



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103517709 B

(45)授权公告日 2017.05.03

(21)申请号 201180070564.7

(22)申请日 2011.06.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103517709 A

(43)申请公布日 2014.01.15

(30)优先权数据
1367/MUM/2011 2011.05.02 IN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.10.31

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2011/052592 2011.06.15

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/150486 EN 2012.11.08

(73)专利权人 梧桐生物技术私人有限公司
地址 印度马哈拉施特拉邦

(72)发明人 苏尼尔·布哈斯卡拉恩
莫汉·维什瓦拉曼

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240
代理人 余刚 张英

(51)Int.Cl.
A61K 31/366(2006.01)
A61K 36/48(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61K 31/351(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)

审查员 刘鹏

权利要求书1页 说明书15页 附图3页

(54)发明名称

治疗自身免疫失调的组合物及其制备方法

(57)摘要

本公开涉及包含葫芦巴糖苷Ib(葫芦巴皂苷Ib,Trigoneoside Ib)和葫芦巴昔-1(巢菜素-1, vicenin-1)的组合物,用于治疗和处理古德帕斯彻病、肾小球肾炎、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮和特发性血小板减少性紫癜。本公开还涉及由葫芦巴获得所述组合物的方法。

1. 一种制备包括葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1可选地连同至少一种赋形剂的组合物的方法,所述方法包括以下操作:

a. 将葫芦巴种子压成片;

b. 用包括约1:1至约9:1比率的脂肪醇和水的溶剂混合物萃取压片的葫芦巴种子,接着过滤和浓缩以获得半固体物质;其中所述脂肪醇选自包含以下各项的组中:甲醇,乙醇,丙醇和异丙醇或它们的任何组合;

c. 溶解所述物质于去离子水中以获得清澈溶液;

d. 用正丁醇逆流萃取所述清澈溶液以获得包含水层和丁醇层的溶液;

e. 将所述水层通过离子交换树脂和吸附柱以获得包含所述葫芦巴糖苷Ib和所述葫芦巴苷-1的洗脱液;

f. 纯化所述洗脱液以获得自由流动的粉末;和

g. 可选地加入至少一种赋形剂以获得所述组合物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述种子压片成约1mm~约5mm的尺寸。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述种子压片成2mm的尺寸。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述溶剂混合物包含比率为4:1的脂肪醇和水。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述浓缩在约40°C~约80°C的温度下实施。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述浓缩在约50°C的温度下实施。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述赋形剂选自包含以下各项的组中:成粒剂,粘合剂,润滑剂,崩解剂,着色剂,调味剂,包衣剂,增塑剂,防腐剂,悬浮剂,乳化剂和滚圆剂或它们的任何组合。

8. 一种通过权利要求1所述的方法制备的组合物,包含浓度范围为约46%~约76%的葫芦巴糖苷Ib和浓度范围为约5%~约15%的葫芦巴苷-1,可选地连同至少一种赋形剂。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述葫芦巴糖苷Ib和所述葫芦巴苷-1获自植物葫芦巴。

10. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述赋形剂选自包含以下各项的组中:成粒剂,粘合剂,润滑剂,崩解剂,着色剂,调味剂,包衣剂,增塑剂,防腐剂,悬浮剂,乳化剂和滚圆剂或它们的任何组合。

11. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述组合物配制成选自包含以下各项的组中的剂型:片剂,胶囊,锭剂,粉剂,溶液,气溶胶,悬浮液,可分散粉末或颗粒,硬或软凝胶胶囊中的乳液,搽剂,油膏,和皮肤贴剂。

12. 由浓度范围为约46%~约76%的葫芦巴糖苷Ib和浓度范围为约5%~约15%的葫芦巴苷-1可选地连同至少一种赋形剂构成的组合物用于制备用于治疗自身免疫失调的药物的用途,所述自身免疫失调选自包含以下各项的组中:古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮和特发性血小板减少性紫癜。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中向需要其的受试者给予所述组合物;并且所述受试者是动物或人类。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述组合物给药的日剂量范围在动物中为约1mg/kg~约100mg/kg而在人中为约1mg/kg~约50mg/kg。

治疗自身免疫失调的组合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本公开涉及含有葫芦巴糖苷Ib(葫芦巴皂苷Ib,Trigoneoside Ib)和葫芦巴昔-1(巢菜素-1,Vicenin-1)的组合物和获得所述组合物的方法。本公开进一步涉及所述组合物用于治疗和处理自身免疫失调如古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮和特发性血小板减少性紫癜的用途。

背景技术

[0002] 自身免疫失调如古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮和特发性血小板减少性紫癜证实会过多生产导致对细胞、组织、器官等严重损伤的自身抗体。这些疾病的特征在于身体对自身抗原的耐受性受损,并随后激活导致损伤的免疫反应。遗传易感性和环境因素是这些疾病的主要原因。

[0003] 古德帕斯彻病和肾小球肾炎的特征在于沿着肾脏中的肾小球基底膜(GBM)沉积抗体,导致毛细血管外肾小球肾炎。这些疾病通常称为抗肾小球基底膜(抗GBM)疾病。患有抗GBM疾病的患者仅具有10%的肾存活机会。古德帕斯彻病是百万人中出现一例的罕见疾病。自身抗体介导的肾脏损害是古德帕斯彻病的主要问题。某些患者也会发生肺出血,然而,由抗GBM抗体造成的肺部损伤不是永久性的,并且相比于肾脏损伤时很少是致命性的。

[0004] 现有对古德帕斯彻病或肾小球肾炎的治疗包括血浆置换法或血浆交换法,这些方法会从血液中消除循环的抗GBM抗体。暴露于血液制品,血肿,输血反应和输血传播疾病的风险是与血浆置换法相关联的主要并发症。其他治疗选项包括给予免疫抑制剂例如皮质类固醇和环磷酰胺,它们被开具用于处理渐进性肾功能衰竭和肺出血。这些药物以非特异性方式抑制免疫反应并且增加患者获得机会性感染的机会。对于抗GBM疾病治疗的现有路线并不能完全控制这种疾病。这种疾病发展至终末期器官功能衰竭会增加死亡风险。

[0005] 类风湿性关节炎(RA)是一种慢性渐进性疾病,影响约1%的世界人口,其通过自身抗体来介导。类似于古德帕斯彻病,RA的特征在于身体对自身抗原的耐受性受损并随后激活免疫反应,导致组织损伤。靶向滑膜,软骨和底层骨关节的自身抗体的产生定义为RA的发病机理。关节变形会导致严重的残疾和生活质量下降。常见的症状包括关节疼痛,僵硬和关节肿胀,运动伤残,肌肉无力,发烧和一般性不适感觉。血液中C-反应蛋白、类风湿因子的水平升高是RA的诊断指标。现有对RA的治疗包括疾病修饰抗风湿药物(DMARD)如羟氯喹,免疫抑制剂如硫唑嘌呤(azathioprine)、皮质类固醇类、选择性COX-2抑制剂、NSAID和用于症状缓解的止痛药。长期使用止痛药,NSAID会引起溃疡和对大多数患者具有较低耐受性而选择性COX-2抑制剂与心脏毒性有关。

[0006] 免疫抑制剂是治疗RA的主要路线。正如前面讨论的,这些药物以非特异性方式抑制免疫反应并且产生危及生命的并发症。生物药,如TNF抑制剂即阿达木单抗、依那西普、英夫利昔单抗等,IL-1受体拮抗剂即阿那白滞素和IL-6受体拮抗剂即托珠单抗,广泛用于治疗RA。这些药物设计成通过起到细胞因子受体拮抗剂作用来影响导致关节发炎和关节损伤的生化途径。生物制品的一个主要缺点是,对于长期使用患者会对这些药物产生耐药性并

