

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **224147**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **410628**

(22) Data zgłoszenia: **23.12.2014**

(51) Int.Cl.

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 13/04 (2006.01)

(54)

Zastosowanie glikozydu 6-eskuletyny

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

20.07.2015 BUP 15/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.11.2016 WUP 11/16

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ROMAN GANCARZ, Wrocław, PL

EWA KLEPACZ, Ujazd, PL

KAROLINA KUBAS, Wrocław, PL

ERYK GRALAK, Strzelin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 224147 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie glikozydu 6-eskuletyny (eskuliny) glikozydu wydzielanego z kory kasztanowca zwyczajnego.

Kamica moczowa jest przewlekłą chorobą charakteryzującą się tworzeniem i obecnością w układzie moczowym nieorganicznych złogów, powstałych ze składników obecnych w prawidłowym lub patologicznie zmienionym moczu. Większość kamieni moczowych stanowią kamienie nerkowe, w skład którego wchodzi nieorganiczne sole głównie wapniowe w postaci szczawianu wapnia.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat ubiegłego stulecia nastąpił ogromny rozwój inwazyjnych metod leczenia kamicy dróg moczowych. Obecnie u większości chorych stosuje się metody inwazyjne takie jak kruszenie kamieni falami uderzeniowymi (ESWL) oraz zabiegi endourologiczne (PCNL). Niedogodnością nowych metod są jednak powikłania pooperacyjne oraz wysoki procent reemisji w ciągu najbliższych 5 lat od chwili zabiegu.

W związku z tym koniecznym stało się znalezienie alternatywnej metody leczenia, szczególnie interesujące stały się poszukiwania związków chemicznych pochodzenia naturalnego o właściwościach przeciwkamicowych.

Surowce roślinne odgrywają dużą rolę w profilaktyce chorób układu moczowego w tym kamicy nerkowej. Prowadzone badania wskazują, że za hamowanie procesu tworzenia kamieni nerkowych odpowiedzialne są pochodne antrachinonowe, mające zdolność kompleksowania jonów wapniowych, dzięki obecności grup C=O i OH.

Z publikacji Wai C.M., Wang S., Supercritical fluid extraction: metals as complexes, *Journal of Chromatography A*, 1997, 785, 369–383 znany jest fakt, iż także inne związki zawierające grupę ketonową oraz hydroksylową posiadają właściwości kompleksujące, szczególnie w odniesieniu do metali dwuwartościowych i mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu kamicy nerkowej. Przykładem takim jest grupa związków polifenolowych sklasyfikowana jako flawony, gdzie kompleksowanie wapnia w glukozydzie -7-O- luteoliny jak i samej luteolinie zachodzi w pozycji 4 (CO) pierścienia C i 5 (-OH) pierścienia A.

Z polskiego opisu patentowego nr PL 216222 B1 znany jest preparat roślinny, mający zdolność rozpuszczania i hamowania powstawania szczawianu wapnia, głównego składnika kamieni nerkowych, który zawiera jako substancję aktywną biologicznie frakcję alkoholową ekstraktu z ziela dziurawca zwyczajnego lub szyszek chmielu, wyekstrahowaną kolejno roztworem NaOH w temperaturze pokojowej, rozpuszczalnikiem niemieszącym się z wodą i alkoholem alifatycznym o długości łańcucha C₁-C₃. Sposób otrzymywania preparatu roślinnego przeciwko kamicy nerkowej polega na tym, że ziele dziurawca zwyczajnego lub szyszki chmielu poddaje się ekstrakcji 0,1–1 M roztworem NaOH, użytych w stosunku wagowym 1:4–1:8, w czasie 6–24 h, w temperaturze pokojowej, a następnie ekstrahuje się rozpuszczalnikiem niemieszącym się z wodą, reguluje się pH do wartości 3–6 i powtórnie ekstrahuje się rozpuszczalnikiem niemieszącym się z wodą. Otrzymaną warstwę wodną po odparowaniu wytrawia się alkoholem alifatycznym o długości łańcucha C₁-C₃.

