така вещества и състави, притежаващи антинеопластична активност, характеризиращи се с това, че могат да бъдат получени по описания по-горе метод.

От веществата и съставите, притежаващи антинеопластична активност могат да се получат соли, съединения и комплекси, с цел първите да станат водоразтворими.

Настоящото изобретение още се отнася до фармацевтични препарати, характеризиращи се с това, че съдържат поне един активен компонент - вещество или състав, избран от групата вещества или състави, или комбинация от тях, притежаващи антинеопластична активност и, които са получени по описания по-горе метод.

Фармацевтичният препарат може да бъде избран от групата, съдържаща воден разтвор за парентерална употреба, капсули за орално приемане, свещички за ректално приемане, овули за поставяне във вагината, унгвенти, мехлеми, кремове и гелове.

Водният разтвор може да се постави в ампули. Всяка ампула съдържа между 0.1 и 2.5 g активен елемент, за предпочитане между 0.1 и 1.5 g и най-вече между 0.2 и 1.0 g активен елемент.

В случая, когато фармацевтичният препарат е под формата на капсули, всяка капсула съдържа 0.2-2.0 g активен елемент, за предпочитане 0.8-1.2 g активен елемент.

В случая, когато фармацевтичният препарат е под формата на свещички за ректална употреба, всяка свещичка съдържа между 0.2 и 2.5 g активен елемент, за предпочитане между 0.3 и 1.0 g или между 1.2 и 1.7 g активен елемент.

В случая, когато фармацевтичният препарат е под формата на овули за поставяне във вагината, всяка овула съдържа между 0.1 и 2.5 g активен елемент, за предпочитане между 0.5 и 2.5 g и най-вече между 0.3 и 1.7 g активен елемент.

В случая, когато фармацевтичният препарат е под формата на унгвент, мехлем, крем или гел, локалният носител съдържа между 0.5 и 12 % активен елемент, за предпочитане между 3 и 7 % активен елемент.

Изобретението се отнася също така и до употребата на компонентите, получени чрез екстракция и разделяне съгласно описания по-горе метод, сами или в комбинация, за получаване на медикаменти за лечение на различни патологии, различни от неопластичните.

До тук бяха описани обектите на изобретението най-общо. С помощта на следващите примери ще бъде представено детайлно описание на целта, характеристиките, предимствата и методите за приложение на изобретението.

ПРИМЕР 1

Метод за екстракция и пречистване на активните елементи

1 kg зелени плодове от *Pittosporum Tobira* се смилат фино и се заливат при стайна температура с такова количество етилов алкохол 95^o достатъчно да покрие смлените плодове (Соколо 1:1 об.). Сместа се оставя да кисне в продължение поне на 30 дни, след което се филтрува. 1000 ml от алкохолния екстракт, получен, както е описано по-горе, се поставя в

делителна фуния заедно със същия обем хлороформ. След няколкократно разбъркване настъпва разделяне, което завършва след 24 часа разбъркване: от долната част на фунията се отделя алкохол-хлороформеният интензивно зелен разтвор; в горната част на фунията се образува воден разтвор с жълто-оранжев цвят (оранжева разтворима фракция = OSF) на водоразтворими вещества, екстрахирани от водата, която първоначално се намира в плодовете. OSF е в количество около 20 обемни % и се образува почти изключително от компонентите с време на задържане при HPLC 1.141 (3.45% площ), 1.440 (24.46% площ) и 1.593 (61.93% площ). OSF субстанцията, равна на приблизително 73 тегловни % сухо вещество от общия алкохолен екстракт се образува като жълтеникаво бял прах, който е не само напълно неактивен спрямо експерименталните тумори, но подпомага тяхното развитие, като го ускорява. Следователно тази субстанция се отстранява. Останалият алкохол-хлороформен разтвор се изпарява при 30°C в ротационен вакуумизпарител и се суши. Получава се аморфно вещество, тъмнозелено на цвят, което, когато се разтвори в метанол (1 mg/ml) и се анализира посредством HPLC, показва забележима концентрация на активни пикове с времена на задържане от 1.969 (7.83% площ) до 2.296 (40.12% площ) до 2.756 (1.47% площ).

