



(51) МПК
A61K 36/71 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2009148321/15, 02.06.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.06.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
01.06.2007 GB 0710536.4

(43) Дата публикации заявки: **20.07.2011** Бюл. № 20

(45) Опубликовано: **10.01.2012** Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 6300370 B1, 09.10.2001. WO 2006097074 A2, 21.09.2006. Srivastava JK et al. Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells // J. Agric Food Chem., 2007 Nov 14 55(23): 9470-8. Epub 2007 Oct 17. Najhashemi V. Et al. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory dmg // Phytother. Res. 2004 Mar, 18(3): 195-9. WO 03033007 A1, 24.04.2003.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **11.01.2010**

(86) Заявка РСТ:
GB 2008/001849 (02.06.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/146009 (04.12.2008)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городиский и
 Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной**

(72) Автор(ы):

КРОЙТЕР Маттиас Хайнрих (СН)

(73) Патентообладатель(и):

**ИНСАЙНИОН ХОЛДИНГЗ
 ЛИМИТЕД (ВМ)**

(54) РАСТИТЕЛЬНЫЙ ЭКСТРАКТ И ЕГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, в частности к композиции для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния. Композиция содержит водный экстракт цветков ромашки, причем этот водный экстракт состоит из эфирного масла, которое получают процессом

экстракции, включающим дистилляцию с водяным паром цветков ромашки, и масло чернушки посевной для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния. Применение композиции для получения лекарственного средства для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния. Способ лечения

пролиферативного и/или воспалительного состояния, который включает введение пациенту композиции в эффективном количестве. Вышеописанная композиция

действует синергетически и эффективна для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния. 3 н. и 24 з.п. ф-лы, 18 ил.

R U 2 4 3 8 6 9 2 C 2

R U 2 4 3 8 6 9 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 36/71 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009148321/15, 02.06.2008**

(24) Effective date for property rights:
02.06.2008

Priority:

(30) Priority:
01.06.2007 GB 0710536.4

(43) Application published: **20.07.2011 Bull. 20**

(45) Date of publication: **10.01.2012 Bull. 1**

(85) Commencement of national phase: **11.01.2010**

(86) PCT application:
GB 2008/001849 (02.06.2008)

(87) PCT publication:
WO 2008/146009 (04.12.2008)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

KROJTER Mattias Khajnrikh (CH)

(73) Proprietor(s):

INSAJNION KhOLDINGZ LIMITED (BM)

(54) VEGETABLE EXTRACT AND ITS THERAPEUTIC APPLICATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.
SUBSTANCE: invention relates to pharmaceutical industry, in particular to composition for treatment of proliferative and/or inflammatory condition. Composition, which contains water extract of chamomile flowers, and water extract consists of essential oil, which is obtained by extraction process, including distillation with water steam of chamomile flowers, and oil of Nigella sativa for treatment of proliferative and/or inflammatory

condition. Application of composition for obtaining medication for treatment of proliferative and/or inflammatory condition. Method of treating proliferative and/or inflammatory condition, which includes introducing to patient composition in effective quantity.

EFFECT: composition acts synergistically and is effective for treatment of proliferative and/or inflammatory condition.

27 cl, 18 dwg, 3 ex

RU 2 438 692 C2

RU 2 438 692 C2

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к растительному экстракту и его терапевтическому применению, т.е. композиции, содержащей водный экстракт цветков ромашки, для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния, применению указанной композиции для производства лекарственного средства для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния, и к способу лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния, который включает введение пациенту, представляющему собой человека или животное, эффективного количества указанной композиции.

Настоящее изобретение, в частности, относится к композиции, содержащей водный экстракт цветков ромашки для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния, в которой цветки ромашки представляют собой *Flores tubiformis*. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению указанной композиции, характеризующемуся тем, что состоянием является злокачественное заболевание, предпочтительно глиобластома или рак легких, или рак предстательной железы. Настоящее изобретение также относится к применению указанной композиции для получения лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания, более конкретно, хронических заболеваний, наиболее предпочтительно, рассеянного склероза.

Предпосылки к созданию изобретения

Терапевтические свойства различных растений были известны в течение тысячелетий. Даже сегодня, однако, природа эффективного компонента или компонентов и их свойств мало понятны, даже для тех растений, которые были изучены, поскольку фармацевтическая разработка фокусируется на молекулах с низкой молекулярной массой, которые, как полагают, имеют сравнительно предсказуемые свойства и синтез которых можно контролировать.

Uteshev et al., *Eksp. Klin. Farmakol.* (1999 Nov-Dec) 62(6):52-5, описывает иммуномодулирующую активность гетерополисахаридов, полученных из ромашки лекарственной (*Matricaria chamomilla*) во время охлаждения на воздухе и охлаждения погружением. Laskova и Uteshev, *Antibiot. Khimioter.* (1992 Jun) 37(6):15-8, описывает иммуномодулирующее действие гетерополисахаридов, выделенных из цветков ромашки. Водный экстракт вводили перорально или путем внутрибрюшинной инъекции. Авторы не высказывают мнения о какой-либо терапевтической применимости, а скорее сообщают о том, что стимулирующее действие зависит от режима дозирования и, прежде всего, способа и степени охлаждения испытуемых крыс.

WO 2005/070440 относится к применению формулы из трав для лечения аллергической астмы или хронической бронхиальной астмы, содержит особые количества высушенных и измельченных цветков ромашки, плодов аниса, черных семян и т.д., вводимых в виде заваривания чая.

В WO 03/101479 описаны ценные терапевтические свойства композиции, содержащей несколько компонентов, обычно вводимых вместе путем внутримышечной инъекции. Композиция, которая была использована, содержит экстракт ромашки, хотя терапевтическая активность ей не приписывается; скорее, эта композиция описана как не вызывающая раздражения, присутствие которой может облегчать неприятное действие инъекции как таковой.

В WO 2007/057651 описан способ удаления эндотоксинов из ромашки.

В US 6300370 B1 раскрыт способ получения масла ромашки, имеющего высокое содержание цис- или трансспироэфиров, характеризующийся дистилляцией паром или

водной дистилляцией свежей ромашки или остатка после экстракции ромашки. Указанные спирозефиры имеют противовоспалительные и спазмолитические свойства.

Краткое изложение сущности изобретения

Неожиданно было обнаружено, что экстракт ромашки, полученный из соцветий, предпочтительно полученный путем дистилляции с водяным паром, обладает ценными терапевтическими свойствами. Известно, что такие водные экстракты состоят из летучих компонентов соцветий ромашки и описаны в Европейской фармакопее (*Matricariae aetheroleum PhEur 5, corrected.5.1*).

В частности, было обнаружено, что указанные экстракты могут снижать синтез ДНК в злокачественных клетках человека и ингибировать продукцию лейкотриенов и IL-6 (интерлейкина 6). Более неожиданно, было обнаружено, что ингибирование синтеза лейкотриенов эфирным маслом синергетически потенцировано в присутствии масла из семян чернушки посевной (*Nigella sativa*).