Również w polskim opisie patentowym nr PL 215586 B1 ujawniono sposób otrzymywania nietoksycznego i niemutagennego preparatu o zdolnościach rozpuszczania i hamowania powstawania kamieni nerkowych zawierającego aktywną biologicznie frakcję z korzenia marzanny barwierskiej.

Z chińskiego zgłoszenia patentowego nr CN101129394 znane jest zastosowanie eskuliny do zapobiegania i/lub leczenia zaawansowanej glikacji produktów końcowych choroby sercowo-mózgowej, choroby naczyniowej, szczególnie miażdżycy naczyń wieńcowych i tętnic, miażdżycy tętnic.

Większość obecnych na rynku preparatów, stosowanych w terapii kamicy nerkowej, ma jedynie działanie objawowe (przeciwzapalne, moczopędne) i nie likwiduje przyczyn schorzenia. W związku z powyższym niezwykle istotnym jest poszukiwanie i pozyskiwanie z roślin związków o charakterze glikozydowych pochodnych hydroksyketonów, w tym antrachinonów, flawonoidów i pochodnych cukrowych posiadających zdolność do kompleksowania jonów wapnia, a co za tym idzie do rozpuszczania złogów wapniowych obecnych w układzie moczowym.

Nieoczekiwanie okazało się, że glikozyd 6-eskuletyny wykazuje zdolność kompleksowania jonów Ca²⁺ oraz rozpuszczania szczawianu wapnia stanowiącego ok. 70% przypadków nieorganicznych złogów zalegających w układzie moczowym.

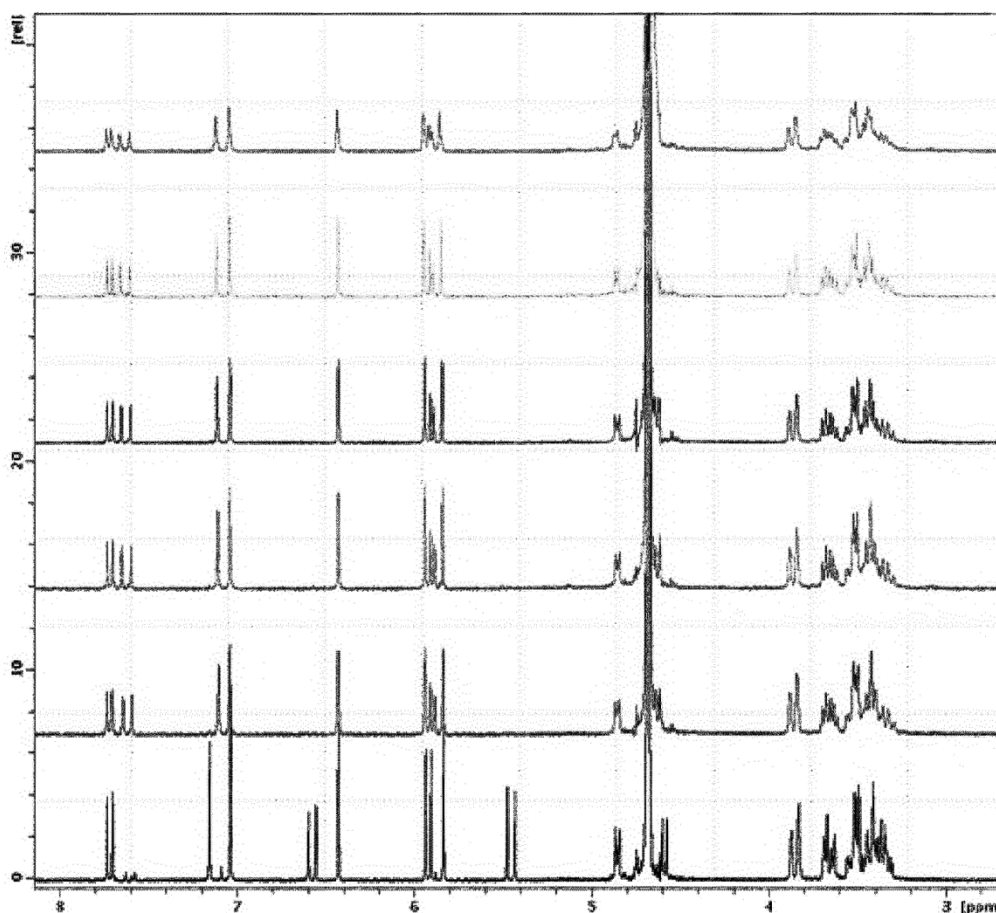
Istotą rozwiązania jest zastosowanie glikozydu 6-eskuletyny lub jej farmaceutycznie dopuszczalnych soli do wytwarzania preparatu do leczenia oraz zapobiegania kamicy nerkowej.