ПРИМЕР 2

Метод за пречистване на активните съставки

Алкохол-хлороформеният разтвор, останал от обработката, описана в Пример 1 (целия алкохолен екстракт без OSF) се изпарява в колба в ротационен вакуумизпарител при 45°C, докато се концентрира до обем около 30 ml (приблизително 1/35 от първоначалния алкохолен екстракт). Тогава към колба-

та се прибавя изопропилов алкохол в количество равно на 30 % от общия първоначален алкохолен екстракт (300 ml). Образува се суспензия тъй като част от веществата, получени в общото количество алкохолен екстракт без OSF, е разтворима и в етанол и в метанол, но вече не се разтваря в изопропанол.

Така получената суспензия се филтрува през бързофилтруващ филтър. Утайката, която остава върху филтъра се суши при температура 45°C. След като се изсуши се разпрашава в порцеланов хаван. Така се получават приблизително 1500 mg жълто-зеленикав прах. Този прах (който по-нататък ще наричаме CIDI), разтворен в метанол и изследван посредством обичаен HPLC метод показва времена на задържане 1.157 (78.83% площ), 1.545 (16.25% площ) и 2.264 (4.91% площ).

Възможно е, при използване на Supercosil LC-NH₂-5/u-сферична колона, подвижна фаза CH₃CN-H₂O (3:1) за скорост на изтичане 1.5 ml/m и UV детектор при 217 nm да се получат следните стойности на времената на задържане: 1.889 (концентрация 53.88); 2.640 (20.89); 3.145 (4.61); 3.420 (5.08); 3.942 (6.16); 4.722 (4.53); 5.255 (3.253); 6.287 (0.90) и 6.982 (0.66).

При използване на Chromopack-Lichrosorb RP 18-10/u-нерегулярна колона, със същите елуент, скорост на изтичане и маркер, се получават следните пикове: 1.460 (концентрация 65.98); 1.965 (20.87); 2.535 (1.86); 2.704 (2.05); 3.097 (1.74); 3.395 (3.38); 4.324 (0.85); 4.609 (0.93); 9.597 (0.88); 10.017 (1.42).

При калциниране веществото CIDI показва наличие на 3.17% утайка. Елементният анализ в тегловни % (без да се смята утайката) е следният: C 54.25 %; H 7.58 %; O 38.17 %, които съответства на емпирична формула близка до C₁₅H₂₅O₇ и

т.т. (разл.) $196-222^{\circ}\text{C}$. В инфрачервения спектър (спектрофотометър за ИЧС Perkin-Elmer мод. 683) в среда на KBr, концентрация $1\text{ mg}/100\text{ mg}$, се наблюдават следните ивици:

3400 cm^{-1} валентни асоциирани OH; 2960 cm^{-1} асиметрични валентни CH_3 ; 2920 cm^{-1} асиметрични валентни CH_2 ; 1720 cm^{-1} валентни C=O; 1610 cm^{-1} асиметрични валентни C=O на COO^- ; 1460 cm^{-1} вибрационни CH_3 ; 1380 cm^{-1} вибрационни CH_3 (типични за OCOCH_3); 1250 cm^{-1} вибрационни OH; 1150 , 1080 и 1040 cm^{-1} валентни C-O.

UV спектър (спектрофотометър UV-vis Perkin-Elmer мод. Lambda 5):

- 1) Разтвор в $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (4:1), концентрация $6 \cdot 10^{-2}\text{ mg/ml}$:
максимална абсорбция при 202 nm ; абсорбцията бързо намалява до 260 nm , остава постоянна в областта $260-330\text{ nm}$, и след това отново намалява;
- 2) Разтвор в $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (3:1), концентрация $6 \cdot 10^{-2}\text{ mg/ml}$:
абсорбцията бързо намалява от 200 до 260 nm , остава постоянна между 260 и 330 nm , и след това отново намалява.