Было обнаружено, что чувствительными являются, в особенности, злокачественные клетки, которые, как известно, продуцируют интерлейкин 6 в качестве фактора роста сами, и злокачественные клетки которые, как известно, сами продуцируют лейкотриены. Можно сделать вывод о том, что эфирное масло только ромашки и сочетание с маслом из семян чернушки посевной обладает на сегодняшний день неожиданными противовоспалительными и противораковыми свойствами, например, при лечении воспаления, иммунопатии и рака.

В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к

(1) композиции, содержащей водный экстракт цветков ромашки для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния;

(2) композиции по пункту (1), в которой водный экстракт представляет собой эфирное масло, которое получено способом экстракции, включающим дистилляцию с водяным паром цветков ромашки, предпочтительно под пониженным давлением;

(3) композиции по пункту (1) или (2), в которой цветки ромашки представляют собой *Flores tubiformis*;

(4) композиции по пункту (2) или (3), где дистилляцию с водяным паром проводят в атмосфере азота, и этот способ дополнительно включает стадии:

(i) контактирования композиции с поперечно сшитым повидоном, который образует комплекс с кумаринами;

(ii) удаления комплекса поперечно сшитого повидона и кумарина, образованного на стадии (i);

(iii) удаления остатков воды путем контактирования композиции, полученной на стадии (ii), с безводным сульфатом натрия; и

(iv) отделения сульфата натрия от композиции, полученной на стадии (iii);

(5) композиции по любому из пунктов с (1) по (4), где указанная композиция дополнительно содержит масло чернушки посевной;

(6) композиции по пункту (5), в которой масло чернушки посевной представляет собой очищенное масло чернушки посевной, получаемое процессом очистки, включающим стадии:

(i) контактирования масла чернушки посевной с поперечно сшитым повидоном, который образует комплекс с фенольными соединениями;

(ii) удаления комплекса кросс-повидона и фенольных соединений, образованных на стадии (i);

(iii) удаления остатков воды путем контактирования масла чернушки посевной, полученного на стадии (ii), с безводным сульфатом натрия; и

(iv) отделения сульфата натрия от масла чернушки посевной, полученного на стадии (iii);

(7) композиции по любому из пунктов с (1) по (6), отличающейся тем, что указанным состоянием является воспалительное состояние, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из болезни Крона и рассеянного склероза;

(8) композиции по любому из пунктов с (1) по (6), отличающейся тем, что указанным состояние представляет собой злокачественное заболевание, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из глиобластомы, рака легких и рака предстательной железы;

(9) композиции по любому из пунктов с (1) по (7), отличающейся тем, что воспалительное состояние вызвано аутоиммуннопатией, предпочтительно запускаемой интерлейкином 6, более предпочтительно запускаемой лейкотриенами, наиболее предпочтительно обусловлено присутствием интерлейкина 6 и/или лейкотриенов;

(10) композиции по любому из пунктов с (1) по (6) и (8), отличающейся тем, что указанное состояние вызвано пролиферативным нарушением, предпочтительно запускаемым интерлейкином 6, более предпочтительно запускаемым лейкотриенами, наиболее предпочтительно обусловлено присутствием интерлейкином 6 и/или лейкотриенами;

(11) применению композиции, охарактеризованной в любом из пунктов с (1) по (6), для получения лекарственного средства для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния;

(12) применению по пункту (11), где указанное состояние является таким, как определено в любом из пунктов с (7) по (10);

(13) способу лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния, который включает введение пациенту, представляющему собой человека или животное, композиции, охарактеризованной в любом из пунктов с (1) по (6), в эффективном количестве; и

(14) способу по пункту (13), где указанная композиция охарактеризована в любом из пунктов с (7) по (10).

Описание изобретения

Настоящее изобретение основано на данных, полученных при использовании водного экстракта соцветий ромашки, предпочтительно получаемого путем дистилляции с водяным паром. В точности водный экстракт состоит из летучих компонентов соцветий ромашки *Matricaria recutita* L., также известной специалистам в данной области как *Matricariae aetheroleum*, описанной в Европейской фармакопее 5.1. Настоящее изобретение дополнительно основано на данных, полученных путем использования сочетания масла семян чернушки посевной и эфирного масла соцветий ромашки.

Экстракт может быть получен любым подходящим способом, в том числе способами, известными специалистам в данной области. Этот экстракт может быть получен путем использования водной или органической среды и отделен от других компонентов фильтрацией, хроматографией, сверхкритической флюидной экстракцией и т.д. Например, материал, который может быть использован в настоящем изобретении, получен из высушенных соцветий растения семейства Астровых *Matricaria recutita* L. или одного или нескольких материалов этого растения, в том числе эфирных масел, хамазулена, бисаболола и других веществ. Предпочтительным способом является очистка исходно полученного эфирного масла путем контактирования его с кросс-повидоном (поперечно сшитым повидоном) и

сульфатом натрия. Специалистам в данной области известно, что кросс-повидон образует комплексы с фенильными соединениями и кумаринами. Известно, что сульфат натрия связывает остатки воды. Отделение очищающих агентов приводит к получению экстракта, свободного или почти свободного от остатков кумарина, фенола и воды. Большое значение имеет источник экстракта ромашки. Это должно быть соцветие, предпочтительно трубчатые цветки *Matricaria recutita* L. (*Flores tubiformis*). Композиция может содержать помимо эфирного масла ромашки масло семян чернушки посевной и ацетилцистеин, и аскорбилпальмитат в качестве активных ингредиентов. Присутствия других агентов не требуется.

Используемая композиция должна подходить для инъекции. С этой целью желательно удалить эндотоксины, полифенолы, кумарины и (любыми подходящими средствами, известными специалистам в данной области) компоненты большой молекулярной массы, например компоненты, имеющие молекулярную массу более 1000 или 10000.

Композиции для использования в настоящем изобретении могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. Следует использовать фармацевтически приемлемые компоненты. Термин «фармацевтически приемлемый» относится к тем свойствам и/или веществам, которые приемлемы для пациента с фармакологической/токсикологической точки зрения и для производящего химика-фармацевта с физической/химической точки зрения в отношении факторов, таких как технология получения лекарственного средства, стабильность, прием пациентом и биодоступность.

Введение предпочтительно осуществляют внутривенной или, более предпочтительно, внутримышечной инъекцией, еще более предпочтительно, с помощью ингалятора в виде аэрозоля или микро/наноэмульсии через дыхательные пути.