且疗效下降。由于毒性分布曲线,这些药物中许多仅推荐用于对其他RA治疗不产生反应的患者。

[0007] 全身性红斑狼疮(系统性红斑狼疮,SLE)是一种多系统自身免疫失调,其基于多种特征(如关节痛,发热,乏力,皮肤损伤,光敏感性,胸部疼痛,脱发,口腔溃疡等)进行临床诊断,并通过在血液中发现自身抗体和在尿液中发现过量血清蛋白来支持。肾功能衰竭是SLE的主要并发症之一。超过50%的SLE患者出现由于抗体在肾小球中沉积导致的肾功能衰竭,并需要肾透析或移植。自身抗体介导的其他并发症包括肺损伤、心损伤,溶血性贫血,血小板减少症,脑功能障碍等。对于SLE的现有治疗选项包括NSAID,抗疟药物,皮质类固醇类和甲氨蝶呤,用于减轻肌肉-骨骼症候和皮肤症候。根据USFDA,对SLE治疗的现有路线具有多种问题,例如不完全控制疾病,向终末期器官功能衰竭发展和衰弱的副作用(Guidance for Industry: Systemic Lupus Erythematosus—Developing Medical Products for Treatment, June 2010)。

[0008] 特发性血小板减少性紫癜(ITP)是由血小板急剧减少所致的出血性疾病。ITP可能是由感染,免疫失调如SLE,某些药物,妊娠等触发的。尽管ITP发病的确切机制尚不清楚,但是ITP主要归咎于由抗血小板抗体损坏血小板,因为50%以上的ITP患者对于血小板相关抗体测试呈阳性(Gernsheimer, 2009)。对于ITP的现有治疗选择包括:(i)药物如皮质类固醇类和静脉注射免疫球蛋白,它们干扰抗体包被血小板的清除;(ii)通过药物如硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢素的非特异性T-细胞免疫抑制;(iii)干扰抗体合成的吗替麦考酚酯和生物制剂如利妥昔单抗;(iv)脾切除术和血浆置换法,它们清除循环的抗血小板抗体;(v)通过输注血小板和骨髓移植等来增加血小板数。所有上述治疗选项都有潜在的副作用,如抑制免疫力,暴露于具有输血反应和/或输血传播疾病及血肿风险的血液产品。

[0009] 由于对自身免疫失调(如古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮,特发性血小板减少性紫癜等)的现有治疗选择具有缺点,为了解决这些慢性的威胁生命的疾病,对于制药公司而言研究和开发具有较低副作用的更加有效的治疗方法是至关重要的。

[0010] 授予Malireddy S.Reddy等人的美国专利号6080401,描述了包含几种草药(其中一种是葫芦巴(*Trigonella foenum-graecum*))的混合物,连同几种益生菌制剂的混合物的组合物,用于治疗多种疾病(即贫血、关节炎、便秘、抑郁症、糖尿病、消化不良、痔疮、肝炎、高血压、阳痿、超重、牙周疾病以及它们的组合)的用途。

[0011] 授予Chaim Lieberman的美国专利号5707631公开了由葫芦巴、丁香果(*Syzygium aromaticum* fruit)、大蒜球茎(*Allium sativum* bulb),锡兰肉桂树皮(*Cinnamom zeylanicum* bark),雪莲木香(*Saussurea costus* root)和续随子芽(*Euphorbia lathyrus* bud)构成的中草药组合物的制剂用于降低胆固醇,治疗关节炎,血压和阿尔茨海默氏病。然而,该专利文献没有公开在本专利中这种组合物在关节炎中的任何作用方面,本领域任何技术人员能够理解和实践的任何证据。

[0012] Chopra等人(2010)最近公开了多草药组合物,其含有葫芦巴(*Trigonella foenum-graecum*) (葫芦巴(*Fenugreek*)) 萃取物连同乳香(*Boswellia serrata*) (乳香(*Salai Guggul*))、亚麻(*Linum usitatissimum*) (亚麻籽(*Flaxseed*)),山茶(*Camellia sinensis*) (绿茶(*Green tea*)),姜黄(*Curcuma longa*) (姜黄(*Turmeric*)),刺蒺藜

(*Tribulus Terrestris*) (刺蒺藜(*Gokshur*)) 和胡椒(*Piper nigrum*) (黑胡椒(*Black pepper*)) 的萃取物, 用于治疗RA。

[0013] Khan等(2011)临床上评价了草药组合物, 其含有黑种草苜蓿(*Nigella sativa*), 催眠睡茄(*Withania somnifera*), 菝葜(*Smilax china*), 芹菜(*Apium graveolens*), 葫芦巴(*Trigonella foenum graecum*), 生姜(*Zingiber officinale*) 和秋水仙(*Colchicum autumnale*), 用于治疗类风湿性关节炎。

[0014] 所有上面讨论的现有技术都公开了包含几种草药的组合物, 并且难以确定葫芦巴对所要求的有益作用做出贡献。

[0015] 葫芦巴(*Trigonella foenum-graecum*) 或葫芦巴(*fenugreek*) 在传统医学中最常用。葫芦巴种子萃取物正研究用于治疗各种疾病, 如糖尿病、痛风、胃溃疡、腹泻、便秘等。Ahmadiani等(2001)研究了葫芦巴的抗炎和解热活性。Vyas等(2008)证明了葫芦巴种子萃取物具有镇痛和抗炎活性。这些研究并没有举例说明或教导对要求的活性具有贡献的葫芦巴种子中的特定组分或化学组成。

[0016] 葫芦巴种子包含许多化学物质, 即生物碱类如葫芦巴碱、龙胆碱、番木瓜碱、胆碱; 氨基酸类如4-羟基异亮氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸; 黄酮类—木犀草素(毛地黄黄酮)、槲皮素(栎皮黄酮)、牡荆素(牡荆葡基黄酮)、异牡荆素(异牡荆葡基黄酮)、荭草素(东方蓼黄素)、异荭草素(异东方蓼黄素)、葫芦巴苷-1、葫芦巴苷-2; 呋喃甾醇皂苷类—葫芦巴糖苷C、*Trigofoenoside*、葫芦巴苷、葫芦巴素B; 螺旋甾烷醇皂苷类—葫芦巴皂苷(*Graecunin*)、葫芦巴肽苷(*Fenugreekine*); 皂苷元(*Sapinogen*)—薯蓣皂苷元、亚莫皂苷元、丝兰皂苷元、利拉皂苷元、惕告吉宁、新惕告吉宁、吉托吉宁、新吉托吉宁、萨尔萨皂苷元、菝葜配基; 花青苷类; 纤维-胶质; 其他酚类组分—葫芦巴香豆精、东莨菪内酯、绿原酸、咖啡酸和对香豆酸; 脂质; 维生素和痕量无机元素。

[0017] 本公开的主要实施方式是含有葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1的组合物, 用于治疗自身免疫失调如古德帕斯彻病, 肾小球肾炎和类风湿性关节炎。本发明的新颖性和创造性在于葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1的独特组合物。葫芦巴糖苷Ib已经报道是葫芦巴种子中存在的许多呋喃甾醇皂苷之一。图1中显示了葫芦巴糖苷Ib的结构。Yoshikawa等(1997)和Murakami等(2000)已经表征了葫芦巴中存在的所有葫芦巴糖苷, 并报道了这些分子的¹³C NMR, ¹H NMR和 $[\alpha]_D$ 数据。葫芦巴糖苷Ia, Ib和XIb是结构异构体, 分子量为906, 具有可比较的NMR数据和不同的 $[\alpha]_D$ 数据。具体异构体的鉴定能够使用酸解法进行实施, 其中葫芦巴糖苷Ia产生新吉托吉宁, 葫芦巴糖苷Ib产生吉托吉宁而葫芦巴糖苷XIb产生L-鼠李糖。