CIDI под формата на прах е неразтворим в ацетон, бензол, хлороформ, етилов етер, петролев етер, етилов алкохол, изопропилов алкохол; разтворим е в метанол и вода.

Водният разтвор на CIDI има pH 6.5.

LD_{50} върху мишки: CD-1 (ICR) BR е 1274.9 mg/kg (базови граници $1041.2-1561.0\text{ mg/kg}$) орално и 25 mg/kg (базови граници $23.0-27.2\text{ mg/kg}$) интраперитонеално.

ПРИМЕР 3

Следващ метод за пречистване на активните съставки

10 g CIDI под формата на прах, получен по метода съгласно Примери 1 и 2 се разтваря в 1000 ml разтвор на етилов

алкохол и вода (4:1), като се получава 1%-ен разтвор със зелен цвят. Приготвя се хроматографска колона с порест сепаратор с диаметър 4.5 см. Върху сепаратора се поставя слой от памучна вата, а върху него слой пясък с височина приблизително 3 см. След това се излива суспензия, съдържаща 35 g активен въглен в етанол. Когато активният въглерод се уплътни добре, разтворът на CIDI прах (разтворен, както е описано по-горе) се пропуска през хроматографската колона. Когато целият разтвор на CIDI премине през хроматографската колона, колоната се промива чрез пропускане на 1000 ml чист разтворител (етилев алкохол-вода 4:1).

Получава се прозрачен, безцветен разтвор, който се концентрира максимално в ротационен вакуумизпарител при температура 45°C.

След прибавяне на изопропилов алкохол настъпва кристализация. След сушене, отново в ротационен вакуумизпарител и разпрашаване в хаван, се получава бял прах, който по-нататък ще наричаме чист CIDI. Чистият CIDI съответства на 60 тегловни % CIDI.

Чистият CIDI прах, разтворен в метанол и изследван посредством HPLC метод, показва два основни пика с времена на задържане 1.131 (87.54% площ) и 1.551 (6.16% площ).

Обратно, HPLC с UV детектор при 217 nm, подвижна фаза $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (3:1), скорост на изтичане 1.5 ml/min показва следните RT (основните пикове):

- 1) При използване на Supercosil LC-NH₂-5/u-сферична колона: 1.885 (концентрация 19.60); 16.259 (концентрация 67.51);
- 2) При използване на Chromopack-Lichrosorb RP 18-10/u-нерегулярна колона: 1.617 (концентрация 87.74); 1.985 (3.69) и 2.134 (2.20).

Чистият CIDI представлява бяло водоразтворимо твърдо вещество, което има утайка при калциниране 3.05 %. Елементният анализ в тегловни % (без да се смята утайката) е следният: C 48.82 %; H 7.06 %; O 44.12 %, които съответства на емпирична формула близка до $C_6H_{10}O_4$ и т.т. (разл.) 205-255°C.

Инфрачервеният спектър е практически еднакъв с този на продукта CIDI.

UV спектър (спектрофотометър UV-vis Perkin-Elmer мод. Lambda 5):

- 1) Разтвор в CH_3OH-H_2O (4:1), концентрация $6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml: максимална абсорбция при 203 nm; абсорбцията бързо намалява, практически никаква абсорбция не се наблюдава над 260 nm;
- 2) Разтвор в CH_3CN-H_2O (3:1), концентрация $6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml; абсорбцията бързо намалява от 200 до 260 nm, след това остава постоянна близо до нулата.

Разтворимостта на чистия CIDI е същата като тази на CIDI, както и pH на водния разтвор е същият.

Интраперитонеалната LD_{50} на чисти CIDI върху мишки: CD-1 (ICR) BR е 20.2 mg/kg (базови граници 17.8-22.0 mg/kg).

