

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227843**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **399962**

(22) Data zgłoszenia: **14.07.2012**

(51) Int.Cl.

A61K 31/222 (2006.01)

A61K 36/638 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(54) **Zastosowanie Ligustrum vulgare L. do wytwarzania preparatu zawierającego oleaceinę**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

20.01.2014 BUP 02/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:

**WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MONIKA EWA CZERWIŃSKA, Legionowo, PL
ANNA KAROLINA KISS, Warszawa, PL
MAREK ALEKSY NARUSZEWICZ,
Zalesie Górne, PL**

(74) Pełnomocnik:

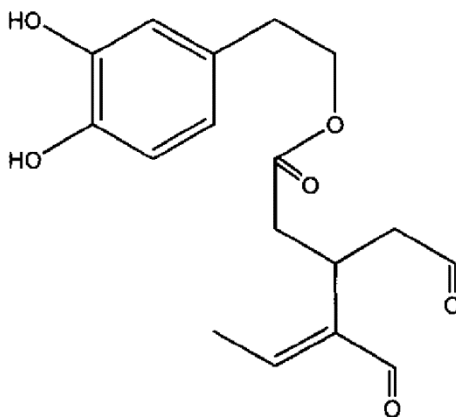
rzecz. pat. Rafał Witek

PL 227843 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie *Ligustrum vulgare L.* do wytwarzania preparatu zawierającego oleaceinę do hamowania produkcji MMP-9 przez komórki zawarte w blaszce miażdżycowej i stabilizowania blaszki miażdżycowej, zwłaszcza do leczenia i zapobiegania chorób będących następstwem rozpadu blaszki miażdżycowej, w szczególności wybranych z grupy obejmującej: niedokrwienny udar mózgu, zawał serca oraz chorobę niedokrwienną serca.

Oleaceina jest związkiem o wzorze 1, określanym w piśmiennictwie również jako 3,4-DHPEA-EDA, stanowiący 3,4-dihydroksyfenyloetanol (hydroksytyrozol) zestyfikowany dialdehydową pochodną kwasu enolowego.



wzór 1

Blaszka miażdżycowa jest zmianą występującą w ścianie tętnic (błona wewnętrzna) powstającą w przebiegu miażdżycy. Blaszka składa się z masy lipidowej (głównie LDL), komórek oraz włókniaka. Wypukła się do światła naczynia i zmniejsza jego średnicę. Może to powodować niedokrwienie narządów zaopatrywanych przez daną tętnicę.

Niekontrolowany rozpad blaszki miażdżycowej gromadzącej się wraz z postępem miażdżycy w tętnicach, głównie w aorcie, tętnicach wieńcowych i mózgowych, rzadziej w tętnicach kończyn, może być bezpośrednią przyczyną poważnych następstw, takich jak niedokrwienny udar mózgu lub zawał serca. Blaszka miażdżycowa może pękać, aktywując osoczowe czynniki krzepnięcia, co z kolei prowadzi do wytworzenia skrzepu. Może to zmniejszyć przepustowość naczynia, a w skrajnym przypadku spowodować całkowite zamknięcie światła tętnicy. W ten sposób dochodzi najczęściej do zamknięcia tętnicy wieńcowej i w konsekwencji zawału serca. W podobny sposób, zamknięcie tętnicy mózgowej, w następstwie rozpadu blaszki miażdżycowej, prowadzi do niedokrwiennego udaru mózgu. W podobny sposób może dojść do niedokrwiennego choroby kończyn.

Blaszka miażdżycowa uszkadza również głębsze warstwy ściany tętnicy, przyczyniając się w ten sposób do rozwoju tętniaków.

Dlatego u pacjentów cierpiących na miażdżycę pożądane jest stabilizowanie blaszki miażdżycowej. Pożądane jest również stabilizowanie uszkodzonej blaszki miażdżycowej w celu obniżenia szybkości jej rozpadu, a w następstwie złagodzenie przebiegu zawału serca lub udaru mózgu.

Przyjmuje się, że kluczową rolę w rozpadzie blaszki miażdżycowej odgrywają zewnątrzkomórkowe metaloproteinazy uwalniane przez makrofagi. Wśród nich, metaloproteinaza 9 (MMP 9) odpowiada za degradację żelatyny, kolagenu typu IV i V, co prowadzi do osłabienia osłony włóknistej blaszki miażdżycowej i przyczynia się do jej rozpadu (Fatar M, Stroick M, Griebel M, Hennerici M. Matrixmetalloproteinases in cerebrovascular diseases. *Cerebrovasc Dis* 2005;20:141–51).