[0018] 许多黄酮苷存在于葫芦巴种子中, 即牡荆素、异牡荆素、荭草素、异荭草素、葫芦巴苷等。这些黄酮类化合物针对各种生理活性(如抗氧化性、抗甲状腺、抗凋亡、抗炎、抗疼痛、抗焦虑等)都已经进行了研究。本公开涉及黄酮苷之一葫芦巴苷-1。葫芦巴苷-1存在于葫芦巴中已经由Wagner等(1973)报道。葫芦巴苷-1的结构如图2所示。其他含有葫芦巴苷-1的植物种类有亚麻(*Linum usitatissimum*)、蒜叶婆罗门参(*Tragopogon porrifolius*) 和小麦(*Triticum aestivum*)。Sato等(2010)已公开了合成葫芦巴苷-1的方法并为合成的和天然获得的葫芦巴苷-1提供了¹³C NMR的对比数据。

发明内容

[0019] 因此,本公开涉及含有葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1,可选地连同至少一种可接受赋形剂的组合物;制备含有葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1可选地连同至少一种赋形剂的组合物的方法,所述方法包括以下操作:a)将葫芦巴种子压成片,b)用溶剂混合物萃取压片的葫芦巴种子接着过滤和浓缩以获得半固体物质,c)溶解所述物质以获得清澈溶液,d)用正丁醇逆流萃取所述清澈溶液以获得包含水层和丁醇层的溶液,e)将所述水层通过离子交换树脂和吸附柱以获得包含所述葫芦巴糖苷Ib和所述葫芦巴苷-1的洗脱液,f)纯化所述洗脱液以获得自由流动粉末和g)可选地加入至少一种赋形剂以获得所述组合物;和治疗自身免疫失调的方法,所述方法包括以下操作:向需要其的受试者给予含有葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1可选地连同至少一种赋形剂的组合物。

附图说明

[0020] 图1显示了葫芦巴糖苷Ib的结构。

[0021] 图2显示了葫芦巴苷-1的结构。

[0022] 图3显示了46%葫芦巴糖苷Ib和6%葫芦巴苷-1的HPLC色谱图。

[0023] 图4显示了76%葫芦巴糖苷Ib和15%葫芦巴苷-1的HPLC色谱图。

[0024] 图5显示了91%葫芦巴糖苷Ib和5%葫芦巴苷-1的HPLC色谱图。

[0025] 图6显示了肾小球肾炎诱导大鼠的肾组织病理学图片;(右侧)GBM对照组;(左侧)GBM+测试组合物(75mg/kg)组:(1)尿液形成的空间;(2)肾小球的损坏;(3)肾小管肿胀;(4)肾小管管型(Tubular cast);(5)细胞浸润;(6)肾小球肾炎的免疫反应。

具体实施方式

[0026] 本公开涉及包含葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1可选地连同至少一种赋形剂的组合物。

[0027] 在本公开的一个实施方式中,所述葫芦巴糖苷Ib浓度范围为约40% (w/w) ~ 约90% (w/w) 而葫芦巴苷-1浓度范围为约1% (w/w) ~ 约20% (w/w)。

[0028] 在本公开的另一个实施方式中,所述葫芦巴糖苷Ib和所述葫芦巴苷-1获自植物葫芦巴。

[0029] 在本公开的又另一个实施方式中,所述赋形剂选自包含以下各项的组中:成粒剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、增甜剂、着色剂、调味剂、包衣剂、增塑剂、防腐剂、悬浮剂、乳化剂、纤维素材料和滚圆剂或它们的任何组合。

[0030] 在本公开的又另一个实施方式中,所述组合物配制成选自包含以下各项的组中的剂型:片剂、胶囊、锭剂、糖锭、粉剂、糖浆、溶液、气溶胶、悬浮液、可分散粉末或颗粒、硬或软凝胶胶囊中的乳液、糖浆类、酏剂、搽剂、油膏、皮肤贴剂、植物剂、营养剂和食品。

[0031] 本公开还涉及制备含有葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1可选地连同至少一种赋形剂的组合物的方法,所述方法包括以下操作:

[0032] a. 将葫芦巴种子压成片;

[0033] b. 用溶剂混合物萃取压片的葫芦巴种子,接着过滤和浓缩以获得半固体物质;

[0034] c. 溶解所述物质以获得清澈溶液;

[0035] d. 用正丁醇逆流萃取所述清澈溶液以获得包含水层和丁醇层的溶液;

[0036] e.将所述水层通过离子交换树脂和吸附柱以获得包含所述葫芦巴糖苷Ib和所述葫芦巴昔-1的洗脱液;

[0037] f.纯化所述洗脱液以获得自由流动的粉末;和

[0038] g.可选地加入至少一种赋形剂以获得所述组合物。

[0039] 在本公开的一个实施方式中,所述种子压片成约1mm~约5mm的尺寸,更具体地2mm的尺寸。

[0040] 在本公开的另一个实施方式中,所述溶剂混合物包含比率约1:1~约9:1更具体地4:1的脂肪醇和水。

[0041] 在本公开的又一个实施方式中,所述脂肪醇选自包含以下各项的组中:甲醇,乙醇,丙醇和异丙醇或它们的任何组合。

[0042] 在本公开的又一个实施方式中,所述物质溶解于去离子水中。

[0043] 在本公开的又一个实施方式中,进行所述纯化以获得具有约90%~约95%纯度的所述葫芦巴糖苷Ib和具有约90%~约95%纯度的所述葫芦巴昔-1。

[0044] 在本公开的又一个实施方式中,所述纯化包括以下步骤:缓冲剂处理接着醇或酸处理和浓缩以获得纯化的自由流动的粉末。

[0045] 在本公开的又一个实施方式中,所述浓缩在约40°C~约80°C,更具体地约50°C的温度下实施。

[0046] 在本公开的又一个实施方式中,所述组合物含有浓度范围为约40%(w/w)~约90%(w/w)的所述葫芦巴糖苷Ib和浓度范围为约1%(w/w)~约20%(w/w)的所述葫芦巴昔-1。

[0047] 在本公开的又一个实施方式中,所述赋形剂选自包含以下各项的组中:成粒剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、增甜剂、着色剂、调味剂、包衣剂、增塑剂、防腐剂、悬浮剂、乳化剂、纤维素材料和滚圆剂或它们的任何组合。

[0048] 本公开还涉及治疗自身免疫失调的方法,所述方法包括以下操作:向需要其的受试者给予含有葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1可选地连同至少一种赋形剂的组合物。

[0049] 在本公开的一个实施方式中,所述自身免疫失调选自包含以下各项的组中:古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮(系统性红斑狼疮)和特发性血小板减少性紫癜。

[0050] 在本公开的另一个实施方式中,所述受试者是动物或人类。

[0051] 在本公开的又一个实施方式中,所述组合物给药的日剂量范围为在动物中约1mg/kg~约100mg/kg而在人类中约1mg/kg~约50mg/kg。

[0052] 本公开还涉及含有40%~90%(w/w)葫芦巴糖苷Ib和1%~20%(w/w)葫芦巴昔-1的组合物通过防止自身抗体介导的器官损伤来治疗古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮和特发性血小板减少性紫癜的用途。获得包含由葫芦巴种子获得的葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1的特定组合物的方法在本领域内还是未知的。本公开中公开的方法的独特性在于具体地包含葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1的组合物的萃取。进行另外纯化以获得90%~95%的纯化葫芦巴糖苷Ib和95%纯的葫芦巴昔-1用于所述组合物的结构表征和标准化。