Фармацевтическая композиция, содержащая активный ингредиент, может быть в форме, подходящей для перорального применения, например в виде таблеток, пастилок, леденцов, водных или масляных суспензий, диспергируемых порошков или гранул, эмульсий, твердых или мягких капсул, или сиропов или эликсиров. Такие композиции могут содержать один или несколько агентов, выбранных из группы, состоящей из подсластителей, вкусовых ароматических веществ, красителей и консервантов для получения фармацевтических препаратов, приятных на вкус. Таблетки содержат активный ингредиент в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми эксципиентами, например такими, как инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия; гранулирующие и дезинтегрирующие агенты, например кукурузный крахмал или альгиновая кислота; связующие агенты, например крахмал, желатин или акация; и смазывающими агентами, например стеаратом магния, стеариновой кислотой или тальком. Таблетки могут быть без покрытия или на них может быть нанесено покрытие с помощью известных методик для задержки дезинтеграции и абсорбции в желудочно-кишечном тракте, и тем самым обеспечивается длительное действие на протяжении более длительного периода времени. Например, может быть использовано замедляющее вещество, такое как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат. На них также может быть нанесено покрытие для получения осмотических терапевтических таблеток для контролируемого высвобождения.

Композиции для перорального применения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешивают с

инертным твердым разбавителем, например карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешивают с водной или масляной средой, например ореховым маслом, жидким парафином или оливковым маслом.

5 Водные суспензии могут содержать активные вещества в смеси с подходящими эксципиентами. Такими эксципиентами являются суспендирующие агенты, например карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и акациевая камедь; 10 диспергирующие или увлажняющие агенты, например природные фосфатидиды, такие как лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например полиоксиэтилен стеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например 15 гептадекаэтиленоксицетанолом, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола, например полиоксиэтилена с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Водные суспензии также могут содержать один или несколько консервантов, например этил или н-пропил п-гидроксibenзоат, один или несколько красителей, одно или несколько вкусовых ароматических веществ, и один или несколько подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

Масляные суспензии могут быть получены путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, например ореховом масле, оливковом масле, 25 кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластители (такие, которые описаны выше) и вкусовые ароматические вещества могут быть добавлены для получения 30 приятного на вкус препарата для перорального применения. Эти композиции могут сохраняться путем добавления антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота.

Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для получения водной суспензии путем добавления воды, предоставляют активный ингредиент в смеси с 35 диспергирующим или увлажняющим агентом, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Подходящие диспергирующие или увлажняющие агенты проиллюстрированы выше. Также могут присутствовать подсластители, вкусовые ароматические вещества и красители.

Фармацевтическая композиция для применения в настоящем изобретении также 40 может находиться в форме эмульсии масло-в-воде. Масляной фазой может быть растительное масло, например оливковое масло или ореховое масло, или минеральное масло, например жидкий парафин, или их смеси. Подходящими эмульгирующими агентами могут быть природные камеди, например акациевая камедь или трагакантовая камедь, природные фосфатидиды, например соевые бобы, лецитин и 45 сложные эфиры или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гекситола, например сорбитан моноолеат и продукты конденсации указанных неполных сложных эфиров с этиленоксидом, например полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Эмульсии также могут содержать подсластители 50 и вкусовые ароматические вещества.

Сиропы и эликсиры могут быть получены с использованием подсластителей, например глицерина, пропиленгликоля, сорбита или сахарозы. Такие композиции также могут содержать успокоительное средство, консервант и вкусовые

ароматические и красящие вещества. Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильной инъекруемой водной или масляной суспензии. Эта суспензия может быть получена с использованием подходящих диспергирующих или увлажняющих агентов, примеры которых были упомянуты выше. Стерильный инъекруемый препарат также может быть в стерильном инъекруемом растворе или суспензии в нетоксичном, приемлемом для парентерального введения, разбавителе или, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, находятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные жирные масла обычно используют в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели может быть использовано любое легкое жирное масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение в получении инъекруемых составов.

Композицию также можно вводить в форме суппозиториев для ректального применения лекарственного средства. Такие композиции могут быть получены путем смешивания лекарственного средства с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре и, следовательно, будет плавиться в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такими веществами являются кокосовое масло и полиэтиленгликоли.

Для топического применения подходящие композиции находятся в форме, например, кремов, мазей, желе, растворов или суспензий.

Как указано выше, композицию по настоящему изобретению можно вводить путем инъекции. Предпочтительной является внутримышечная инъекция, хотя подходит любое парентеральное введение.

Также может быть предпочтительным, чтобы композицию вводили перорально. В этом случае, и в случае применения средства для повышения проницаемости, инсулин не следует включать в пероральную композицию. Пероральное введение может быть особенно предпочтительным для ветеринарной медицины.

Пациенту также можно вводить другие активные вещества. Хотя считается, что дополнительные вещества не являются обязательными, было обнаружено, что некоторые стероиды и витамины, обычно вводимые перорально, могут поддерживать или усиливать действие лекарственного средства. Подходящие стероидные гормоны могут повышать синтез специфических белков путем раскрытия определенных цистронов при содействии необходимых метаболитов, таких как витамины и аминокислоты. Примерами подходящих стероидов являются эстрадиол, нандролон и эстриол. Также можно вводить такие витамины, как А, D и/или Е. Функцией витамина А может быть сохранение целостности эпителиальной ткани, роль в синтезе белка и стабилизация клеточных мембран, а также субклеточных мембран.

Хотя некоторые указания были даны относительно подходящих доз определенных веществ, точная доза и частота введения зависит от нескольких факторов. Эти факторы включают в себя конкретные компоненты, которые используются, конкретное состояние, подвергаемое лечению, тяжесть этого заболевания, возраст, массу тела и общее физическое состояние конкретного пациента, и другую лекарственную терапию, которую может принимать индивидуум, как хорошо известно специалистам в данной области.

Описание чертежей

На Фиг.1А показаны результаты ингибирования IL-6 повтор 1 в Примере 1 для

эфирного масла *Matricaria*:

VIP_Matr`07_78

IC50=5 мкг/мл (определено графически)

PRISM IC50=7,782 мкг/мл (рассчитано с помощью GraphPad Prism)

95% интервал от 3,169 до 19,11

На Фиг.1В показаны результаты ингибирования IL-6 повтор 2 в Примере 1 для

эфирного масла *Matricaria*:

VIP_Matr`07_78

IC50=8 мкг/мл (определено графически)

PRISM IC50=8,78 мкг/мл (рассчитано с помощью GraphPad Prism)

95% интервал от 6,248 до 12,35 мкг/мл

Фиг.1С показаны результаты ингибирования IL-6 повтор 1 в Примере 1 для

эфирного масла *Nigella*:

VIP_Nig'07_8

IC50=не установлено

PRISM IC50=не сходится (GraphPad Prism)

95% интервал

На Фиг.1D показаны результаты ингибирования IL-6 повтор 2 в Примере 1 для

эфирного масла *Nigella*:

VIP_Nig'07_8

IC50=не установлено

PRISM IC50=не сходится (GraphPad Prism)

95% интервал

На Фиг.2 показаны результаты, полученные из исследования ингибирования 5-LOX в Примере 2 тестирования ингибирования активности 5-LOX под действием NICHA (среднее от 2 до 4 независимых исследований (результаты 3 независимых анализов 5-lox для ViP_E_Nig'07_8, 4 независимых анализа 5-lox для VIP_Matr`07_78 и 2 независимых анализа 5-lox для смеси 1:1).