ЯМР спектри на CIDI и чист CIDI:

ЯМР спектрите са получени на апарат Bruker AC 200 при 200 MHz (протонен) и 50 MHz (въглероден). Пробите се приготвят чрез разтваряне на 90 mg продукт в 0.6 ml DMSO- d_6 при прибавяне на 10 mg натриева сол на 3-(триметилсилил) пропансулфонова киселина (DSS) като вътрешен стандарт.

При 1H спектрите се акумулират 1000 сканирования чрез използване на импулс 30° ; FID е предмет на Gaussian усилване за да се увеличи разделителната способност. Обменът на под-

вижни протони се извършва чрез прибавяне на $D_2O + CF_3COOH$.

При ^{13}C спектрите се акумулират 6200 сканирания (CIDI) и 14900 сканирания (чист CIDI) чрез използване на импулс 90° с хетероядрено декуплиране в CPD.

От 1H спектрите се вижда наличие на различни подвижни протони в областта 3-5 ppm. Забелязва се наличие на редица протони от алкилен тип, алкилните протони намаляват в по-ниските области. Възможно е присъствие на винилови протони; и отсъствие на ароматни протони. ^{13}C спектрите потвърждават горепосочените данни с наличието на голям брой повече или по-малко заместени алкилни въглеродни атоми. Забелязва се наличие на няколко пика във виниловата област и няколко пика в карбонилната област като карбонилните групи са от киселинен или естерен тип.

Спектрите доказват отсъствие на съществени разлики между двете смеси. Възможна е разлика в процентно отношение между различните компоненти.

ПРИМЕР 4

Метод за хроматографско разделяне на активните съставки

Алкохол-хлороформният екстракт, получен съгласно

Пример 1 се изсушава в ротационен вакуумизпарител и се разтваря в малко количество метанол (100 ml). Този разтвор се подлага на хроматографско разделяне, както през колона със силикагел, така и много внимателно, през препаративна HPLC колона. Така се получават чисти фракции, които, както е описано по-горе, съответстват на пикове 1.157, 1.545, 1.883, 2.051, 2.273, 2.572 и 2.743.

ПРИМЕР 5

Тестове за потвърждаване на антинеопластичната активност *in vitro* и *in vivo*

Веществата и/или съставите, получени съгласно предишните примери, които са или разтворими, или солубилизирани с помощта на повърхностно-активни вещества (Polisorbato 80 или Gergonol) във вода, показват забележима антинеопластична активност, заедно с приемливо ниво на токсичност и отсъствие на имуноподтискаща активност. Наблюдава се селективна спрямо туморните клетки антинеопластична активност, на хистологично ниво, както *in vitro*, така и *in vivo*, чрез доказано изменение в туморните клетки, което се проявява в увеличаване на обема, слепване, обръщане и скъсване на клетъчната мембрана, напълно безжизнена цитоплазма съпроводена с хипохромия на ядрения хроматин и слаби нуклеоли. Доказателство за високата селективност, постигната от тези вещества е фактът, че всички посочени по-горе поражения на клетките напълно отсъстват при нормалните клетки, които са подложени на същото третиране.

In vivo, антинеопластичната активност на веществата, описани по-горе е изпитана върху Sa 180 на Швейцарска мишка (Swiss mouse), като най-общо се прилагат в граници от 2 до 25 mg/kg/смъртоносна доза, в зависимост от използваното вещество, приемано интраперитонеално в продължение на 8 последователни дни, като се започне от деня след трансплантацията. В сравнение със средния период на преживяване 25.8 дни при контролните животни, отхвърлянето на тумора се наблюдава при 90 % от третираните животни, които определено се считат, че са преживели.