[0053] 在本公开的另一个实施方式中,葫芦巴糖苷Ib具有的分子量为906而化学式为C₄₄H₇₄O₁₉。

[0054] 在本公开的又一个实施方式中,葫芦巴昔-1具有的分子量为564而化学式为 $C_{26}H_{28}O_{14}$ 。

[0055] 在本公开的又一个实施方式中,所述组合物获自植物葫芦巴。

[0056] 在本公开的另一个实施方式中,所述组合物为选自包含以下各项的组中的形式:片剂、胶囊、锭剂、糖锭、粉剂、糖浆、溶液、气溶胶、悬浮液、可分散粉末或颗粒、硬或软凝胶胶囊中的乳液、糖浆类、酞剂、搽剂、油膏、皮肤贴剂、植物剂、营养剂和食品。

[0057] 本公开还涉及从葫芦巴中萃取和纯化含有葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1的组合物的方法,所述处理步骤包括以下各项:

[0058] a. 通过脱脂和去除含氮化合物如生物碱、氨基酸来萃取清澈溶液;和

[0059] b. 将清澈溶液通过阳离子交换大孔树脂和吸附柱以洗脱葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1;浓缩洗脱液和进一步纯化。

[0060] 在本公开的一个实施方式中,所述组合物范围为40%~90% (w/w) 的葫芦巴糖苷Ib和1%~20% (w/w) 的葫芦巴昔-1。

[0061] 在本公开的另一个实施方式中,由于葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1是由葫芦巴种子萃取的,这暗示所述组合物可以包括含有有如从HPLC结果可见的较小比例的来自葫芦巴种子的有益分子的纤维素材料。(图3-5)

[0062] 在本公开的另一个实施方式中,步骤(a)中从葫芦巴萃取清澈溶液由以下步骤组成:

[0063] i. 将葫芦巴种子压成片;

[0064] ii. 用溶剂萃取压片的种子;

[0065] iii. 过滤萃取物以获得清澈溶液;

[0066] iv. 真空下浓缩清澈溶液以获得半固体物质;

[0067] v. 溶解浓缩的物质以获得清澈溶液;

[0068] vi. 用正丁醇逆流萃取清澈溶液以去除脂肪性物质;

[0069] 在本公开的一个实施方式中,步骤(b)中所用的溶剂是水和选自包含甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇的组中的醇的混合物,比率为1:1~9:1且优选4:1。

[0070] 在本公开的又一个实施方式中,进行所述萃取约8~12h且优选约10h。

[0071] 在本公开的又一个实施方式中,所述萃取在约30°C~约40°C,且优选约35°C的温度下实施。

[0072] 在本公开的又一个实施方式中,所述萃取物在真空下在约45°C~约55°C且优选约50°C的温度下进行浓缩。

[0073] 在本公开的又一个实施方式中,所述浓缩的物质溶解于去离子水中。

[0074] 在本公开的另一个实施方式中,含有葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1的组合物采用以下步骤由步骤(b)的所述清澈溶液获得:

[0075] i. 将清澈水层通过阳离子交换大孔树脂和吸附柱以洗脱葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1;

[0076] ii. 浓缩洗脱液并喷雾干燥。

[0077] 在本公开的又一个实施方式中,所述吸附柱选自包含以下各项的组中:酸性阳离子交换大孔树脂,Sephadex LH-20,Dowex Optipore L493或它们的等效物。

[0078] 在本公开的又一个实施方式中,吸附柱的洗脱采用水和乙醇以初始比率30:70接着变换至5:95的比率进行实施。

[0079] 在本公开的又一个实施方式中,吸附柱的洗脱持续约1~约4h,优选约2h。

[0080] 在本公开的又一个实施方式中,所述浓缩的物质在约110℃~约130℃,优选约120℃下喷雾干燥。

[0081] 本公开的又一实施方式涉及纯化葫芦巴糖苷Ib的方法,所述处理步骤包括以下各项:

[0082] i.将浓缩的洗脱液溶解于缓冲液中并滤除不溶物质;

[0083] ii.用正丁醇冲洗缓冲溶液;

[0084] iii.浓缩正丁醇部分;

[0085] iv.将浓缩部分重新溶解于溶剂中;和

[0086] v.将所得的溶液通过吸附柱。

[0087] 在本公开的又一个实施方式中,所述缓冲溶液选自包括磷酸二氢钾和盐酸的组。

[0088] 在本公开的又一个实施方式中,用于重新溶解的溶剂是乙醇。

[0089] 本公开的又一实施方式涉及从包含其他黄酮苷的正丁醇层中纯化葫芦巴苷-1的方法,所述处理步骤包括以下各项:

[0090] i.真空下浓缩;

[0091] ii.用缓冲溶液冲洗浓缩液以除去不溶物质;

[0092] iii.浓缩所得的溶液至一半体积并搅拌;

[0093] iv.过滤以移出不纯晶体;和

[0094] v.用溶剂回流不纯晶体并过滤以获得95%纯的葫芦巴苷-1。

[0095] 在本公开的又一个实施方式中,浓缩物质的搅拌持续1~48h,优选24h。

[0096] 在本公开的又一个实施方式中,浓缩物质的搅拌在30~40℃,优选35℃下进行。

[0097] 在本公开的又一个实施方式中,用于回流的溶剂是1:1比率范围的甲醇和二氯甲烷。

[0098] 本公开还涉及生产包含40~90% (w/w) 葫芦巴糖苷Ib和1~20% (w/w) 葫芦巴苷-1可选地连同至少一种赋形剂的组合物的药物的方法和给予有效量的所述组合物用于治疗和处理选自包含以下各项的组中的自身免疫疾病的方法:古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮和特发性血小板减少性紫癜。

[0099] 本公开还涉及治疗和处理选自包含以下各项的组中的自身免疫性疾病的方法:古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮和特发性血小板减少性紫癜。

[0100] 在本公开的一个实施方式中,所述受试者选自包括动物和人类的组中。

[0101] 本公开利用以下实施例进行进一步阐述。然而,这些实施例不应该解释为限制本发明的范围。

[0102] 实施例1:

[0103] 1000g葫芦巴种子(具有小于5%含水量),在滚筒压片机中压片成2mm厚度。所述压片的物质在包含比率为80:20的乙醇和水的溶剂混合物(8L)中萃取,并通过再循环所述洗脱液在40℃下通过所述层持续10h。10h后,萃取物通过200目网布过滤,得到清澈溶液。所述

清澈溶液在真空下在50℃下浓缩成半固体物质。将所述浓缩的物质溶解于5L去离子水中，得到清澈溶液。清澈水溶液经过正丁醇逆流萃取。清澈的水层通过含有200mL强酸性阳离子交换大孔树脂的柱子持续2h。不含所有氨基酸、蛋白质、葫芦巴碱和其他两性化合物的清澈柱流出液在50℃下浓缩并在120℃下喷雾干燥以获得自由流动粉末，其组成为约40%~46% (w/w)的 葫芦巴糖苷Ib和1%~6% (w/w)的葫芦巴苷-1。组成范围的变化归因于季节性变化。所述收率为约60g。在以下条件下进行HPLC分析：柱子—250mm长，4.6mm直径的Kromasil C18RP5 μ m；流动相—水：乙腈梯度持续20min从75：25至65：35，流速—1mL/min；检测波长—210nm UV。如图3可见的HPLC输出显示，葫芦巴糖苷Ib峰在2.2min处而葫芦巴苷-1峰在3.2min处。通过外标法采用获自实施例4的葫芦巴糖苷Ib和获自实施例5的葫芦巴苷-1的纯化样品来构成所述组合物。