Фиг.2А: ViP_Matr'07_78 (масло ромашки), повтор 1

Фиг.2В: ViP_Nig'07_8 (масло *Nigella sativa*), повтор 1

Фиг.2С: ViP_Matr'07_78 (масло ромашки), повтор 2

Фиг.2D: ViP_Nig'07_8 (масло *Nigella sativa*), повтор 2

Фиг.2Е: Смесь 1:1 (VIP_Matr`07_78 : ViP_E_Nig'07_8)

На Фиг.3 показаны результаты, полученные из анализа жизнеспособности клеток HL-60 с WST-1 под действием NICHA в Примере 2.

Фиг.3А: ViP_Matr'07_78 (масло ромашки)

Фиг.3В: ViP_Nig'07_8 (масло *Nigella sativa*)

На Фиг.4 показаны результаты, полученные в отношении действия NICHA на синтез ДНК в злокачественных клетках предстательной железы DU145 в Примере 3.

Фиг.4А: 24 часа инкубирования, ViP_Matr'07_78 (масло ромашки)

Фиг.4В: 24 часа инкубирования, ViP_Nig'07_8 (масло *Nigella sativa*)

Фиг.4С: 48 часов инкубирования, ViP_Matr'07_78 (масло ромашки)

Фиг.4D: 48 часов инкубирования, ViP_Nig'07_8 (масло *Nigella sativa*)

На Фиг.5 показаны результаты, полученные в отношении действия NICHA на синтез ДНК в клетках U-87MG при 48 часах инкубирования в Примере 3.

Фиг.5А: ViP_Matr'07_78 (масло ромашки)

Фиг.5В: ViP_Nig'07_8 (масло *Nigella sativa*)

Фиг.5С: Смесь 1:1 (VIP_Matr`07_78:ViP_E_Nig'07_8)

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение.

Пример 1 - ингибирующая активность в ТНР1 (макрофагах) в отношении высвобождения интерлейкина 6

Образцы и препараты сравнения

Тестируемые образцы	Описание	Поставщик	Номер	№ партии	Номер VIP
Масло Nigella	Nigellae oleum	Hänseler AG	26-4150-1	2006.08.0537	ViP_Nig'07_8
Эфирное масло Matricaria	Matricariae Aetheroleum PhEur	Hänseler AG	1-4925-2	2006.09.0181	ViP_Matr'07_78

Препараты	Порядковый №	№ партии	Поставщик	Исследование
NDGA	74540	422 780/1 5400	Fluka	5-LOX ингибирование на дифф. клетках HL-60

Исследование ингибирования IL-6

Исследование	Клеточная линия	Образец	Концентрация образца в исследовании (исходя из массы масла)	Растворитель	Повтор
Ингибирование IL-6*	ТНР дифференцированные	ViP_Nig'07_8	300 нг, 3 мкг, 30 мкг/мл	EtOH абс.	2
		ViP_Matr'07_78	300 нг, 3 мкг, 30 мкг/мл	s.o.	2

* Исследование проводили в двух независимых повторах

Исследование ингибирования IL-6 на клетках ТНР-1

Образцы предварительно инкубировали в течение 30 минут при 37°C с клетками (ТНР-1 человека), предварительно дифференцированными с использованием РМА (0,125×10⁶ клеток/лунку). Реакцию начинали под действием LPS (1 мкг/мл) и инкубирование проводили на протяжении 24 часов при 37°C. Отрицательные контроли t(0) проводили путем анализа смеси без стимуляции LPS [контроль 1].

Количественное определение IL-6 проводили с использованием набора для иммуноферментного анализа Enzyme Immuno Assay (EIA) Kit от Cayman No: 583361. Оптические плотности измеряли при длине волны = 415 нм. Количественные показатели рассчитывали, используя стандартную кривую по меньшей мере 5 различных концентраций.

Каждую точку измерения определяли в двух повторах. Дозы, соответствующие значениям ингибирования, выражали как процент от значений положительного контроля. Значения IC50 (соответствующие концентрации образца, при которой уровень ингибирования составляет 50%) определяли с помощью программы GraphPad-Prism (Version 4, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Результаты

Результаты Примера 1 показаны на Фиг.1.

Пример 2 - Ингибирующая активность NICHА 001 в линиях злокачественных клеток человека в отношении высвобождения лейкотриенов

Исследовали ответ двух линий клеток человека (гранулоцитов) под действием различных концентраций NICHА на высвобождение лейкотриенов. Каждый эксперимент проводили с маслом Nigella, с маслом ромашки и с сочетанием этих двух масел.

Образцы

Тестируемые образцы	Описание	Поставщик	номер	№ партии	Номер ViP
Масло Nigella	Nigellae oleum	Hänseler AG	26-4150-1	2006.08.0537	ViP_Nig'07_8
Эфирное масло Matricaria	Matricariae Aetheroleum PhEur	Hänseler AG	1-4925-2	2006.09.0181	ViP_Matr'07_78

5

Исследования

Исследования	Клеточные линии	Образцы	Тестируемые концентрации
Ингибирование 5-LOX	Гранулоциты	ViP_Nig'07_8	0,3/3/30 мкг/мл
	дифференцированные HL60	ViP_Matr'07_78	0,1/0,3/1/3/10/30 мкг/мл
		Смесь	0,3/3/30 мкг/мл
Исследование WST-1	Клетки HL-60	ViP_Nig'07_8	0,3/3/30 мкг/мл
		ViP_Matr'07_78	

10

Исследование ингибирования 5-LOX

15

Клетки HL-60 человека (миелоидный лейкоз, DSMZ No ACC 3) держали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ и культивировали в полной среде RPMI1640, дополненной 10% эмбриональной сывороткой теленка и 1% (об./об.) раствором пенициллин/стрептомицин. Клетки дифференцировали в течение 6-8 дней с использованием DMSO (1,2% об./об.). Исследование активности 5-LOX проводили, как описано у Bennet et al. [контроль: 2]. Вкратце, дифференцированные клетки собирали, суспендировали в PBS, содержащем Ca²⁺ (1 мМ) и глюкозу (1 мМ), и размещали в 96-луночном микротитровальном планшете (1×10⁶ клеток/лунку).

20

25

После предварительного инкубирования с образцом или носителем в течение 15 мин при комнатной температуре реакцию начинали путем добавления ионофора кальция А 23187 (5 мкМ) и арахидоновой кислоты (10 мкМ). Все величины представляют собой конечные концентрации. Отрицательные контроли проводили без стимуляции ионофором кальция. Исследуемую смесь инкубировали в течение 15 мин при 37°C и завершали добавлением 100 мкл HCl, содержащей метанол (1 М, 3% об./об.), и микротитровальный планшет помещали на лед. После нейтрализации с использованием 50 мкл PBS и центрифугирования (340×g) в течение 10 мин определяли концентрацию LTB₄ в супернатанте.