За терапевтични цели, веществата съгласно настоящето

изобретение и техните соли, съединения или комплекси, за предпочитане се използват под формата на воден разтвор за интрамускулни, ендовенозни или ендокавитарни инжекции.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за получаване на вещества и/или състави, притежаващи антинеопластична активност, характеризираш се с това, че части и/или продукти на растения от семейство *Pittosporaceae*, в които и да е стадии на тяхното развитие или зрелост, се подлагат на следната обработка:

- а) екстракция на компонентите чрез накисване в органичен разтворител;
- б) възможно разбъркване или разклащане на разтвора, съдържащ екстракта с друг разтворител, поне частично смесваем с първия с цел разделяне на компонентите на екстракта в образуваните фази;
- в) възможна обработка на всяка фаза, независимо една от друга, с поне една органична течност със свойства на разтворител по отношение на поне един от компонентите на екстракта, последвана от филтруване на всяка суспензия, която може да се образува и разтваряне на твърдата фаза в подходящ разтворител;
- г) възможно разделяне на компонентите във всяка от течните фази; и
- д) отделяне на разделените компоненти с антинеопластична активност от тези без антинеопластична активност, възможно изсушаване на споменатите екстракти и пречистване преди всеки следващ етап на метода.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризираш се с това, че растенията принадлежат на рода *Pittosporum*.

3. Метод съгласно претенция 2, характеризираш се с това, че растенията са подбрани от групата, съдържаща *Pittosporum undulatum*, *Pittosporum coriaceum*, *Pittosporum*

viridicolor, *Pittosporum rhombipholium*, *Pittosporum eugenoides*, *Pittosporum crossifolium* и *Pittosporum Tobira* и техни комбинации.

4. Метод съгласно коя да е от предишните претенции, характеризираш се с това, че разтворителят е избран от групата на алкохолите.

5 Метод съгласно претенция 4, характеризираш се с това, че алкохолът е етанол.

6. Метод съгласно коя да е от предишните претенции, характеризираш се с това, че обемното съотношение между органичния разтворител и обработваните части на растението е между 1:10 и 10:1.

7. Метод съгласно коя да е от предишните претенции, характеризираш се с това, че времето за обработка е между 5 минути и 3 месеца.

8. Метод съгласно коя да е от предишните претенции, характеризираш се с това, че температурата на обработка се поддържа между 5⁰С и 100⁰С.

9. Метод съгласно коя да е от предишните претенции, характеризираш се с това, че разделянето на компонентите на екстракта се извършва хроматографски.

10. Метод съгласно претенция 9, характеризираш се с това, че разделянето на екстрахираните компоненти се извършва през колона със силикагел.

11. Метод съгласно претенция 9, характеризираш се с това, че разделянето на екстрахираните компоненти се извършва посредством препаративна колонна HPLC. 12. Метод съгласно коя да е от предишните претенции, характеризираш се с това, че екстракцията се извършва с помощта на етанол и времената на задържане при отделяне на компонентите посредством HPLC

са около следните стойности: 1.157, 1.545, 1.883, 2.051, 2.273, 2.572 и 2.743.

13. Метод съгласно коя да е от предишните претенции, характеризираш се с това, че екстракцията се извършва с помощта на етанол, полученият разтвор се разклаща с хлороформ до образуване на две фази, алкохол-хлороформената фаза с интензивен зелен цвят, а водната фаза с жълто-оранжев цвят, като компонентите, притежаващи антинеопластична активност се намират в интензивната зелена фаза.

14. Метод съгласно претенция 13, характеризираш се с това, че разделянето на компонентите, притежаващи антинеопластична активност се извършва хроматографски след изсушаване на алкохол-хлороформената фаза и разтваряне в метанол.

15. Метод съгласно претенция 14, характеризираш се с това, че разделянето на компонентите, притежаващи антинеопластична активност се извършва посредством HPLC като се отделят компонентите с времена на задържане 1.969, 2.296 и 2.756.

