



REPUBLIKA SLOVENIJA

Urad RS za varstvo industrijske lastnine

(10) **SI 9200138 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **9200138**

(51) MPK⁵: **A61K 35/78 , C07G 5/00**

(22) Datum prijave: **08.07.1992**

(45) Datum objave: **31.03.1993**

(30) Prednost: **09.07.1991 DE 4122706**

(72) Izumitelj: **SCHNEIDER WERNER, D-5400 Koblenz, DE;
ELSTNER F. ERICH, D-8031 Groebenzell, DE;
KLEBER ELISABETH, D-8042 Oberschleissheim, DE**

(73) Nosilec: **STEIGERWALD ARZNEIMITTELWERK GMBH, Havelstrasse 5, D-6100 Darmstadt, DE**

(74) Zastopnik: **PATENTNA PISARNA D.O.O., Čopova 14, p.p. 322, 61000 Ljubljana, SI**

(54) ZDRAVILO IN NJEGOVA UPORABA ZA ZDRAVLJENJE STANJ VZNEMIRJENJA IN ŽIVČNIH DISFUNKCIJ

(57) Izum se nanaša na zdravilo in na njegovo uporabo za zdravljenje stanj vznemirjenja in živčnih disfunkcij, ki kot učinkovite snovi vsebuje z alkoholno ekstrakcijo (2,5:10) dobljene ekstrakte Corydalis in

Eschscholtzia v danem primeru poleg splošno običajnih dodatkov, pri čemer je masno razmerje ekstraktov Eschscholtzia proti Corydalis v območju 20:1 do 1:1.

SI 9200138 A

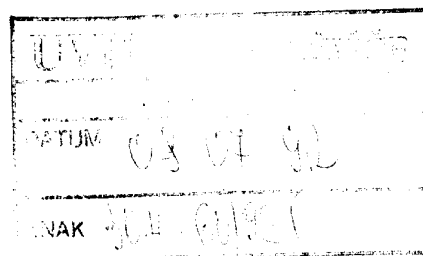
Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH

Zdravilo in njegova uporaba za zdravljenje stanj vznemirjenja in živčnih disfunkcij

Izum se nanaša na zdravilo in njegovo uporabo za lajšanje stanj vznemirjenja in živčnih disfunkcij.

Znano je, da imajo vmesni in končni produkti kateholaminskega metabolizma vpliv na stanje vznemirjenja pri človeku. Tako učinkuje npr. končni produkt adrenalin kot nevrottransmitter adrenergičnega živčnega sistema tako na α - kot tudi β -receptorje. Kot simpatikomimetik poveča adrenalin kontrakcijsko moč srca. Ker adrenalin poleg tega poveča oksidativen metabolizem v celicah, povzroči v celoti zvišano pripravljenost organizma za delovanje. Torej opazamo tudi povečanje sproščanja adrenalina v stresnih situacijah. Posebno visoke koncentracije adrenalina kot tudi njegove predstopnje, noradrenalina, imajo lahko za posledico preveliko vznemirjenje, nervozo in s tem pomanjkljivo sposobnost delovanja telesa, medtem ko le malo zvišane vrednosti teh aminov vseskozi pozitivno učinkujejo. Utrip in krvni tlak sta rahlo zvišana, miškulatura in možgani so stimulirani, sposobnost sprejemanja je zvišana.

Poleg tega je znano, da lahko motnje v koncentracijskem nivoju dopamina, nadaljnje predstopnje do adrenalina, vodijo do stanj vznemirjanja in živčnih disfunkcij. Zlasti lahko pri pomanjkanju dopamina nastopijo depresije. Poseben sindrom pomanjkanja dopamina predstavlja Parkinsonova bolezen, katere delni simptomi so akineza, rigor



in pasivni tremor. Novejši klinični rezultati dokazujejo terapevtsko učinkovitost dope pri zdravljenju parkinsonizma; ta učinek se zdi zaradi opazovanega zmanjšanja dopamina v bazalnih ganglijah razumljiv.

Pri pomanjkanju dopamina je torej zaželeno, da na naraven način zvišamo koncentracijo tega kateholamina. To lahko dosežemo tako, da po eni strani zvišamo sintezo dope/dopamina in po drugi strani preprečimo razgradnjo dopamina.

Naloga predloženega izuma je, da damo na razpolago zdravilo, ki poveča koncentracijo dopamina pacienta v naravnem metabolizmu.