30

35

Действия образцов и эталонного соединения [контроль: 3] на активность 5-LOX измеряли путем определения количества лейкотриена В₄, продуцированного в условиях исследования. Количественное определение лейкотриена В₄ проводили с использованием набора для иммуоферментного анализа Enzyme Immuno Assay (EIA) Kit от Cayman No 520111 (LTB₄). Оптические плотности измеряли при длине волны = 415 нм. Количества рассчитывали, используя стандартную кривую по меньшей мере 5 различных концентраций. Каждую точку измерения определяли в двух повторах. Дозы, соответствующие значениям ингибирования, выражали как процент от значений положительного контроля. По возможности, значения IC₅₀ (соответствующие концентрации образца, при которой уровень ингибирования составляет 50%) определяли с помощью программы GraphPad-Prism (Version 4, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

40

45

Анализ жизнеспособности на клетках HL60 с использованием WST-1

50

Функцию клетки/митохондрий: снижение метаболической активности [контроль: 4] тестировали на гепатоцитах человека (Hep G2), гранулоцитах человека (дифференцированные HL60), моноцитах человека (THP-1) и макрофагах человека (дифференцированные THP-1) с использованием набора Tetrazoliumsalt WST-1 Kit

(Biovision, K301-500, CA USA). Клетки предварительно инкубировали с экстрактом в течение 24 часов.

5 Метаболическую активность клеток измеряли по способности жизнеспособных клеток восстанавливать соль тетразолия WST-1 до формазана. Количество формазана измеряли напрямую путем определения оптической плотности (OD) с помощью планшетного ридера (BioRad, USA) при длине волны $\lambda=450$ нм.

10 Оптические измерения проводили в трех повторах и вычисляли стандартные отклонения. Для каждой тестируемой концентрации величины OD контроля (исследуемой смеси с образцами, но без клеток) вычитали из среднего измерений OD с клетками. Величины OD450 переводили в процентные значения с показателями жизнеспособности 100%, соответствующими измерениям контроля без образца.

Результаты

15 Результаты Примера 2 показаны на Фиг.2 и 3.

Значения IC_{50} , полученные в результате исследования ингибирования 5-LOX:

Образец	Повтор	IC_{50} (мкг/мл)	95% достоверность (мкг/мл)
ViP_Matr'07_78	1	0,30	От 0,06 до 2,84
ViP_Nig'07_8	1	3,00	От 1,33 до 10,76
ViP_Matr'07_78	2	0,38	От 0,21 до 0,68
ViP_Nig'07_8	2	3,02	От 1,57 до 5,82
Смесь 1:1	1	0,53	От 0,23 до 1,24
Контроль	IC_{50} (нМ)	95% достоверность (нМ)	
Дексаметазон	0,28	От 0,21 до 0,39	

Пример 3 - Влияние NICHА 001 на пролиферацию линий злокачественных клеток человека

30 Исследовали пролиферативную реакцию клеток глиобластомы и злокачественных клеток предстательной железы под действием различных концентраций NICHА. Каждый эксперимент проводили с маслом Nigella, с маслом ромашки и с сочетанием этих двух масел.

Образцы

Тестируемые образцы	Описание	Поставщик	Номер	№ партии	Номер ViP
Масло Nigella	Nigellae oleum	Hänseler AG	26-4150-1	2006.08.0537	ViP_Nig'07_8
Эфирное масло Matricaria	MatricariaeAetheroleum PhEur	Hänseler AG	1-4925-2	2006.09.0181	ViP_Matr'07_78

Исследования

Исследования	Клеточные линии	Образцы	Тестируемые концентрации
45 Синтез ДНК	Злокачественные клетки предстательной железы	ViP_Nig'07_8	0,3/3/30 мкг/мл
	DU145	ViP_Matr'07_78	0,3/3/30/60 мкг/мл
	Клетки глиобластомы	ViP_Nig'07_8	0,3/3/30 мкг/мл
	U-87 MG	ViP_Matr'07_78	
		Смесь	

Синтез ДНК

50 Включение 3H -тимидина: клетки DU145 и U-87MG собирали путем трипсинизации и высевали при 10000 клеток/лунку в 96-луночный планшет. Клетки инкубировали с образцами в требуемых концентрациях в течение 24 часов и/или 48 часов при 37°C и 5%

CO₂. Клетки сенсibilизировали ³H-тимидином (1 мкКю/мл) (Perkin Elmer) в течение 24 часов. После чего, их промывали, используя PBS, и фиксировали дважды метанолом в течение 5 мин. Белок осаждали, используя 0,3 н ТСА. После стадии промывания добавляли 150 мкл 0,3 н NaOH в течение 15 мин для лизиса клеток. Фоновые контроли измеряли с образцами без клеток.

Для обнаружения включенного ³H-тимидина для синтеза ДНК образцы переносили в сцинтилляционные пробирки со сцинтиллятором. Количественное определение проводили в жидкостном сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 1900 TR (Packard, USA).

Действие нескольких концентраций образцов измеряли путем определения количества радиоактивной метки (dpm) в условиях исследования. Величины, соответствующие дозам, выражали как процент от значений положительного контроля. Точки измерения определяли в четырех повторах, ошибки выражали в виде стандартных отклонений.

Результаты, полученные для злокачественных клеток предстательной железы DU145

Результаты действия NICHA на синтез ДНК в злокачественных клетках предстательной железы (DU145) показаны на Фиг.4А-4D.

Значение IC₅₀ эталонных соединений в отношении синтеза ДНК представляют собой следующее:

Контроль	Инкубирование 24 ч		Инкубирование 48 ч	
	IC ₅₀ (нМ)	95% достоверность (нМ)	IC ₅₀ (нМ)	95% достоверность (нМ)
Компототецин	152	От 115,9 до 199,4	7,5	От 5,1 до 11,0

Результаты, полученные в отношении клеток глиобластомы U87MG

Результаты действия NICHA на синтез ДНК в клетках U-87MG (48 часов инкубирования) показаны на Фиг. 5А-5С.

Значения IC₅₀ эталонных соединений в отношении синтеза ДНК с клетками В-87MG представляют собой следующее:

Контроль	Инкубирование 48 ч	
	IC ₅₀ (нМ)	95% достоверность (нМ)
Кампототецин	3,32	От 2,5 до 4,4

Заключение по результатам примеров

Эфирное масло ромашки (*Matricaria recutita*: VIP_Matr07_78) и масло семян чернушки посевной (*Nigella sativa*: VIP_Nig07_8) исследовали в отношении их эффективности в отношении ингибирования синтеза лейкотриенов в дифференцированной клеточной линии гранулоцитов человека HL 60 (острый миелоидный лейкоз человека). Масло семян *Nigella sativa* показало впечатляющее ингибирование активности 5-Lox со значением IC₅₀ 3,02 мкг/мл (Пример 2, Фиг.2d). Неожиданно, смесь двух соединений ингибировала синтез лейкотриенов в клеточной линии гранулоцитов HL60 сверхсуммарно. Вместо ожидаемой IC₅₀ 0,76 мкг/мл, в результате IC₅₀ составила 0,53 мкг/мл (Пример 2, Фиг.2e). Может быть сделан вывод о том, что сочетание двух соединений потенцирует активность отдельных компонентов.