[0104] 实施例2：

[0105] 1000g葫芦巴种子(具有小于5%的含水量)，在滚筒压片机中压片成2mm厚度。所述压片的物质在包含比率为70：30的异丙醇和水的溶剂混合物(8L)中萃取，并通过再循环所述洗脱液在35℃下通过所述层持续10h。10h后，萃取物通过200目网布过滤，得到清澈溶液。所述清澈溶液在真空下在50℃下浓缩成半固体物质。将所述浓缩的物质溶解于5L去离子水中，得到清澈溶液。清澈水溶液经过正丁醇逆流萃取。清澈的水层通过含有200mL的强酸性阳离子交换大孔树脂的柱子持续2h。不含所有氨基酸、蛋白质、葫芦巴碱和其他两性化合物的清澈柱流出液在2h内再次通过含有Dowex Optipore L493或其等效物的树脂床并通过包括甲苯：乙酸乙酯：甲醇：水比率为6：3：6：1的薄层色谱系统来监控所述吸附过程。当洗脱过程采用95%乙醇时，由薄层色谱系统监控的生物活性化合物开始洗脱。收集这些馏分，筛选并汇集在一起并在50℃下浓缩成55%~65% (w/w)的葫芦巴糖苷Ib和8%~12% (w/w)的葫芦巴苷-1。组成范围的变化归因于季节性变化。收率为约15g。按照实施例1中所述的方法进行HPLC分析。通过外标法采用获自实施例4的葫芦巴糖苷Ib和获自实施例5的葫芦巴苷-1的纯化样品来构成所述组合物。

[0106] 实施例3：

[0107] 1000g葫芦巴种子(具有小于5%的含水量)，在滚筒压片机中压片成2mm厚度。所述压片的物质在包含比率为80：20的乙醇和水的溶剂混合物(8L)中萃取，并通过再循环所述洗脱液在35℃下通过所述层持续10h。10h后，萃取物通过200目网布过滤，得到清澈溶液。所述清澈溶液在真空下在50℃下浓缩成半固体物质。将所述浓缩的物质溶解于5L去离子水中，得到清澈溶液。清澈水溶液经过正丁醇逆流萃取。清澈的水层通过含有200mL的强酸性阳离子交换大孔树脂的柱子持续2h。不含所有氨基酸、蛋白质、葫芦巴碱和其他两性化合物的清澈柱流出液在2h内再次通过含有Dowex Optipore L493或其等效物的树脂床并通过包括甲苯：乙酸乙酯：甲醇：水比率为6：3：6：1的薄层色谱系统来监控所述吸附过程。当洗脱过程采用70：30的乙醇：水混合物时，由薄层色谱系统监控的生物活性化合物开始洗脱。收集这些馏分，筛选并且汇集在一起并在50℃下浓缩成70%~76% (w/w)的葫芦巴糖苷Ib和15%~18% (w/w)的葫芦巴苷-1。组成范围的变化归因于季节性变化。收率为约9g。按照实施例1中所述的方法进行HPLC分析并且在图4中显示输出色谱图。通过外标法采用获自实施例4的葫芦巴糖苷Ib和获自实施例5的葫芦巴苷-1的纯化样品来构成所述组合物。

[0108] 葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴苷-1的纯标准品不能由参照标准品供应商获得。因此，为

了结构说明和标准化组合物的目的,进行实施例4和实施例5以分别分离出葫芦巴糖苷IB和葫芦巴苷-1的纯化样品。

[0109] 实施例4:

[0110] 将来自实施例1-3的所述组合物溶解于50mM磷酸二氢钾缓冲液(300mL)中,并滤出不溶物质。所述缓冲溶液用正丁醇(75mL×3)洗涤三次并且所有三个流分独立地浓缩。流分1、2和3显示葫芦巴糖苷Ib纯度分别为85%,68%和40%。所述85%纯粉末化葫芦巴糖苷Ib为约10%的起始重量,将其再溶解于乙醇中并通过Sephadex LH-20床,床体积125mL,收集所述流分并针对纯葫芦巴糖苷Ib进行筛选。所述纯葫芦巴糖苷Ib流分浓缩获得约90%~95%的面积纯度,其适宜进行结构表征。收率约为灰白色结晶粉末起始重量的0.2%。按照实施例1中所述的方法进行HPLC分析,并且输出色谱图如图5中所示。

[0111] 熔点为220℃,且LCMS分析证实质量为906(M+Na=929)。呋喃甾醇皂苷结构的存在通过薄层色谱法(TLC)采用甲苯:乙酸乙酯:甲醇:水比率为6:3:6:1,接着5%茴香醛硫酸喷雾并在110℃下加热15min显示绿褐色单一斑点来验证。在CD₃OD(100Mhz)中¹³C NMR分析:δ_c(ppm)44.43(C-1),71.6(C-2),85.8(C-3),34.9(C-4),44.4(C-5),28.4(C-6),30.78(C-7),34.1(C-8),51.7(C-9),36.9(C-10),22.0(C-11),39.6(C-12),41.8(C-13),57.8(C-14),32.8(C-15),82.4(C-16),65.06(C-17),16.9(C-18),12.08(C-19),40.8(C-20),16.3(C-21),114.0(C-22),38.5(C-23),28.9(C-24),34.9(C-25),76.0(C-26),17.6(C-27);葡萄糖-I:102.35(C-1'),75.1(C-2'),79.3(C-3'),73.7(C-4'),77.0(C-5'),70.6(C-6');木糖:104.57(C-1''),76.05(C-2''),78.08(C-3''),72.4(C-4''),67.0(C-5'');葡萄糖-II:103.0(C-1'''),76.5(C-2'''),79.7(C-3'''),72.1(C-4'''),82.43(C-5'''),62.8(C-6''');在CD₃OD中¹H NMR分析:0.744(19-H₃),0.869(18-H₃),0.959(27-H₃),1.05(5-H),1.51(21-H₃),2.06(25-H),2.206(20-H),3.48,4.05(26-H₂),3.699(3-H),4.14(2-H),4.04,5.1(6'-H₂);[α]_D²⁴(c=0.37,吡啶):-41.9°。

[0112] 实施例5:

[0113] 约8000mL包含来自实施例1~3的其他黄酮苷的正丁醇层在50℃下使用真空蒸发器浓缩至400mL。该溶液用50mM磷酸二氢钾溶液洗涤两次接着500mL1%盐酸水溶液。在这个阶段,不溶物质析出为黄色无定形粉末。将上述溶液浓缩至一半体积,并在30~35℃下搅拌24h以使其他黄酮苷的更多晶体析出并过滤。该不纯晶体在甲醇和二氯甲烷1:1混合物中在15℃下回流3h,并在5℃下过滤以获得95%的纯葫芦巴苷-1。收率为约1.8g。