Gornjo nalogo rešimo v smislu izuma z zdravilom po zahtevku 1, ki je označeno s tem, da obsega kot učinkovite snovi z alkoholno ekstrakcijo (2,5:10) dobljene ekstrakte Corydalis in Eschscholtzia, v danem primeru poleg splošno običajnih dodatkov, pri čemer je masno razmerje ekstraktov Eschscholtzia proti Corydalis v območju od 20:1 do 1:1.

Smotrne izvedbe le-tega so predmet zahtevkov 2 do 9.

Izum nadalje obsega uporabo po zahtevku 10 zdravila v smislu izuma za lajšanje oz. odpravo stanj vznemirjanja in živčnih disfunkcij, ki temelje na motnjah aminske bilance, zlasti zmanjšane koncentracije dope/dopamina.

Predmet izuma je nadalje uporaba z alkoholno ekstrakcijo (2,5:10) dobljenega ekstrakta za zdravljenje oz. pripravo zdravila za zdravljenje stanj vznemirjanja in živčnih disfunkcij, ki temelje na motnjah aminske bilance, po zahtevkih 11 in 12. Uporabne oblike so predmet zahtevkov 13 do 15.

Zdravilo v smislu izuma lahko dobimo z alkoholno ekstrakcijo dobljenih ekstraktov v obliki liofiliziranega praška, vodne in/ali alkoholne raztopine. Priprava liofiliziranega praška poteče praviloma z liofiliziranjem ekstrakta (izvlečka drog), dobljenega z alkoholno ekstrakcijo, po za to običajnih liofilizirnih postopkih.

Liofilizirane ekstrakte *Corydalis* in *Eschscholtzia* lahko shranjujemo ločeno ali v zmesi ter v danem primeru za pripravo zdravila pomešamo s primerno farmacevtsko nosilno snovjo/razredčilom. Za pripravo tinktur sta za to primerna zlasti voda in/ali alkohol. V prvi vrsti vsebuje zdravilo učinkovite snovi v obliki izvlečka drog, dobljenega z alkoholno ekstrakcijo (2,5:10), in zlasti obstoji iz takega izvlečka drog.

Razmerje *Eschscholtzia* proti *Corydalis* (glede na maso suhega ekstrakta) je prednostno v območju 10:1 do 2:1 in zlasti 4:1.

Kot učinkovito snov uporabimo v smislu izuma prednostno ekstrakte *Corydalis cavae rhizoma* in *Eschscholtziae californicae herba*.

Zdravila v smislu izuma se lahko nahajajo v obliki, običajni za oralno dajanje, zlasti v obliki tablet, dražej, kapsul ali v prvi vrsti tinktur. Te dajalne oblike pripravimo, v danem primeru ob uporabi za posamezne dajalne oblike običajnih in primernih farmacevtskih razredčil in/ali nosilcev, na znan način, npr. s tabletiranjem, dražiranjem, zakapsuliranjem ekstrakta v liofilizirani obliki ali njegove alkoholne in/ali vodne raztopine. Za pripravo tekočih dajalnih oblik, kot zlasti tinktur, prednostno direktno uporabimo z alkoholno ekstrakcijo dobljene alkoholne izvlečke drog. Poleg liofiliziranja teh alkoholnih izvlečkov drog za pripravo liofiliziranih ekstraktov je tudi mogoče, da alkoholne izvlečke drog direktno, prednostno v vakuumu in/ali v atmosferi inertnega plina, uparimo do suhega in tako dobljeni ostanek potem nadalje predelamo v želeno dajalno obliko.

Koncentracijo učinkovitih snovi v zdravilu v smislu izuma se da variirati v širokih mejah. Praviloma znaša koncentracija 0,5 do 20 mas.% glede na gotovi zdravilni sestavek, zlasti 1 do 10 mas.%, v prvi vrsti 1 do 4 mas.%. Če uporabimo z alkoholno ekstrakcijo (2,5:10) dobljeni alkoholni izvleček drog, ga uporabimo prednostno v koncentraciji, dobljeni direktno po ekstrakciji; pri tem uporabimo izvlečke iz *Corydalis* in *Eschscholtzia* zlasti v takem razmerju, da ustreza razmerje *Corydalis* proti *Eschscholtzia* preje prednostno navedenim razmerjem.

Za pripravo posameznih ekstraktov *Corydalis* in *Eschscholtzia*, zlasti *Corydalis cavae rhizoma* in *Eschscholtziae californicae herba*, uporabimo droge, ki ustrezajo specifikacijam DAB 9. To zagotovimo s kontrolo kvalitete pri dobavi droge.