Zaletą wynikającą z zastosowania będącego przedmiotem wynalazku jest efektywność uzyskanego łatwo dostępnego preparatu o zdolności do kompleksowania jonów Ca^{2+} mogącego rozpuszczać nieorganiczne złoże wapniowe powstające w nerkach stanowiące 70% wszystkich przypadków tego schorzenia.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach oraz na załączonych wykresach i schemacie.

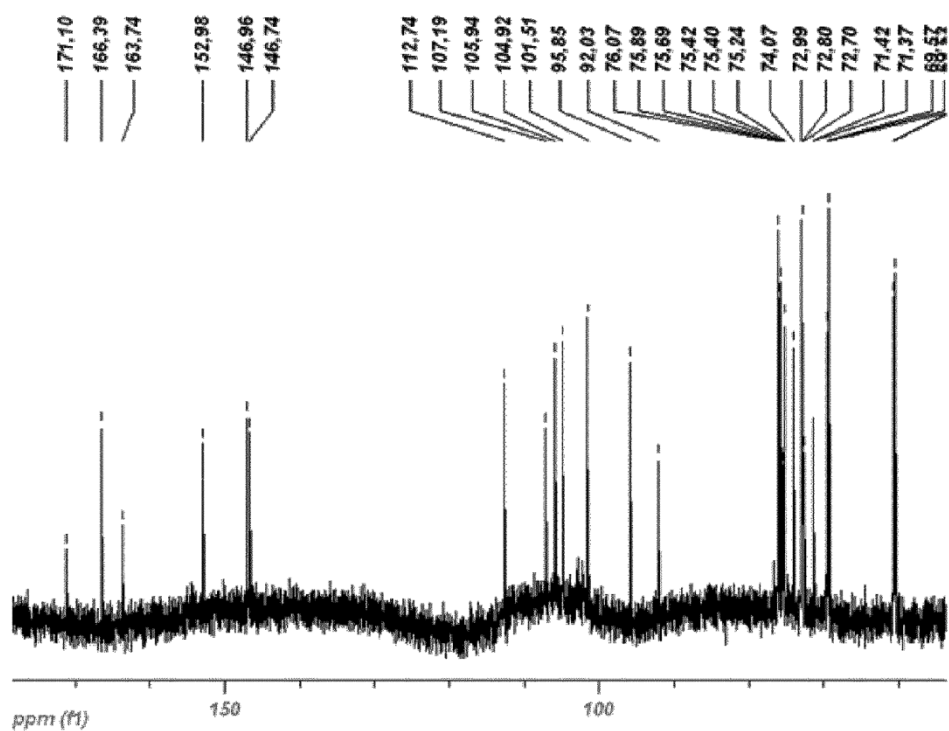
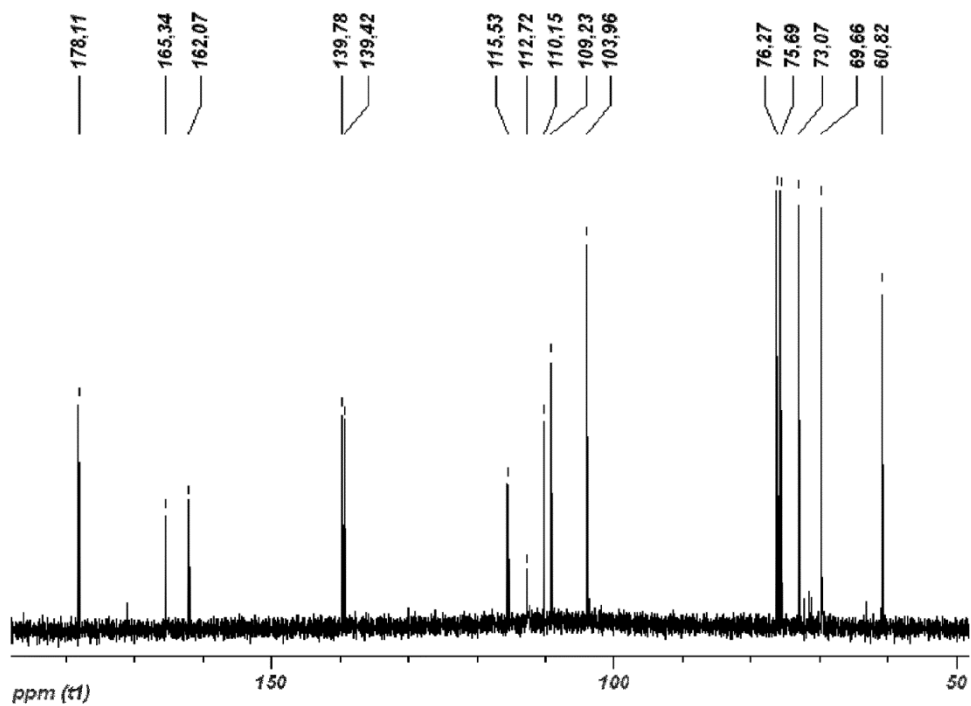
P r z y k ł a d 1. Badanie kompleksowania jonów Ca^{2+} przez glikozyd 6-eskuletyny za pomocą miareczkowania NMR