Zgłoszenie patentowe WO 2009/013596 ujawnia możliwość zastosowania produktów odżywczych bogatych w hydroksytyrozol do celów medycznych, takich jak prewencja i leczenie chorób sercowo-naczyniowych (CVD), budowanie blaszki miażdżycowej w naczyniach, nadciśnienie tętnicze i zespół metaboliczny.

W publikacji Czerwińska M. et al. EAS 2012, abstract book 2012-05-29, str. 1108 ujawniono wyniki badania dotyczącego wpływu oleaceiny na uwalnianie mieloperoksydazy, w skrócie MPO, przeprowadzonego na wyselekcjonowanej grupie komórek, tzn. neutrofilów wyizolowanych z krwi

obwodowej zdrowych ochotników w warunkach *in vitro*. Ponadto, z publikacji Czerwińska M. et al. Food Chemistry, vol. 131, no. 3. 2011-09-20, str. 940–947 znany jest również wpływ oleaceiny na uwalnianie MPO z komórek neutrofilii wyizolowanych z krwi. Wyniki wskazują na efekt ochronny oleaceiny przeciwko uszkodzeniom oksydacyjnym.

W publikacji Kiss i wsp., Journal of Ethnopharmacology, vol. 120, 2008, str. 220–225 ujawniono zastosowanie gradientu chloroformu w octanie etylu (100–0%) i octanu etylu w metanolu (100–0%) do oczyszczania wyciągu octanu etylu zawierającego oleaceinę. Opisana metoda pozwoliła na wyizolowanie 250 mg oleaceiny (z 200 g wysuszonego materiału roślinnego).

Celem wynalazku jest dostarczenie preparatu, który mógłby być wykorzystany do stabilizacji blaszki miażdżycowej poprzez skuteczne hamowanie procesu jej rozpadu następującego z udziałem metaloproteinazy-9. Preparat taki mógłby być wykorzystany do leczenia i zapobiegania chorobom powstających w wyniku rozpadu blaszki miażdżycowej, w szczególności zawału serca, choroby niedokrwiennej serca, niedokrwiennej udaru mózgu oraz niedokrwienia kończyn.

Nieoczekiwanie tak określony cel udało się zrealizować w przedmiotowym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie *Ligustrum vulgare L.* do wytwarzania preparatu zawierającego oleaceinę do hamowania produkcji MMP-9 przez komórki zawarte w blaszce miażdżycowej i stabilizowania blaszki miażdżycowej, zwłaszcza do leczenia i zapobiegania chorobom będących następstwem rozpadu blaszki miażdżycowej, w szczególności wybranych z grupy obejmującej: niedokrwienne udar mózgu, zawał serca oraz chorobę niedokrwinną serca, przy czym oleaceinę otrzymuje się z tkanki roślinnej w procesie obejmującym czterokrotną ekstrakcję wodną rozdrobnionych liści ligustru w temperaturze 30°C w płuczce ultradźwiękowej każdorazowo przez 30 minut w stosunku 1:10 surowca do rozpuszczalnika, poddawanie liofilizacji uzyskanego wyciągu wodnego w celu zatężenia, a następnie pięciokrotną ekstrakcję eterem dietylowym uzyskanego ekstraktu wodnego w stosunku 1:1 rozpuszczalnika do ekstraktu, zagęszczanie wyciągu eterowego na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 35°C oraz rozdział chromatograficzny ekstraktu eterowego na żelu krzemionkowym w układzie izokratycznym chloroformu i octanu etylu (85:15) przez 60 minut (20 ml/min), następnie dalszy rozdział chromatograficzny uzyskanych frakcji zawierających oleaceinę na żelu krzemionkowym w układzie izokratycznym toluenu, octanu metylu i metanolu (85:11:5) przez 60 minut (20 ml/min) oraz doczyszczanie uzyskanych frakcji zawierających oleaceinę na kolumnie chromatograficznej wypełnionej sephadexem przy użyciu mieszaniny chloroformu i metanolu (9:1).