Posamezne ekstrakte pripravimo na znan način po za to običajnih in standardiziranih ekstrakcijskih postopkih, kot npr. z maceriranjem ali perkolacijo s pomočjo etanola ali zmesi etanola/vode. Pri tem vzdržujemo razmerje droge-ekstrakt 2,5:10, t.j. iz 2,5 g droge dobimo 10 ml ekstrakta droge. Kot ekstrakcijsko sredstvo prednostno uporabimo 30 vol.%-en etanol. Pripravo lahko krmilimo s pomočjo notranje procesne kontrole.

Za ocenitev in zagotovitev enakomerne kvalitete ekstraktov uporabimo za to običajne kriterije kvalitete. Zlasti služijo za to celotni spektri ekstrahiranih snovi in po drugi strani analize iz literature znanih glavnih alkaloidov obeh drog (prim. npr. ...).

Po kontroli kvalitete sproščene ekstrakte nato ustrezno željeni obliki dajanja in koncentracijam nadalje predelamo kot tekoč ali liofiliziran ekstrakt.

Vrste in količine dajanja se ravnaajo zlasti po teži obolenja, splošnem stanju in starosti pacienta. Praviloma znaša količina dajanja v obliki tinkture, ki je prednostna v smislu izuma, 1 do 2 kapljici/kg telesne teže enkrat ali večkrat dnevno. V obliki drugih oralnih dajalnih oblik dajemo praviloma ustrezne količine, prednostno 2 do 5 mg celotnega suhega ekstrakta/kg telesne teže, enkrat ali večkrat dnevno.

Priložene slike imajo naslednji pomen:

- sl. 1 kaže shemo metabolizma kateholaminske sinteze;
- sl. 2 kaže shematski pregled reakcijskih shem tirozina preko dope, dopakinona v dopakrom oz. melanin;
- sl. 3 kaže pri 303 nm UV-spektrometrično določeno tirozinsko hidroksiliranje v prisotnosti ekstrakta *Corydalis* 1:10 000, ekstrakta *Eschscholtzia* 1:10 000 oz. 20 E fenolaze;
- sl. 4 kaže Lineweaver-Burk-Plot za fenolazno reakcijo z ekstraktom *Corydalis* (sl. 4a in 4b) kot tudi za primerjavo brez ekstrakta *Corydalis* (sl. 4c-4f);

- sl. 5 podaja fenolazno reakcijo v prisotnosti 3,4-dihidroksibenzena;
- sl. 6 kaže vpliv D,L-dope na fenolazno reakcijo pri različnih koncentracijah dope (K = kontrola);
- sl. 7 kaže zaviranje dopamin- β -hidroksilaze z ekstraktom Eschscholtzia (krivulja A) kot tudi z vodno 1%-no raztopino liofiliziranih ekstraktov Corydalis in Eschscholtzia (krivulja B);
- sl. 8 kaže fotometrično pri 241 nm zaviranje z aminooksidazo katalizirane presnovne reakcije benzilamina v benzaldehid z ekstraktom Corydalis;
- sl. 9 podaja zaviranje MAO-katalizirane benzaldehidne tvorbe pri 241 nm v odvisnosti od koncentracije ekstrakta iz Eschscholtzia;
- sl. 10 kaže zaviranje MAO-katalizirane benzaldehidne tvorbe pri 241 nm z ekstrakti Eschscholtzia (A), Corydalis (B) kot tudi z zmesjo ekstraktov Corydalis in Eschscholtzia v razmerju 20:80.

Iz sl. 1 je razvidna shema metabolizma kateholaminov. Koncentracija pri tem nastopajočih spojin dope in dopamina je po eni strani odvisna od tega, kako hitro poteče pretvorba tirozina v dopo, in po drugi strani, s kakšno hitrostjo dopamin nadalje reagira v noradrenalin in adrenalin. Razen tega utрпи dopamin tudi razgradnjo zaradi monoaminooksidaz (MAO), tako da lahko tudi s tem znatno vplivamo na njegovo koncentracijo v metabolizmu.

Kot se da razbrati s sl. 1, dosežemo zvišano koncentracijo dopamina, če lahko povečamo reakcijo fenoloksidaze (fenolaza, tirozinaza) in zmanjšamo vpliv dopamin- β -hidroksilaze kot tudi monoaminooksidaz.

V nadaljevanju smo izvedli eksperimente, ki kažejo, v kakšni meri vplivajo aktivne komponente zdravila v smislu izuma na vse tri encimske reakcije.

Naslednje preiskave smo izvedli, če ni drugače navedeno, s tržno dostopnimi encimi ter s *Corydalidis cavae rhizoma* in *Eschscholtziae californicae herba*.