W celu przeprowadzenia miareczkowania NMR sporządzono 5 M roztworu $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (236,16 g/mol) poprzez odważenie 1,1809 g soli wapnia i rozpuszczenie jej w 1 ml D_2O . Natomiast roztwór eskuliny przygotowywano w stężeniu 0,02 M (0,0037 g; 0,010 mmol/0,5 ml D_2O + kropla $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ 3,7%). Roztwór eskuliny poddany został miareczkowaniu azotanem wapnia ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) NMR na spektrometrze Bruker DRX 300 AVANCE. Eskulina była miareczkowana solą wapniową, co 2 μl , aż do 10 μl (2 μl soli wapnia odpowiadało stechiometrycznemu punktowi równoważnikowego miareczkowania).



Wykresy przedstawiające zmiany przesunięć chemicznych protonów eskuliny po dodaniu $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$: a) eskulina b) + 2 μl $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ c) + 4 μl d) + 6 μl e) + 8 μl f) + 10 μl

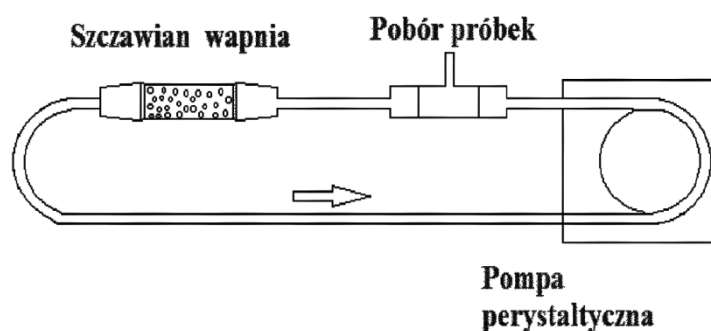
Glikozyd 6-eskuletyny wykazał silne działanie kompleksowania jonów wapnia. Potwierdzają to zmiany w intensywności sygnałów, zmiana multipletowości protonów oraz zanik niektórych sygnałów protonowych w części cukrowej i glikonowej związku w zakresie 5–8 ppm i powstawaniu nowych sygnałów od powstającego kompleksu.