VIP_Matr07_78 показало еще более высокую ингибирующую активность в отношении ингибирования синтеза лейкотриенов, и показало значение IC₅₀ 0,38 мкг/мл (Пример 2, Фиг.2с). Следовательно, эфирное масло *Matricaria* по-видимому является чрезвычайно мощным ингибитором 5-LOX.

Для оценки, является ли наблюдаемая ингибирующая активность только результатом цитотоксических действий, клетки инкубировали с выбранными концентрациями для экспериментов с 5-LOX, и измеряли митохондриальную активность (WST). Как показано на Фигурах 3a и 3b, цитотоксичность не наблюдалась с VIP_Nig07_8 или с VIP_Matr07_78 при выбранных концентрациях (Пример 2, Фиг.3a и 3b). Можно сделать вывод о том, что наблюдаемая активность в отношении ингибирования синтеза лейкотриенов является результатом специфического взаимодействия с 5-липоксигеназой.

Дополнительные результаты также были получены в отношении высвобождения интерлейкина 6 линией клеток макрофагов человека THP1. Хотя у *Nigella sativa* не было показано активности (Пример 1 Фиг.1c и 1d), *Matricaria recutita* ингибировала высвобождение интерлейкина 6 из клеток THP1 дозозависимым образом и со значением IC50 5 мкг/мл (Пример 1, Фиг.1a и 1b). Повторные эксперименты (повтор 2) показали воспроизводимость результатов повтора 1 (Пример 1).

Эти результаты указывают на то, что эфирное масло *Matricaria recutita* демонстрирует сильную ингибирующую активность в отношении синтеза лейкотриенов в клетках острого миелоидного лейкоза человека HL60 (Пример 2, Фиг.2c). Далее, результаты указывают на то, что высвобождение интерлейкина 6 могло быть супрессировано в клеточной линии макрофагов человека THP1 (Пример, Фиг.1a и 1b).

Поскольку концентрации, необходимые для получения эффекта ингибирования, являются достаточно низкими, предполагается, что у людей терапевтически эффективные дозы будут достигаться без труда, тем более что эфирные масла являются очень липофильными и должны легко поглощаться.

В совокупности с характерным для эфирного масла эффективным ингибированием образования эйкозаноидов (лейкотриенов) концентрациями в наномолярном диапазоне в клеточной линии гранулоцитов человека HL60, эфирное масло *Matricaria recutita* по-видимому является очень ценным кандидатом для разработки лекарственных средств для лечения воспалительных/аутоиммунных заболеваний и некоторых типов рака.

В третьей серии экспериментов (пример 4) исследовали, ингибирует ли масло семян *Nigella sativa* или эфирное масло *Matricaria recutita* синтез ДНК в линии злокачественных клеток предстательной железы DU 145 и линии клеток глиобластомы U87MG *in vitro*. Тогда как *Matricaria recutita* (VIP_Matr07_78) ингибировала обе клеточные линии через 48 часов в отношении синтеза ДНК дозозависимым образом (пример 4, Фиг.4c), *Nigella sativa* (VIP_Nig07_8) не показала ингибирующего действия на обе линии злокачественных клеток (пример 4, Фиг.4d). Поскольку известно, что DU145 продуцирует интерлейкин 6 в качестве фактора роста, кажется вероятным, что супрессия синтеза ДНК (по меньшей мере частично) вызвана ингибирующей активностью в отношении высвобождения интерлейкина 6 эфирного масла *Matricaria recutita*. Ингибирование синтеза ДНК линии клеток глиобластомы U87MG очевидно является действием сильной супрессии синтеза лейкотриенов под действием эфирного масла *Matricaria recutita*.

Формула изобретения

1. Композиция, содержащая
- водный экстракт цветков ромашки, причем этот водный экстракт состоит из эфирного масла, которое получают процессом экстракции, включающим дистилляцию

с водяным паром цветков ромашки, и

- масло чернушки посевной для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния.

2. Композиция по п.1, в которой соотношение эфирного масла ромашки и масла чернушки посевной составляет 1:1.

3. Композиция по п.1, в которой цветки ромашки представляют собой *Flores tubiformis*.

4. Композиция по пп.1-3, в которой дистилляцию с водяным паром проводят под пониженным давлением.

5. Композиция по п.4, где дистилляцию с водяным паром проводят в атмосфере азота, и этот процесс дополнительно включает стадии

(i) контактирования композиции с поперечно-сшитым повидоном, который образует комплекс с кумаринами;

(ii) удаления комплекса, полученного на стадии (i); и

(iii) удаления воды путем контактирования композиции, полученной на стадии (ii), с безводным сульфатом натрия; и

(iv) отделения сульфата натрия от композиции, полученной на стадии (iii).

6. Композиция по п.5, которая, по существу, свободна от воды, предпочтительно содержащая менее 0,1% мас./мас. воды, наиболее предпочтительно менее 0,01% мас./мас. воды.

7. Композиция по п.6, которая, по существу, свободна от кумаринов, предпочтительно содержащая менее 0,01% мас./мас., наиболее предпочтительно менее 0,005% мас./мас. кумаринов, подсчитанных как 7-гидроксикумарин.

8. Композиция по п.6, которая содержит хамазулен в количестве 5-15% мас./мас., более предпочтительно 15-25% мас./мас., наиболее предпочтительно 20-30% мас./мас.

9. Композиция по п.1, в которой масло чернушки посевной представляет собой очищенное масло чернушки посевной, получаемое с помощью процесса очистки, включающего стадии

(i) контактирования масла чернушки посевной с поперечно-сшитым повидоном, который образует комплекс с фенольными соединениями;

(ii) удаления комплекса, полученного на стадии (i); и

(iii) удаления воды путем контактирования масла чернушки посевной, полученного на стадии (ii), с безводным сульфатом натрия; и

(iv) отделения сульфата натрия от масла чернушки посевной, полученного на стадии (iii).

10. Композиция по любому из пп.1-9, где указанную композицию получают путем ультрафильтрации, предпочтительно используя фильтр с размером пор от 0,001 до 0,02 мкм, более предпочтительно от 0,001 до 0,01 мкм.

11. Композиция по любому из пп.1-9, которая свободна или, по существу, свободна от эндотоксинов, предпочтительно содержащая эндотоксины в количестве 100 EU/мл (единиц эндотоксина на мл в соответствии с Европейской фармакопеей) или менее, более предпочтительно 50 EU/мл или менее, еще более предпочтительно 10 EU/мл или менее.