1. Preiskava tirozinazne reakcije

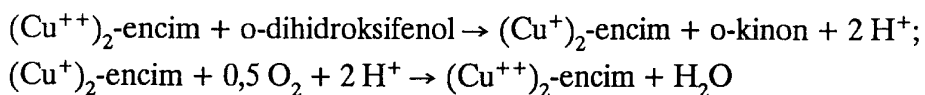
Tirozin hidroksiliramo v metabolizmu v reakciji, ki porablja kisik, v L-dopo. To prvo stopnjo kateholaminske sinteze katalizira tirozinaza oz. fenolaza ali fenoloksidaza, ki predstavlja manj specifičen encim, ki vsebuje baker.

Znano je, da so fenolaze v naravi široko razširjene in se nahajajo v rastlinah, glivah in različnih živalskih tkivih. Povsod tam igrajo važno vlogo, kjer se oksidirajo mono- ali difenoli, pri čemer se v mnogih primerih uvedejo oksidativne polimerizacijske stopnje, kot npr. tvorba lignina ali melanina.

Fenolaze katalizirajo dve zaporedni oksidacijski stopnji, ki jih lahko opišemo, kot sledi:

1. Krezolazna aktivnost encima povzroči hidroksiliranje monofenola v legi orto ob tvorbi difenola.
2. Kateholazna aktivnost katalizira nadaljnjo oksidacijo nastalega o-diola v ustrezen kinon.

Obe reakciji sta direktno odvisni druga od druge. Tesna zveza med krezolazno in kateholazno reakcijo temelji na oksidacijskem statusu atoma bakra v aktivnem centru, ki je naveden po D. Kertesz in R. Zito v O. Hayaishi (izd.) "Oxygenases", Academic Press, London (1962), pogl. 8: Phenolase, kot sledi:



V prejšnji elektronski bilanci bakra ostaja krezolazna reakcija neupoštevana. Dejansko se zdi, da ni razjasnjeno, če hidroksiliranje monofenola katalizira prava encimska reakcija ali če ta reakcija poteka na kemičen način vzporedno s kateholno oksidacijo po naslednji shemi:

$\text{o-kinon} + \text{monofenol} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ o-difenol}$.

Za hipotezo neencimatske reakcije govori predvsem dejstvo, da se da pri reakciji monofenolov s fenolazami opaziti indukcijsko fazo, ki lahko pri tirozinazah iz živalskega tkiva traja do 1 ure. Kontinuirna encimska reakcija lahko nastopi šele tedaj, kadar so prisotni dioli ali kinoni kot nečistota ali nastanejo z avtooksidacijo.

Preiskava tirozinazne reakcije z rastlinskimi ekstrakti iz *Corydalis* in *Eschscholtzia*.

Na sl. 2 je podana v shematskem pogledu reakcijska shema, ki izhaja iz tirozina, v dopakrom in njegova presnova v kinonimin ali melanin.

Eksperimentalno smo opazovali v nadaljevanju oksidacijo tirozina v dopakrom (sl. 2), prvi oksidacijski produkt dihidroksifenilalanina (dopa). Dopakrom sam je substrat za "dopakrom-tavtomerazo" in predstavlja predstopnjo tvorbe melanina. Tako tvorba dopakroma kot tudi sinteza melanina vodita do razgradnje dope in s tem do zmanjšane sinteze dopamina.

Koncentracijo dopakroma lahko zasledujemo v UV-spektru pri valovni dolžini 303 - 318 nm. Pri tem izenačimo njegovo tvorbo iz tirozina z aktivnostjo fenolaze, ki jo je treba preiskati in za katero smatramo, da določa hitrost.

Preiskave smo izvedli na sledečih substratnih zmesih:

2 mm tirozina

100 mM fosfatnega pufra, pH 6,5

20 E tirozinaze ali alkoholnih izvlečkov *Eschscholtzia* oz. *Corydalis*, razredčeno v razmerju 1:10 000 (izhajajoč iz osnovnega ekstrakta po naslednjem primeru).

Sl. 3 kaže pri 303 nm UV-spektrometrično določeno tirozinsko hidroksiliranje v prisotnosti fenoloksidaze oz. ekstraktov iz *Corydalis* in *Eschscholtzia*. Pri tem opazimo v prisotnosti same fenolaze nastop približno 15-minutne "lag-faze".

Razredčenja iz ekstraktov *Corydalis* do 1:10 000 vodijo do znatnega skrajšanja te lag-faze ali začetne faze, kot je to razvidno iz sl. 3. Pri višjih koncentracijah *Corydalis* opazimo takojšen nastop največje presnovne stopnje brez "lag-faze".

Ekstrakt iz *Eschscholtzia* vodi prav tako do skrajšane začetne faze; učinkovitost ekstrakta *Eschscholtzia* pa je znatno manjša kot učinkovitost *Corydalis*.