[0114] 熔点为215℃,发生分解,LCMS分析证实质量为564(M+H=565)。黄酮苷结构的存在进一步通过薄层色谱法(TLC)采用甲苯:乙酸乙酯:甲醇:水比率为6:3:6:1,接着5%甲醇硫酸喷雾并在110℃下加热15min显示黄色单一斑点来验证。在CD₃OD(100Mhz)中¹³C NMR分析:δ_c(ppm)164.57(C-2),103.05(C-3),182.7(C-4),161.4(C-5),108.55(C-6),158.7(C-7),104.1(C-8),155.5(C-9),103.1(C-10),122.0(C-1'),129.2(C-2'),116.45(C-3'),161.6(C-4'),116.29(C-5'),129.1(C-6');木糖:74.6(C-1''),70.5(C-2''),79.3(C-3''),70.7(C-4''),68.9(C-5'');葡萄糖:71.76(C-1'''),70.99(C-2'''),79.67(C-3'''),70.05(C-4'''),82.35(C-5'''),61.6(C-6'');在DMSO-d₆(在25℃下)中¹H NMR分析:对应于黄酮质子环的芳香族质子-[6.79,6.8;7.936,7.949;6.897,6.951;8.0,8.031],糖质子-6-C-木糖苷处于3.09~4.65之间而8-C-葡萄糖苷处于3.29~4.77之间。

[0115] 实施例6:

[0116] 在本公开的一个实施方式中,1g76%葫芦巴糖苷Ib和15%葫芦巴昔-1与14g91%葫芦巴糖苷Ib和5%葫芦巴昔-1混合以获得包含15g90%葫芦巴糖苷Ib和5.7%葫芦巴昔-1的组合物。该实施例显示,通过混合具有不同浓度的所述组分不同组合物得到包含40%~90%(w/w)葫芦巴糖苷Ib和1%~20%(w/w)葫芦巴昔-1的希望的组合物的方法。本领域技术人员应该理解到,通过混合可以通过从植物来源萃取得到或通过所述组分的化学合成得到的组分,葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1,可以获得本文中获得的组合物。因此,葫芦巴并不是获得所述组合物的唯一来源。它可以通过混合合成的组分,葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1,而获得。

[0117] 此外,所述组合物还可以通过混合组分,葫芦巴糖苷Ib和葫芦巴昔-1(如本公开中描述的实施例中获得的),而获得。

[0118] 在以下实施例中针对生理活性进一步测试包含由上述实施例中指定方法中获得的40%~90%(w/w)葫芦巴糖苷Ib和1%~20%(w/w)葫芦巴昔-1的测试组合物:

[0119] 实施例7:肾小球肾炎诱导大鼠中的活性

[0120] 肾小球肾炎是肾功能衰竭和自身免疫性疾病如古德帕斯彻病中死亡的一个主要原因。进行这项研究是为了检测包含76%(w/w)葫芦巴糖苷Ib和15%(w/w)葫芦巴昔-1的测试组合物在抗-GBM诱导的新月体性肾小球肾炎的大鼠模型中的疗效。

[0121] 雄性Wistar大鼠体重180~220g,分成几个小组,每组6只动物。肾小球肾炎按照Chen等人(2004)的指示进行诱导:通过皮下给予处于弗氏完全佐剂(FCA)中的大鼠IgG(5mg),接着5天后静脉内给予GBM(0.5mL)。治疗组中的动物接受所述测试组合物(75mg/kg),每日口服两次持续28天。在GBM对照组中的动物没有接受任何治疗。没有诱导肾小球肾炎和治疗的第三组动物作为正常对照来保持。在诱导肾小球肾炎之前和完成治疗之后测定和分析尿排出量。在第28天,将这些动物处死以对其肾脏和肺进行组织病理学检测。

[0122] 表1:在肾小球肾炎诱导大鼠中对每日尿蛋白排出的影响(以mg/天计,MEAN±SEM)

[0123]

治疗时间	正常对照	GBM 对照	GBM + 测试组合物 (75 mg/kg)
基线	6.08±1.34	8.18±0.46	5.55±0.48
第28天	5.48±1.1	20.35±2.66 ^{####}	7.11±0.62 ^{***}

[0124] n=5;通过双因素ANOVA(Two-way ANOVA)接着进行邦弗朗尼(Bonferroni)事后检验分析的数据;####P<0.001针对相应的天数与正常对照组相比较;***P<0.001针对相应的天数与GBM对照组相比较。

[0125] 第28天在GBM对照组中动物每天排出的尿蛋白(mg/天)自基线值增加了三倍以上。尿蛋白排出量增加是肾功能下降的指标。采用测试药物的治疗将尿蛋白排出完全标准化,维持其接近基线值。

[0126] 表2:在第28天肾脏的组织病理学检测

[0127]

参数	正常对照	GBM 对照	GBM + 测试组合物 (75 mg/kg)
肾小球损坏	--	+++	+
肾小管肿胀	--	+++	+
肾小管管型	--	+++	--
细胞浸润	--	+++	+

[0128] 病理分级:严重(+++),中度(++),轻度(+);不存在(-)

[0129] 肾小球肾炎诱导大鼠的肾脏组织病理学图像如图6所示。用测试组合物治疗的动物显示出当相比于GBM对照组时,不存在肾小管管型以及显著减少的肾小球损坏,肾小管肿胀和细胞浸润。因此,通过采用测试组合物治疗显著降低了病理状况。

[0130] 表3:第28天肺部的组织病理学检查

[0131]

参数	正常对照	GBM 对照	GBM + 测试组合物 (75 mg/kg)
间质增厚	--	+++	+
淋巴细胞, 巨噬细胞和单核细胞浸润到间质中	--	+++	+
RBC 外渗进入间质中	--	+++	--
肺泡壁增厚	--	++	+
肺泡间隔弦长增加	--	++	--

[0132] 病理分级:严重(+++),中度(++),轻度(+);不存在(-)

[0133] 抗GBM抗体对肺部中肺泡基底膜的病理学作用也进行了检测。在GBM对照组中动物肺部组织病理学检测显示肺泡壁厚度显著增加,肺泡间隔弦长增加以及肺间质增厚,重度炎症,如通过淋巴细胞、巨噬细胞和单核细胞浸润进入间质,以及RBC显著外渗进入间质证明的。用测试组合物治疗的动物表现出所有上述病理学状况显著降低,表明所述测试组合物在防止抗体对肺损伤中具有有益活性。

[0134] 所述测试组合物有效地降低了抗-GBM抗体引起的肾脏和肺部损伤,证实在古德帕斯彻病中具有活性,这通过患有肾小球肾炎和肺出血的患者进行表征。因此,所述测试组合物用于治疗抗-GBM疾病,如肾小球肾炎,古德帕斯彻病等。

[0135] 实施例8:测试组合物的抗炎活性

[0136] 进行该测试是为了评价包含65% (w/w) 葫芦巴糖苷Ib和10% (w/w) 葫芦巴苷-1的测试组合物抑制前列腺素类引起的炎症的活性。雄性Wistar大鼠,体重180~220g,采用测试组合物进行预处理。预处理1h后,向右后爪足底注射0.1mL1%角叉藻聚糖溶液。用器官充满意度测量器(UGO Basile 7140)测定诱导的足跖肿胀。在第3h时足跖肿胀的抑制作用显示了抗炎作用。

[0137] 足跖肿胀的抑制作用以相对于测试组合物治疗组,对照组的爪体积平均值的百分比差异进行计算。角叉藻聚糖诱导的足跖肿胀在第2和第3小时之后被所述测试组合物显著降低。

[0138] 表4:角叉藻聚糖诱导足跖肿胀的百分比抑制

[0139]

角叉藻聚糖注射后的时间	剂量	2h 后足跖肿胀的%抑制	3h 后足跖肿胀的%抑制
正常对照	-	-	-
测试组合物	5 mg/kg	41.56 [*]	40.49 ^{***}
	10 mg/kg	49.74 ^{**}	36.05 ^{**}
	25 mg/kg	77.76 ^{***}	63.72 ^{***}

[0140] n=6;通过双因素ANOVA (Two-way ANOVA)接着进行邦弗朗尼 (Bonferroni) 事后检验分析的数据;***P<0.001,**P<0.01和*P<0.05,针对对应的小时数与正常对照组相比较。