12. Композиция по любому из пп.1-9, которая не содержит веществ с молекулярной массой, превышающей 10000, более предпочтительно не содержит веществ с молекулярной массой, превышающей 1000.

13. Композиция по любому из пп.1-9, которая свободна или, по существу, свободна от соединений, выбранных из группы, состоящей из кумаринов, флавоноидов, других

фенольных соединений, являющихся характерными примесями ромашки и/или чернушки полевой, и остаточной воды.

14. Композиция по любому из пп.1-9, которая дополнительно содержит аскорбилпальмитат и/или ацетилцистеин.

15. Композиция по любому из пп.1-9, которая дополнительно содержит по меньшей мере одно фармацевтическое вспомогательное средство, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из фармацевтических средств и фармацевтических эксципиентов.

16. Композиция по любому из пп.1-9, где лечение осуществляют путем инъекции или ингаляции этой композиции.

17. Композиция по любому из пп.1-9, где состоянием является воспалительное состояние, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из болезни Крона и рассеянного склероза.

18. Композиция по п.1, где состояние представляет собой злокачественное заболевание, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из глиобластомы, рака легких и рака предстательной железы.

19. Композиция по любому из пп.1-9, где воспалительное состояние вызвано аутоиммуннопатией, предпочтительно индуцируемой интерлейкином 6, более предпочтительно индуцируемой лейкотриенами, наиболее предпочтительно зависящей от присутствия интерлейкина 6 и/или лейкотриенов.

20. Композиция по любому из пп.1-9 и 18, где указанное состояние вызвано пролиферативным нарушением, предпочтительно индуцируемым интерлейкином 6, более предпочтительно индуцируемым лейкотриенами, наиболее предпочтительно зависящим от присутствия интерлейкином 6 и/или лейкотриенами.

21. Применение композиции, охарактеризованной по любому из пп.1-15, для получения лекарственного средства для лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния.

22. Применение по п.21, где лечение является таким, как определено по п.16.

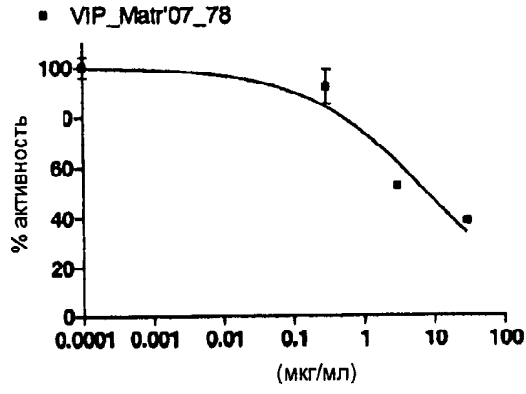
23. Применение по п.21 или 22, где состояние является таким, как определено по любому из пп.17-20.

24. Способ лечения пролиферативного и/или воспалительного состояния, который включает введение пациенту, представляющему собой человека или животное, композиции, охарактеризованной по любому из пп.1-15, в эффективном количестве.

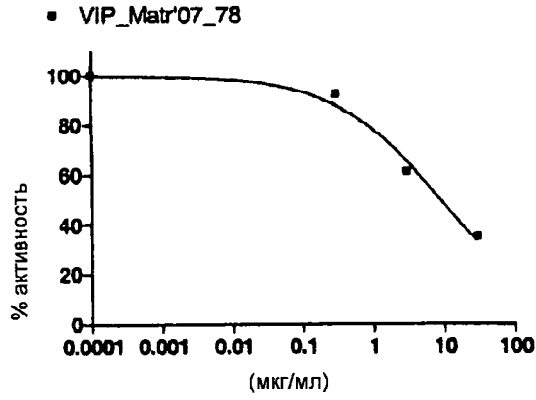
25. Способ по п.24, в котором введение осуществляют путем инъекции и/или ингаляции композиции.

26. Способ по п.25, в котором композиция представляет собой инъекционную композицию.

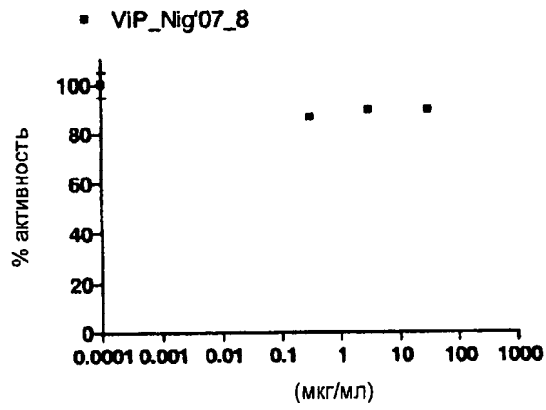
27. Способ по любому из пп.24-26, в котором состояние представляет собой состояние, определенное по любому из пп.17-20.