Kontrolni poskusi so pokazali, da prisotnost ustreznih količin etanola nima vpliva na reakcijo. Poleg tega so poskusi s pirolokinolinkinomom (PQQ) pokazali, da dodatek tega fiziološko zelo zanimivega kinona nima vpliva na začetno fazo fenolazne reakcije. Tudi hipericin, ki bi kot para-kinon morebiti lahko vplival na lag-fazo, je brez vpliva na reakcijo.

Pri tej poskusni vrsti je zanimivo dejstvo, da ekstrakt iz *Corydalis* sicer premakne trenutek maksimalne presnovne stopnje tirozina znatno naprej, vendar nima vpliva na maksimalno presnovno stopnjo. Poskusi z različnimi koncentracijami substrata v Lineweaver-Burk-Plot ne kažejo premika vrednosti K_m fenolazne reakcije (glej k temu sl. 4a do 4f).

Za nadaljnjo pojasnitev mehanizma tirozinazne reakcije, zlasti glede na skrajšanje lag-faze, smo testnemu nastavku dodali nadaljnje snovi:

- a) Dodatek bakrovih soli ni imel nobenega vpliva na encimsko reakcijo.
- b) Askorbinska kislina kot reducirno sredstvo lahko - kot je to znano iz literature - prekine lag-fazo pri različnih reakcijskih tipih. V predloženi preskusni vrsti pa tega nismo mogli opaziti: askorbinska kislina lahko sicer uvede presnovo tirozina v L-dopo, istočasno pa prepreči njeno nadaljnjo oksidacijo v dopakrom. Fenolazne reakcije nismo mogli opaziti v prisotnosti askorbinske kisline pri 303 nm v časovnem obdobju 30 minut; "lag-faza" je bila po možnosti celo podaljšana.
- c) Kombinacija PQQ z askorbinsko kislino, pri čemer nastane reducirana oblika $PQQH_2$, ki bi lahko kot diol vplivala na reakcijo, je prav tako povzročila podaljšanje lag-faze.

- d) Dodatek "pravih" diolov, kot 3,4-dihidroksibenzena in D,L-dope, skrajša lag-fazo reakcije (v primeru dodatka dope se zviša zaradi večje ponudbe substrata tudi hitrost tvorbe dopakroma).

Na sl. 5 je podana fenolazna reakcija v prisotnosti 3,4-dihidroksibenzena. Sl. 6 kaže vpliv D,L-dope na fenolazno reakcijo v odvisnosti od koncentracije dope. Tako iz sl. 5 kot tudi sl. 6 je lahko znatno razviden vpliv navedenih diolov na lag-fazo.

Avtooksidacije dope, ki nastopi pri alkalnih vrednostih pH, se pri pH 6,5 ne da opaziti ali se je le malo opazi.

Gornji poskusi kažejo, da lahko povzročimo skrajšanje začetne faze fenolazne reakcije samo z dodatkom diolov. Kinolini in askorbinska kislina ne kažejo nobenega vpliva. Zato je treba smatrati, da ekstrakti iz *Corydalis* in *Eschscholtzia* vsebujejo orto-diole, ki povzročijo takojšnjo presnovo tirozina v dope. Nadalje je treba smatrati, da ekstrakti iz *Corydalis* in *Eschscholtzia* tudi in vivo vodijo do hitrejše presnove tirozina in s tem do zvišane koncentracije dope.

2. Preiskava dopamin- β -hidroksilazne reakcije

Encim dopamin- β -hidroksilaza katalizira presnovo dopamina v noradrenalin. Dopamin- β -hidroksilaza je prav tako encim, ki vsebuje baker. Hidroksiliranje poteče ob porabi kisika in rabi askorbinsko kislino in fumarat kot reducirna sredstva za regeneriranje oksidacijskega statusa atoma bakra.

Aktivnost encima določimo potenciometrično na osnovi porabe molekulskega kisika. Vsakokratni testni nastavek je vseboval naslednje komponente:

Po 100 μ l tiramina, fumarata, askorbata (vsakokrat 5 mM)
1 ml fosfatnega pufra, pH 5 (100 mM)
1 ml vode
100 μ l encima (ustrezno 0,1 E).

Stopnje porabe kisika smo preračunali s pomočjo vsebnosti O₂ raztopine s 37°C pri vsakokratnem volumnu.