16. Метод съгласно претенция 13, характеризираш се с това, че алкохол-хлороформеният разтвор се изпарява докато обемът му се намали до около $1/35$ от обема на изходния алкохолен разтвор, прибавя се изопропилов алкохол за получаване на суспензия, която се филтрува, твърдата фаза се изсушава термично и се разпрашава като се получава зеленикав прах.

17. Метод съгласно претенция 16, характеризираш се с това, че твърдата фаза, разтворена в етилов алкохол-вода (4:1) преминава през хроматографска колона с активен въглен, като се получава прозрачен, безцветен разтвор, който, когато се концентрира, кристализира при прибавяне на изопропилов

алкохол и се суши, като се получава бял прах, който при използване на HPLC показва два основни пика с времена на задържане 1.131 (87.54% площ) и 1.551 (6.16% площ).

18. Метод съгласно претенции 16 и 17, характеризираш се с това, че компонентите на твърдото вещество разтворено в метанол се разделят чрез HPLC, като се отделят компонентите с времена на задържане 1.157, 1.545 и 2.264.

19. Вещества и състави, характеризиращи се с това, че могат да се получат по метода съгласно претенции 1 до 18.

20. Вещества и състави, притежаващи антинеопластична активност, характеризиращи се с това, че могат да се получат по метода съгласно претенции 1 до 18.

21. Вещества и състави, притежаващи антинеопластична активност съгласно претенция 20 под форма избрана от групата, съдържаща соли, съединения, комплекси и комбинации от тях, с цел да бъдат водоразтворими.

22. Фармацевтичен препарат, характеризираш се с това, че съдържа поне един от активните компоненти, вещества и състави, подбрани от групата продукти, притежаващи антинеопластична активност и които могат да се получат по метода съгласно претенции 1 до 18.

23. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 22, характеризираш се с това, че се получава под формата на воден разтвор за парентерална употреба.

24. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 22, характеризираш се с това, че се получава под формата на капсули за орално приемане.

25. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 22, характеризираш се с това, че се получава под формата на свещички за ректално приемане.

26. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 22, характеризираш се с това, че се получава под формата на овули за поставяне във вагината.

27. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 22, характеризираш се с това, че се получава под формата на унгвент, мехлем, крем или гел.

28. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 23, характеризираш се с това, че се получава в ампули, всяка ампула съдържа между 0.1 и 2.5 g активен елемент.

29. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 28, характеризираш се с това, че всяка ампула съдържа за предпочитане между 0.1 и 1.5 g и най-вече между 0.2 и 1.0 g активен елемент.

30. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 24, характеризираш се с това, че се получава под формата на капсули, всяка капсула съдържа между 0.1 и 2.0 g активен елемент.

31. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 30, характеризираш се с това, че всяка капсула съдържа от 0.8 до 1.2 g активен елемент.

32. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 25, характеризираш се с това, че се получава под формата на свещички за ректална употреба, всяка свещичка съдържа между 0.2 и 2.5 g активен елемент.

33. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 32, характеризираш се с това, че всяка свещичка съдържа между 0.3 и 1.0 g, или между 1.2 и 1.7 g активен елемент.

34. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 26, характеризираш се с това, че се получава под формата на овули за поставяне във вагината, всяка овула съдържа между 0.1

и 2.5 g активен елемент.

35. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 34, характеризираш се с това, че всяка овула съдържа за предпочитане между 0.5 и 2.5 g и най-вече между 0.3 и 1.7 g активен елемент.

36. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 27, характеризираш се с това, че се получава под формата на унгвент, мехлем, крем или гел с инертен носител за локална употреба, съдържащ между 0.5 и 12 % активен елемент.

37. Фармацевтичен препарат съгласно претенция 36, характеризираш се с това, че носителят за локална употреба съдържа между 3 и 7 тегловни % активен елемент.

38. Употреба на получените по метода съгласно претенции 1 до 18 съединения - единични или в комбинация - за получаване на лекарства за лечение на патологии различни от неопластичните.