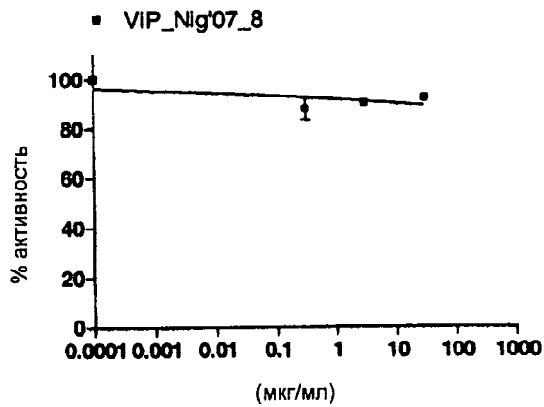
ФИГ.1А



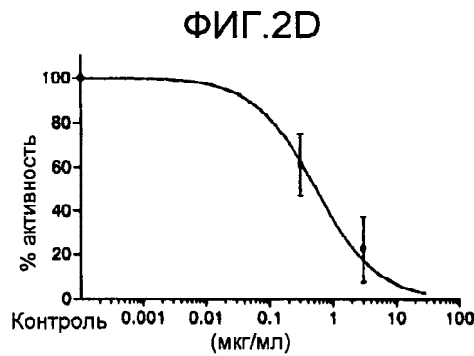
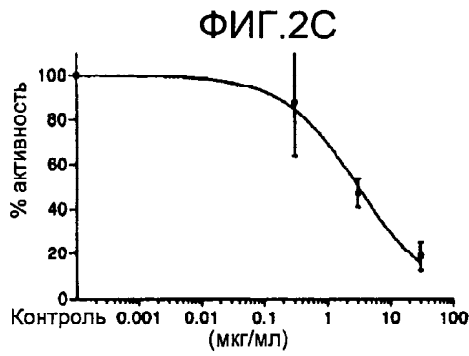
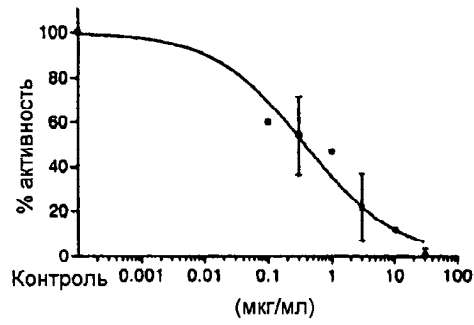
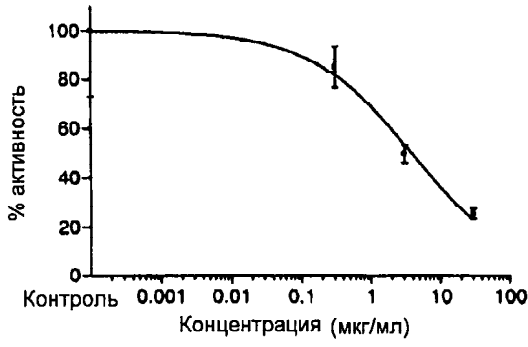
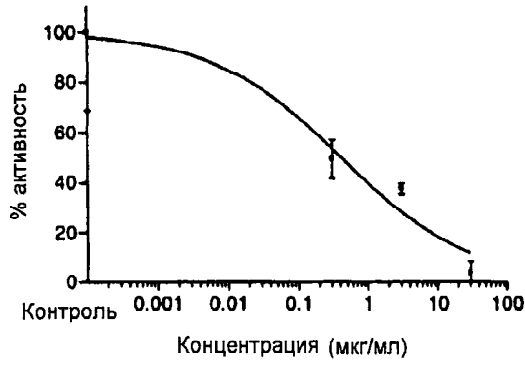
ФИГ.1В

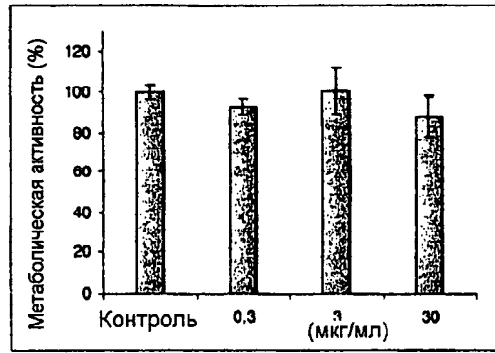


ФИГ.1С

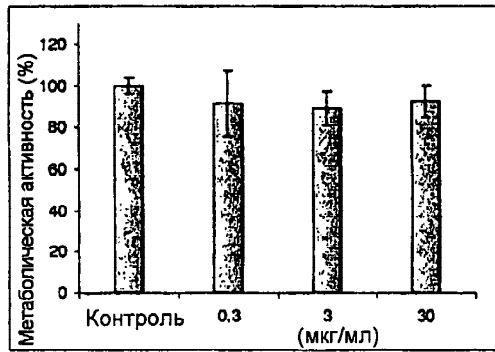


ФИГ.1D

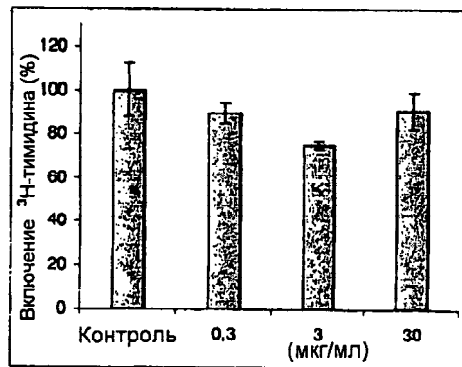




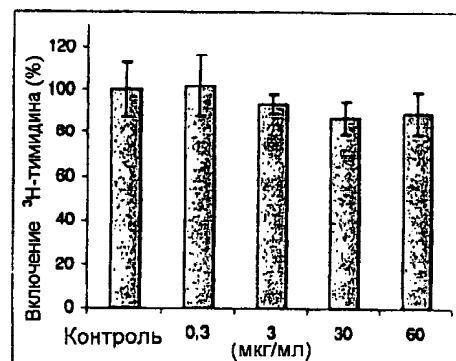
ФИГ.3А



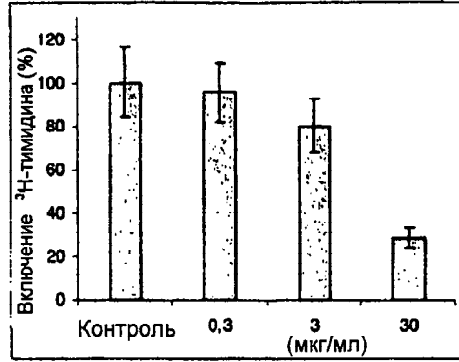
ФИГ.3В



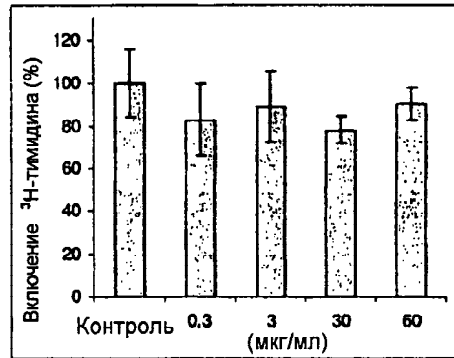
ФИГ.4А



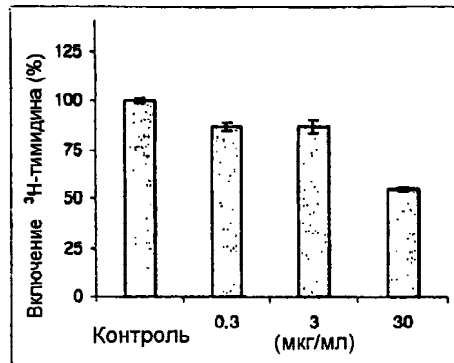
ФИГ.4В



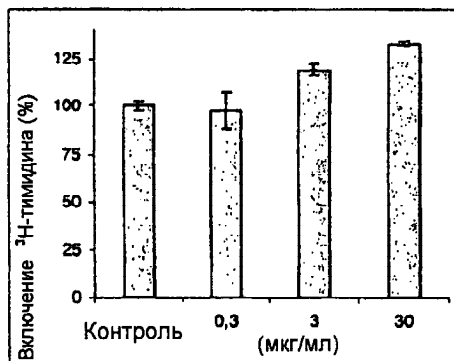
ФИГ.4С



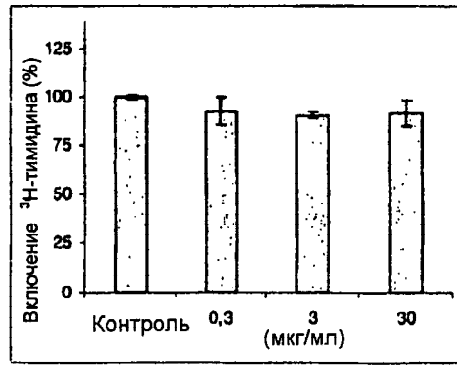
ФИГ.4D



ФИГ.5А



ФИГ.5В



ФИГ.5С