Pri dodatku ekstrakta Eschscholtzia se kaže jasno, od koncentracije odvisno zaviranje encimske reakcije, t.j. hidroksiliranje stranskih verig se v kar največji meri prepreči. Opazili smo, da encimsko aktivnost zavira tudi etanol. Vendar je zaviranje zaradi ekstrakta bistveno višje, tako da ga lahko tukaj jasno razlikujemo.

Sl. 7 kaže zaviranje dopamin- β -hidroksilaze z ekstraktom Eschscholtzia (krivulja A) kot tudi z vodno, 1%-no raztopino liofiliziranih ekstraktov Eschscholtzia in Corydalis v razmerju 20:1 (krivulja B) v smislu izuma.

Na sl. 7 kažeta obe krivulja jasno zaviranje encimske aktivnosti. Razlike v poteku krivulj bi se smele pripisati prisotnosti oz. odsotnosti etanola kot tudi ekstrakta Corydalis (krivulja B). Popuščajoč učinek encimskega zaviranja pri ekstraktu Eschscholtzia lahko delno pripišemo porabi kisika zaradi različnih substratov ekstrakta. Vodna raztopina liofiliziranih ekstraktov Corydalis in Eschscholtzia kaže sicer prav tako porabo kisika s tiraminom, askorbatom in fumaratom; zaviralni učinek na encim pa ne popusti, s čimer je tukaj znatno otežena interpretacija učinka.

Prejšnji poskusi jasno kažejo, da encim dopamin- β -hidroksilazo zavira alkoholni ekstrakt Eschscholtzia (krivulja A) kot tudi vodna raztopina liofiliziranih ekstraktov Eschscholtzia in Corydalis (krivulja B), kar v kateholaminskem metabolizmu vodi do zmanjšanja tvorbe noradrenalina in adrenalina. Ta zaviralni učinek pojasnjuje sedativni učinek zdravila v smislu izuma. Visoka koncentracija dopamina, ki se zadrži zaradi zaviranja, ima pozitiven vpliv v primeru parkinsonizma, slike bolezni, pri kateri so dopaminergične živčne celice uničene in je treba vsebnost dopamina v možganih vzdrževati visoko z umetnimi dajanji.

3. Preiskava monoaminoksidazne reakcije

Kot je razvidno s sl. 1, reguliramo koncentracijo dope oz. dopamina tudi z njegovo razgradnjo zaradi monoaminooksidaz. Monoaminooksidaze presnovijo primarne amine s pomočjo kisika v vodnem mediju v ustrezni aldehyd, amoniak in vodikov peroksid v stehiometričnem razmerju. Tukaj uporabljeno aminooksidazo smo dobili

od firme Sigma Chemicals. Ta aminooksidaza kaže visoko afiniteto do benzilamina kot substrata. Zato smo naslednje preiskave izvedli z benzilaminom kot substratom in preizkusili učinek Corydalis in Eschscholtzia na aktivnost te monoaminooksidaze.

Presnovo benzilamina v benzilaldehid z monoaminooksidazo smo dokazili fotometrično in potenciometrično:

- a) fotometrično poteče dokaz nastajajočega benzaldehida, ki pri 241 nm kaže visok molekulski ekstinkcijski koeficient ($1,2 \times 10^4$). Ta občutljiv dokaz omogoča uporabo zelo majhnih encimskih količin, ki so lahko pri 0,01 in 0,02 E monoaminooksidaze (MAO) v reakcijskem volumnu 2 ml.

Vsakokratni testni nastavek z 2 000 μ l celotnega volumna vsebuje:

50 μ l 100 mM vodne benzilamin.HCl-raztopine

(ustrezno 2,5 mM),

100 mM fosfatnega pufera, pH 7,4,

0,01 E ali 0,02 E MAO, dodano v 100 μ l-skih deležih ustrezne osnovne raztopine;

referenčna kiveta je vsebovala pufer, vodo in benzilamin.

V poskusih z zgoraj opisanim testnim nastavkom smo po 10 minutah reakcijskega časa dodali v merilno in referenčno kiveto razredčene ekstrakte Eschscholtzia in Corydalis in določili spremenjeno aktivnost. Sl. 8 kaže zaviranje tvorbe benzaldehida v odvisnosti od koncentracije Corydalis (20 oz. 40 μ l 1:10 razredčene raztopine osnovnega ekstrakta).

Na sl. 9 je podano zaviranje ekstrakta iz Eschscholtzia na aktivnost MAO pri različnih količinah ekstrakta. Pri tem se pokaže jasno zaviranje aktivnosti MAO.