[0141] 实施例9:测试组合物的体外细胞因子抑制

[0142] 脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性菌的组分,其能够诱导一氧化氮过量生产,这进而又刺激细胞因子分泌。用LPS刺激人外周血单核细胞 (PBMC) 系统,用于表达IL-1 β , IL-6和TNF- α 。所述测试组合物抑制这些促炎性细胞因子释放的活性进行了测试。所述测试组合物显示对促炎性细胞因子的分泌具有显著的抑制活性。

[0143] 表5:细胞因子抑制的EC₅₀值 (μ g/mL)

[0144]

	含有 76%葫芦巴糖苷 Ib 和 15%葫芦巴糖苷-1 的测试组合物	含有 46%葫芦巴糖苷 Ib 和 5%葫芦巴糖苷-1 的测试组合物
IL-1 β	94	211
IL-6	95	42
TNF- α	58	133

[0145] 实施例10:测试组合物的抗关节炎作用

[0146] 抗关节炎活性通过在大鼠足跖注射弗氏完全佐剂 (FCA) 并测量未注射爪中爪体积的水肿形成和百分比抑制来进行研究。

[0147] 雄性Wistar大鼠,体重190~250g,用0.1mL FCA注射到左后爪的足底区域。0.1mL FCA溶液由悬浮于重石蜡油 (Merck) 中的6mg完全级分的丁酸分枝杆菌 (Mycobacterium Butyrium) (Difco) 组成。几个小时后产生局部水肿。注射FCA之后从第13天到第21天进行测试化合物的治疗。使用器官充满度测量器 (UGO Basile 7140) 来记录未注射后肢的体积。

[0148] 未注射爪的发炎的百分比抑制测定为相对于所治疗动物,FCA对照组的平均爪体积的差异。在用测试组合物开始治疗之后5天 (第18天) 和8天 (第21天) 都观察到由FCA诱导的关节肿胀显著减少。测试组合物显示关节炎降低近80%。

[0149] 表6:FCA诱导关节炎的百分比降低

[0150]

治疗组	剂量	第 18 天	第 21 天
正常对照	-	-	-

[0151]

塞来昔布	10 mg/kg	58.97±35.93 ^{***}	81.24±22.35 ^{***}
含 46%葫芦巴糖苷 Ib 和 5% 葫芦巴苷-1 的测试组合物	50 mg/kg	19.78±45.01	41.63±18.64
	100 mg/kg	9.06±32.89	78.47±22.55 ^{***}
	200 mg/kg	17.93±44.05	39.81±18.76
含 76%葫芦巴糖苷 Ib 和 15% 葫芦巴苷-1 的测试组合物	10 mg/kg	53.86±8.8 ^{***}	49.27±8.69 ^{***}
	25 mg/kg	49.36±12.27 ^{***}	57.59±9.37 ^{***}
	50 mg/kg	57.56±10.12 ^{***}	80.25±10.59 ^{***}

[0152] n=6;通过双因素ANOVA (Two-way ANOVA)接着进行邦弗朗尼 (Bonferroni) 事后检验分析的数据;[#]P<0.01针对相应的天数与正常对照组相比较;***P<0.001针对相应的天数与FCA对照组相比较。

[0153] 实施例11:测试组合物在类风湿性关节炎患者中的无对照研究

[0154] 一项前瞻性研究在5个年龄在45-60岁之间的类风湿性关节炎 (RA) 患者中实施。这些患者以500mg剂量每日两次给予测试组合物胶囊持续1年,并且所述测试组合物的疗效基于由Kumar等出版的《健康评估问卷》(Health Assessment Questionnaire) (HAQ) (Rheumatology, Vol. 41, pp. 1457-1459, 2002) 中患者报告结果进行分析。

[0155] 表7:患者报告的类风湿性关节炎健康状况评估问卷

[0156]

日常生活的活动	患者 1		患者 2		患者 3		患者 4		患者 5	
	之前	之后	之前	之后	之前	之后	之前	之后	之前	之后
是否自己着装, 包括系上纱丽服/宽松裤/腰布/睡衣裤和扣上纽扣?	1	0	2	1	3	1	3	2	2	1
上下床无碍?	1	0	3	2	3	1	3	2	2	1
能否向你的嘴举起一满茶杯或玻璃杯?	1	0	2	1	2	1	3	2	1	0
能否在平坦地面上户外行走?	1	0	2	1	3	1	3	2	2	1
能够洗净和擦干你整个身体?	1	0	2	1	2	1	3	2	2	1
能否蹲厕所或在地板上盘坐?	2	1	3	2	3	2	3	3	3	2
能否弯腰从地上捡起衣服?	2	1	3	2	3	2	3	3	2	1
能否开关水龙头?	1	0	2	1	2	1	3	2	2	1

[0157]

能否上下车辆—机动人力车或汽车?	1	1	3	2	3	1	3	2	2	1
能否步行 3km?	2	1	3	3	3	2	3	2	3	2
能否菜市场购物?	0	0	1	1	3	1	3	2	2	1
能否爬 程楼梯?	2	1	3	2	3	2	3	3	2	2
残疾评分	$\frac{1.2}{5}$	0.42	2.42	1.58	2.75	1.33	3.0	2.25	2.08	1.17

[0158] 评分(0-3):0-没有任何困难;1-有一定的难度;2-有较大困难;3-无法做到。

[0159] 残疾评分计算为所有分数总和除以12。

[0160] 在开始用测试组合物治疗之前和治疗1年后无对照研究患者的个人健康评价得分提供于表7中。残疾评分计算为所有得分总和除以12。所有患者显示残疾评分改善。在研究开始时,4/5的患者为重度残疾,得分范围为2~3。经过12个月的测试组合物治疗之后,5个患者中只有1个仍然处于严重残疾,评分范围为2~3。在日常活动中看到显著改善并且患者对所述测试组合物具有超过90%的依从性。因此,发现所述测试组合物在治疗诊断患有类风湿性关节炎的患者中是安全和有用的。

[0161] 实施例12:测试组合物的制剂

[0162] 实施例11中的胶囊通过以下制备:通过与1.5%w/w的微结晶纤维素,1%w/w预凝胶化淀粉崩解剂,0.5%w/w交聚维酮和0.5%w/w硬脂酸镁抗粘着剂共混通过将包含76%(w/w)葫芦巴糖苷Ib和15%(w/w)葫芦巴苷-1的测试组合物造粒。将掺混的颗粒填充于胶囊中。

[0163] 含有40%~90%(w/w)葫芦巴糖苷Ib和1%~20%(w/w)葫芦巴苷-1的测试组合物的类似制剂可以通过加入选自包含以下物质的列表的赋形剂而制成:成粒剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、增甜剂、着色剂、调味剂、包衣剂、增塑剂、防腐剂、悬浮剂、乳化剂、滚圆剂以及它们的任何组合。而这种制剂类型可以选自由以下组成的组中:片剂、胶囊、锭剂、糖锭、粉剂、糖浆、溶液、气溶胶、悬浮液、可分散粉末或颗粒、硬或软凝胶胶 囊中的乳液、糖浆类、酞剂、搽剂、油膏、皮肤贴剂、植物剂、营养剂和食品。根据给药途径,可以使用不同的赋形剂/载体。本领域技术人员可以选择所述测试组合物的合适制剂,用于治疗自动免疫疾病即古德帕斯彻病,肾小球肾炎,类风湿性关节炎,全身性红斑狼疮和特发性血小板减少性紫癜。