Widmo ¹³CNMR eskulinyWidmo ¹³CNMR eskuliny + 10 μl Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O

Widmo ^{13}C NMR glukozydu eskuletyny po dodaniu $10\ \mu\text{l}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\ \text{H}_2\text{O}$, pokazuje podwojenie sygnałów węglowych w porównaniu do związku przed miareczkowaniem. Świadczy to o obecności w roztworze dwóch form związku będących w równowadze chemicznej: nieskompleksowanego i skompleksowanego glukozydu 6-eskuletyny.

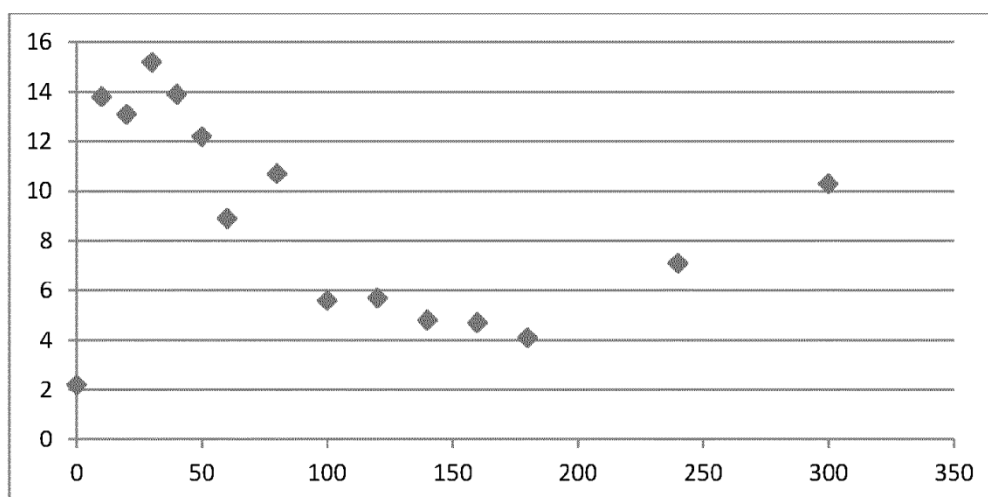
P r z y k ł a d 2. Zdolność eskuliny do rozpuszczania szczawianu wapnia na modelu układu nerkowego mierzona za pomocą absorpcyjnej spektroskopii atomowej

Nowe właściwości glikozydu 6-eskuletyny potwierdzono na podstawie badania kinetyki rozpuszczania szczawianu wapnia w aparaturze opisanej poniżej, która jest modelowym układem imitującym złoży w nerce i przepływ roztworu zawierającego związek rozpuszczający te złoży [Schemat].



Schemat stanowiska pomiarowego

Sporządzono nasycony roztwór eskuliny o stężeniu $5\ \text{mg/ml}$ w $0,01\ \text{M}$ NaOH . Układ wypełniono roztworem glikozydu 6-eskuletyny ($37\ \text{ml}$), umieszczono komorę z krysztalami szczawianu wapnia ($60\ \text{mg}$) i uruchomiono przepływ próbki przez komorę ze szczawianem z prędkością 15 obrotów pompy/min. Próbkę pobierano w punkcie poboru próbek przez $60\ \text{min}$ w odstępach 10 minutowych, a następnie przez okres 4 godzin w odstępach 20 minutowych. Stężenie jonów Ca^{2+} w poszczególnych próbkach oznaczono metodą absorpcyjnej spektroskopii atomowej. Pomiary zmian stężenia wapnia w czasie przedstawiono na wykresie. Stwierdzono, że po $30\ \text{min}$ stężenie wykazuje wzrost od stanu początkowego (nasycony roztwór szczawianu wapnia) od wartości $2,2\ \text{mg/ml}$ do wartości $15,2\ \text{mg/ml}$.



Wykres zmian stężenia wapnia rozpuszczonego pod wpływem roztworu glikozydu 6-eskuletyny

Zastrzeżenie patentowe

Zastosowanie glikozydu 6-eskuletyny lub jej farmaceutycznie dopuszczalnych soli do wytwarzania preparatu do leczenia oraz zapobiegania kamicy nerkowej.