Sl. 10 kaže zaviralni učinek aktivnosti MAO zaradi dodatka različnih koncentracij ekstrakta Eschscholtzia (krivulja A), ekstrakta Corydalis (krivulja B) kot tudi zmesi ekstraktov Corydalis in Eschscholtzia v razmerju 20:80 (krivulja C). Za boljšo primerjavo poskusnih rezultatov je na sl. 10 prikaz zaviralnih učinkov v %. Aktivnost MAO

smo pri tem v vsakem poskusu nastavili kot 100% (zaradi viskozne raztopine amonijevega sulfata-encima je bilo težko, da bi ugotovili konstantne encimske količine na tržišču ponujenega produkta).

Ovrednotenje poskusov kaže, da z ekstraktom Corydalis povzročimo zmerno zaviranje aktivnosti MAO. Bistveno močnejši vpliv se da opaziti z ekstraktom Eschscholtzia. Prav tako pomembno je zaviranje MAO v prisotnosti zmesi obeh ekstraktov, ki obstoji iz 80% ekstrakta Eschscholtzia in 20% ekstrakta Corydalis.

- b) Potenciometrično lahko reakcijo $\text{benzilamin} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{benzaldehyd} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ določimo z zmanjšanjem vsebnosti kisika v reakcijski raztopini s pomočjo platinove kisikove elektrode. Dokaz kisikove presnove zahteva višje količine substrata in encima. Vsakokratni testni nastavek je vseboval:

200 μl 100 mM benzilaminske raztopine (ustrezno 10 mM)
1.000 μl 200 mM raztopine fosfatnega pufra, pH 7,5 (ustrezno 100 mM),
1.000 μl dest. vode,
0,05 E MAO.

Z dodatkom 100 μl ekstraktov Eschscholtzia in Corydalis po reakcijskem času 3 minute lahko preračunamo različne stopnje kisikove presnove.

Rezultati na kisikovi elektrodi kažejo zmanjšanje aktivnosti monoaminoksidaze zaradi posameznih ekstraktov iz Corydalis in Eschscholtzia. Pri tem smo potrdili močan vpliv ekstrakta Eschscholtzia na aktivnost MAO.

Gornji poskusi kažejo, da lahko dosežemo znatno zaviranje MAO z ekstrakti iz Corydalis in Eschscholtzia kot tudi z zmesjo obeh teh ekstraktov. Iz tega se da sklepati, da imajo, če zaviramo aktivnost aminooksidaz v plazmi, amini, kot dopamin, daljši zadrževalni čas v strujanju krvi in s tem ostanejo dalj časa učinkoviti. Iz tega se izvede pozitiven učinek zdravila v smislu izuma pri lajšanju stanj vznemirjenja in živčnih disfunkcij ter iz tega izvedenih depresijskih stanj, zlasti tudi pri sindromih pomanjkanja dopamina, kot parkinsonizmu.

PRIMERI

Primer 1

Priprava ekstrakta

Pripravimo posamezne ekstrakte *Corydalis cavae* rhizoma in *Eschscholtzia californicae* herba. Posamezne ekstrakte pripravimo z ekstrakcijo s perkolacijo 16 ur pri 50°C. Vzdržujemo razmerje droga-ekstrakt 2,5:10, t.j. iz 2,5 g ustrezne droge dobimo 10 ml ekstrakta droge. Ekstrakcijsko sredstvo 30 vol. %-en etanol.

Tako dobljene ekstrakte lahko uporabimo direktno za pripravo sestavka zdravila ali jih prevedemo z liofilizacijo v suhi ekstrakt.

Primer 2

Vpliv DL-dihidroksifenilalanina na fenolazno reakcijo

Reakcijski pogoji: fosfatni pufer, pH = 6,5, 100 mM

tirozin 2 mM

fenolaza 20 U

DL-dihidroksifenilalanin, spremenljiv

t (min)	fenolaza		+ DOPA 500 nM		+ DOPA 5 µM		+ DOPA 50 µM	
	mU	+/-	mU	+/-	mU	+/-	mU	+/-
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2			4	0	23	2.2	70	4.5
4			13	1.5	69	2.9	157	8.1
6	5	0.53	28	3.2	117	5.2	236	11
8	6	1.2	50	2.9	170	4.7	321	15
10	12	1.5	75	5.1	228	7.2	402	15
12	23	2.2	..	..	..	..	..	..
14	39	3.1						
16	60	4.7						
18	84	7.3						
20	139	18	291	14	554	16	775	29
..	..	..	..	..	..	..	..	..
30	404	32	562	28	883	21	1090	37

Kot kaže sl. 6, lahko DL-dopa znatno skrajša lag-fazo fenolaze, pri čemer 5 μM dope že sproži takojšnjo tvorbo dopa-kroma. S 50 μM dope poteče reakcija direktno po startu z encimom že za maksimalno presnovno stopnjo.