[0164] 实施例13:全身性红斑狼疮(SLE)患者中的无对照研究

[0165] 在3个年龄35~50岁诊断患有全身性红斑狼疮(SLE)的患者中进行了为期6个月的前瞻性研究。如实施例12中所述的测试组合物制剂,以每日两次两个500mg胶囊的剂量给药。所述测试组合物的活性通过跟踪实验室参数和日常活动指数进行监测。

[0166] 采用测试组合物的治疗显著改善了肾功能,血液参数以及降低了关节疼痛,脱发,皮疹和口腔溃疡。这些结果通过患者1从开始治疗时的20分至治疗结束时的10分的SLE每日活动指数(SLEDAI)评分改善来支持。类似地在经过6个月的治疗后对于患者2观察到从10分至6分的改善而对于患者3为从12分至8分的改善。因此,发现所述测试组合物适用于治疗和处理SLE。

[0167] 实施例14:测试组合物针对特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 的活性

[0168] Balb-c小鼠检查基线血小板数处于生理范围内,并分为3个组。特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 通过向ITP对照组和测试组合物治疗组中的动物腹膜内注射4 μ g大鼠抗小鼠整合蛋白 α_{IIb} 抗体来诱导。治疗组中的动物在ITP诱导之前1h接受75mg/kg含有76% (w/w) 葫芦巴糖苷Ib和15% (w/w) 葫芦巴苷-1的测试组合物。正常对照组中的动物既不用ITP诱导也不接受任何治疗。ITP诱导之后3h,从所有组中的动物抽血以分析血小板数。

[0169] 表8:测试组合物对血小板数的影响

[0170]

治疗组	血小板数百分比降低
正常对照	22%
ITP对照	60%
测试组合物 (75mg/kg)+ITP	16.5%

[0171] 在给予抗血小板抗体之后相比于ITP对照动物中60%,用所述测试组合物治疗的动物显示显著较低的血小板降低(仅16.5%)。正常对照动物也显示出22%的血小板降低。这种降低归因于随后抽血用于分析血小板数。

[0172] 上述实施例证实,所述测试组合物能够有效对抗抗体介导血小板数降低,因此适用于治疗和处理ITP和/或血小板减少症。

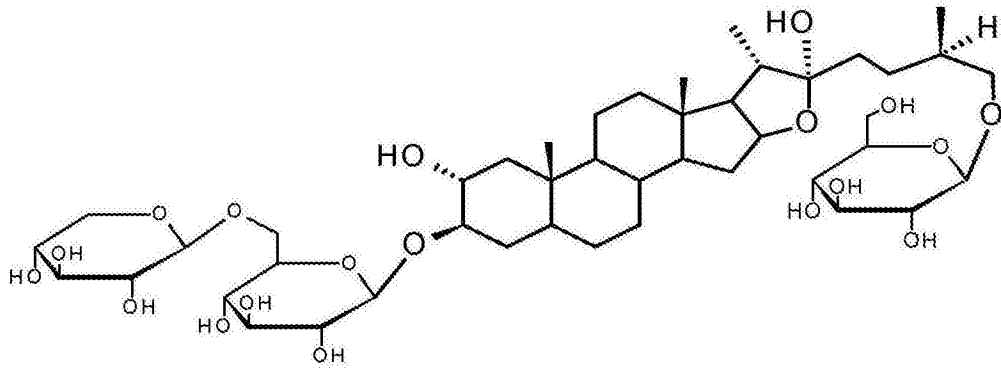


图1

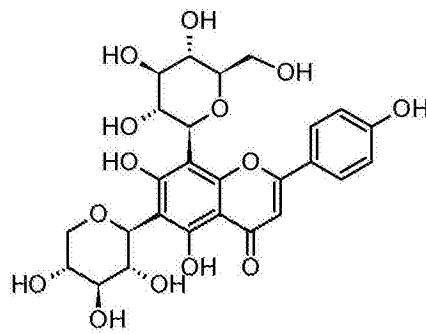


图2

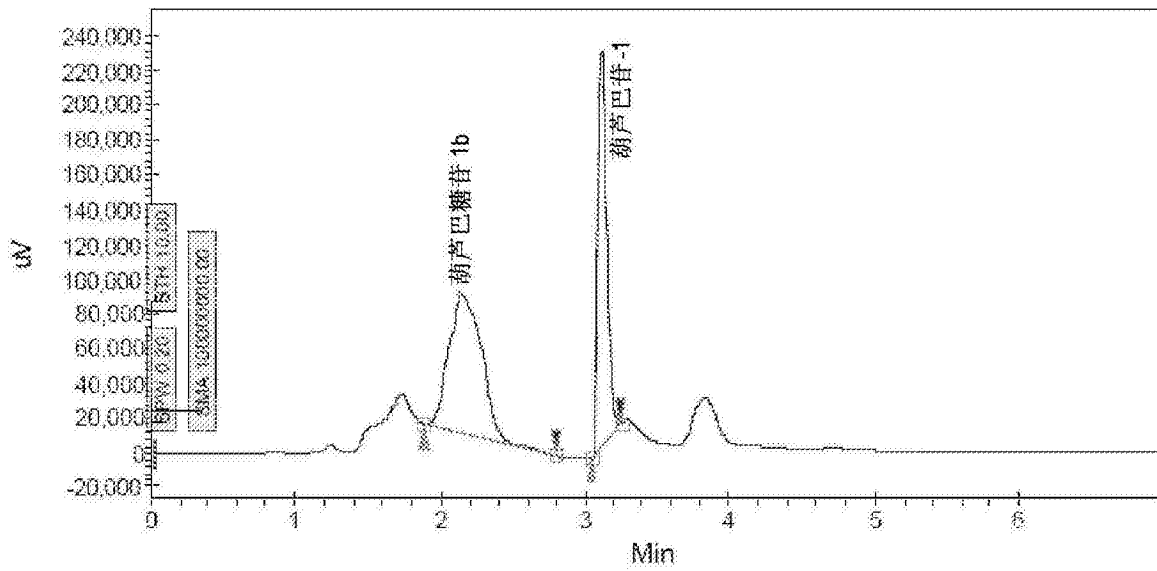


图3

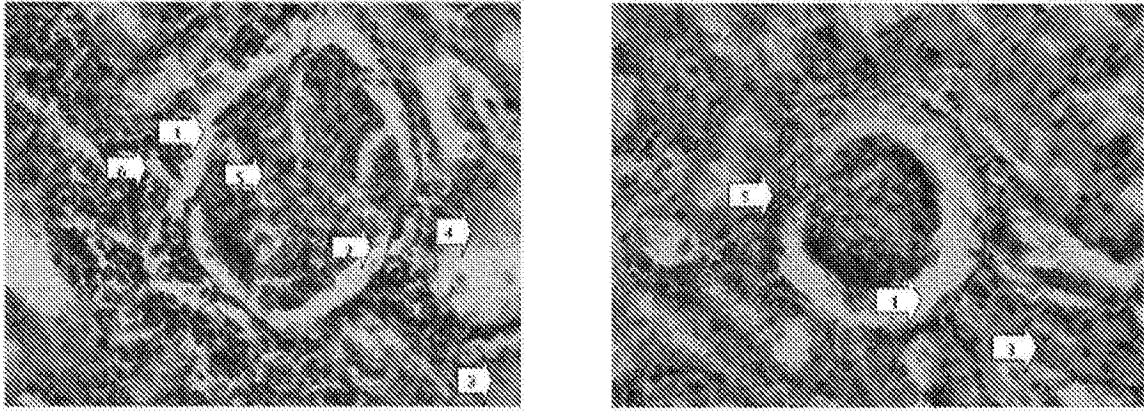


图6