P r z y k ł a d 1. Uzyskiwanie oleaceiny z liści ligustru pospolitego (*Ligustrum vulgare L.*) Ligustr pospolity (*Ligustrum vulgare L.*) jest rośliną ozdobną powszechnie występującą w Europie, wykorzystywaną często do sadzenia żywopłotów. Izolacji oleaceiny zawartej w liściach ligustru pospolitego dokonano sposobem uzyskanym poprzez zmodyfikowanie metody opracowanej przez Kiss i wsp. (Journal of Ethnopharmacology 120 (2008) 220–225) w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Do izolacji użyto 400 g rozdrobnionego surowca. W pierwszym etapie liście ligustru czterokrotnie ekstrahowano wodą destylowaną w temperaturze 30°C w płuczce ultradźwiękowej każdorazowo przez 30 minut. Ekstrakcje przeprowadzono w stosunku 1:10 surowca do rozpuszczalnika. Wyciągi wodne przesączono przez watę i połączono. Uzyskany wyciąg wodny zatężono na drodze liofilizacji do objętości ok. 1l. W celu uzyskania mniej zanieczyszczonego wyciągu oraz zwiększenia wydajności procesu izolacji pożądanego związku użyto eteru dietylowego zamiast octanu etylu. Wcześniejsze analizy wykazały bowiem, że wyciąg octanu etylu zawiera więcej związków chemicznych, co tym samym utrudnia proces izolacji oleaceiny. W związku z tym zagęszczony wyciąg wodny poddano następnie 5-krotnej ekstrakcji eterem dietylowym w stosunku 1:1 rozpuszczalnika do ekstraktu. Wyciąg eterowy zagęszczono na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 35°C. Uzyskano ok. 5 g wyciągu eterowego. Kolejna modyfikacja polegała na użyciu aparatury oraz rozpuszczalników w układzie izokratycznym. Wg publikacji Kiss i wsp. (2008) oczyszczanie wyciągu octanu etylu polegało na zastosowaniu kolumny wypełnionej żelalem krzemionkowym (0.125–0.25 mm; 5.5 cm×10 cm) przy użyciu gradientu rozpuszczalników chloroform-octan etylu (100–0%) oraz octan etylu-metanol (100–0%). W zmodyfikowanej metodzie wyciąg eterowy poddawano rozdzielaniu przy użyciu chromatografii typu Flash na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym (PF-30 SIHP/80G PuriFlash) przy użyciu mieszaniny chloroformu i octanu etylu (85:15) w układzie izokratycznym przez 60 minut (20 ml/min). Uzyskano 9 frakcji, z których do dalszego rozdzielania wybrano frakcje 3 i 4. Frakcje te poddano dalszemu rozdzielaniu na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym (PF-30 SIHP/80G PuriFlash) przy użyciu mieszaniny toluenu, octanu metylu i metanolu (84:11:5)

w układzie izokratycznym przez 60 minut (20 ml/min). Uzyskano 5 frakcji. Z frakcji 3 naniesionej na kolumnę wypełnioną sephadexem wyizolowano oleaceinę przy użyciu mieszaniny chloroformu i metanolu (9:1), podobnie jak w pierwotnej metodzie. Uzyskano 1,289 g związku. Tożsamość związku potwierdzono metodami NMR oraz HPLC-DAD-MS/MS.

Tabela

Etap izolacji	Metoda pierwotna	Metoda zmodyfikowana
I ekstrakcja	4xwoda; łaźnia ultradźwiękowa; 30 min	4xwoda; łaźnia ultradźwiękowa; 30 min
II ekstrakcja	5x octan etylu (1:1)	5x eter dietylowy (1:1)
I rozdział	Żel krzemionkowy; kolumna szklana (0.125–0.25mm; 5.5cm×10 cm); gradient chloroform-octan etylu (100-0%) i octan etylu-metanol (100-0%)	Żel krzemionkowy (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash); chromatografia typu Flash; układ izokratyczny chloroformu i octanu etylu (85:15)
II rozdział		Żel krzemionkowy (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash); chromatografia typu Flash; układ izokratyczny chloroformu i octanu etylu (85:15)
doczyszczanie	Sephadex; kolumna szklana (2×25 cm); układ izokratyczny chloroform- metanol (9:1)	Sephadex; kolumna szklana (2×45 cm); układ izokratyczny chloroform- metanol (9:1)

P r z y k ł a d 2. Stabilizacja blaszki miażdżycowej izolowanej z tętnicy szyjnej.

Blaszki miażdżycowe (n=15) były uzyskiwane od pacjentów poddawanych zabiegowi wycięcia błony wewnętrznej tętnicy szyjnej (endarterektomia). Uzyskane blaszki dzielono na dwie części, które inkubowano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (kontrola) lub w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej w obecności oleaceiny w stężeniach 5, 10 i 20 μ M przez 24 godziny w temperaturze 37°C po uprzedniej stymulacji roztworem lipopolisacharydu o stężeniu 1 μ g/ml. Kontrolę niestymulowaną stanowił roztwór soli fizjologicznej, w której blaszkę inkubowano 2 godziny. Wpływ oleaceiny na produkcję metaloproteinazy-9 (MMP-9) został określony przy użyciu metody immunochemicznej ELISA (R&D System). Ilość MMP-9 (ng/ml) przeliczano na masę blaszki miażdżycowej, a następnie określono w % w porównaniu do kontroli stymulowanej. Wartość IC₅₀, czyli stężenie związku, przy którym reakcja zostaje zahamowana w 50%, określono na poziomie 9.07±1.2 μ M (średnia ± błąd standardowy).

Zaprezentowany na fig. 1 wykres przedstawia zależność produkcja MMP-9 [%] od stężenia oleaceiny (5, 10, 20 μ M).

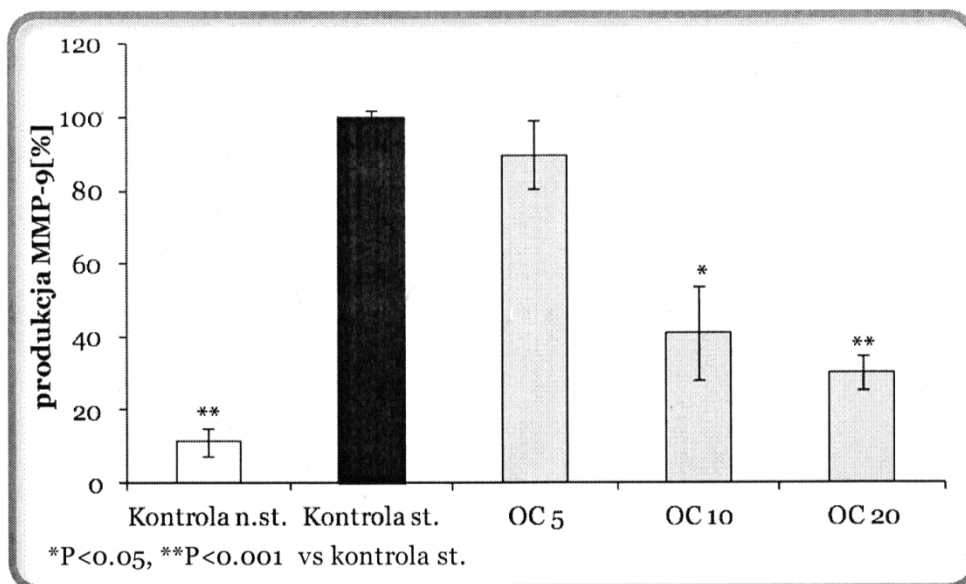
Wyniki eksperymentu wykazują na zdolność oleaceiny do hamowania produkcji MMP-9 przez komórki zawarte w blaszce miażdżycowej. Obniżenie produkcji MMP-9 stabilizuje blaszkę miażdżycową i hamuje jej rozpad. W związku z uzyskanym efektem oleaceina nadaje się do stosowania w leczeniu i profilaktyce chorób będących następstwem rozpadu blaszki miażdżycowej.

Zastrzeżenie patentowe

1. Zastosowanie *Ligustrum vulgare* L. do wytwarzania preparatu zawierającego oleaceinę do hamowania produkcji MMP-9 przez komórki zawarte w blaszce miażdżycowej i stabilizowania blaszki miażdżycowej, zwłaszcza do leczenia i zapobiegania chorobom będących następstwem rozpadu blaszki miażdżycowej, w szczególności wybranych z grupy obejmującej: niedokrwienny udar mózgu, zawał serca oraz chorobę niedokrwienną serca, przy czym oleaceinę otrzymuje się z tkanki roślinnej w procesie obejmującym czterokrotną ekstrakcję wodną rozdrobnionych liści ligustru w temperaturze 30°C w płuczce ultradźwiękowej każdorazowo przez 30 minut w stosunku 1:10 surowca do rozpuszczalnika, poddawanie liofilizacji uzyskanego wyciągu wodnego w celu zateżenia, a następnie pięciokrotną ekstrakcję eterem dietylowym uzyskanego ekstraktu wodnego w stosunku 1:1 rozpuszczalnika do ekstraktu, zagęszczanie wyciągu eterowego na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 35°C oraz rozdział chromatograficzny ekstraktu eterowego na żelu krzemionkowym w układzie izokratycznym chloroformu i octanu etylu (85:15) przez 60 minut (20 ml/min), następnie dalszy rozdział chromatograficzny uzyskanych frakcji zawierających oleaceinę na żelu krzemionkowym w układzie izokratycznym toluenu, octanu metylu i metanolu (85:11:5) przez 60 minut (20 ml/min) oraz doczyszczanie uzyskanych frakcji zawierających oleaceinę na kolumnie chromatograficznej wypełnionej sephadexem przy użyciu mieszaniny chloroformu i metanolu (9:1).

Rysunek

Fig. 1



Kontrola n.st.- kontrola niestymulowana

Kontrola st.- kontrola stymulowana

OC-oleaceina