Avtooksidacije dope, torej tvorbo dopakroma brez udeležbe encima, se pri pH 6,5 v opazovanem časovnem razdobju ne da ugotoviti.

DL-dopa pa ne predstavlja poljubnega diola, ampak substrat fenolaze, katerega produkt spet daje dopakrom. Zato v nadaljevanju (primer 3) izvajamo primerjalne preiskave s 3,4-dihidroksibenzenom.

Primer 3

Vpliv 3,4-dihidroksibenzena (kot starterja) na fenolazno reakcijo

Reakcijski pogoji: fosfatni pufer, pH = 6,5, 100 mM tirozina 2 mM fenolaza 20 U 3,4-dihidroksibenzen, spremenljiv						
fenolaza			+ 3,4DHB 5 μM		+ 3,4-DHB 50 μM	
t (min)	mE	+/-	mE	+/-	mE	+/-
0	0	0	0	0	0	0
2			6	1.7	27	2.7
4			15	1.3	63	4.8
6	8	0.91	33	4.1	102	8.9
8	16	1.3	58	6.2	143	13
10	38	2.7	97	11	180	18
..	..	..	..	..	..	..
20	312	14	355	42	446	42
..	..	..	..	..	..	..
30	678	29	638	64	712	69

Pokaže se, da lahko o-dihidroksibenzen v koncentracijah 5 in 50 μM skrajša oz. odpravi lag-fazo fenolazne reakcije (sl. 5).

Primer 4

- a) Določitev Michaelisove konstante za tirozinsko presnovo s fenol-
oksidazo

Reakcijski pogoji: fosfatni pufer, pH = 6,5, 100 mM
tirozin 20 μ M do 2 mM
fenolaza 20 U/nastavek

Koncentracija substrata	recipročna koncentracija 1/(M)	recipročna presnovna stopnja 1/(mE/min)
----------------------------	--------------------------------------	---

območje 20 μ M do 1 mM

20 μ M	0.05	0.27
40 μ M	0.025	0.173
60 μ M	0.0167	0.0116
80 μ M	0.0125	0.098
100 μ M	0.01	0.076
500 μ M	0.002	0.044
1 mM	0.001	0.040

$$K_M = 141 \mu\text{M}$$

območje 20 do 70 μ M

20 μ M	0.05	0.163
30 μ M	0.033	0.125
40 μ M	0.025	0.100
50 μ M	0.020	0.081
70 μ M	0.014	0.061

$$K_M = 145 \mu\text{M}$$

območje 100 do 200 μ M

100 μ M	0.01	0.0555
120 μ M	0.0083	0.0525
140 μ M	0.0071	0.0475
160 μ M	0.0063	0.0435
180 μ M	0.0056	0.0415
200 μ M	0.005	0.40

$$K_M = 142 \mu\text{M}$$

območje 1 do 2 mM

1000 μM	0.001	0.03352
1400 μM	0.00071	0.0340
1800 μM	0.00055	0.0334
2000 μM	0.0005	0.0330

$$K_M = 137 \mu\text{M}$$

Rezultati so prikazani na sl. 4c do 4f.

b) Michaelisova konstanta reakcije z ekstraktom Corydalis

Preiskavo presnovne stopnje v prisotnosti ekstrakta Corydalis uvedemo z razredčenjem ekstrakta 1:200. Ta količina ekstrakta je vodila v prejšnjih poskusih do takojšnjega nastopa popolne encimske aktivnosti, začetna faza znaša 0 minut.

Določene vrednosti K_M kažejo v prisotnosti ekstrakta Corydalis nekoliko višje sipanje, so pa v enakem koncentracijskem območju.

Michaelisove konstante v prisotnosti ekstrakta Corydalis

Reakcijski pogoji:		fosfatni pufer, pH = 6,5, 100 mM tirozin 20 μM do 2 mM fenolaza 20 U/nastavek ekstrakt Corydalis 1:2000	
Koncentracija substrata	recipročna koncentracija 1/(M)	recipročna presnovna stopnja 1/(mE/min)	
območje 20 do 100 μM			
20 μM	0.05	0.0083	0.22
30 μM	0.033	0.057	
40 μM	0.025	0.045	
50 μM	0.020	0.040	
60 μM	0.017	0.033	0.10
70 μM	0.014	0.030	
100 μM			0.08
$K_M =$		164 μM	137 μM

območje 100 do 200 μM		
100 μM	0.01	0.0500
120 μM	0.0083	0.0435
140 μM	0.0071	0.0414
160 μM	0.0063	0.0383
180 μM	0.0056	0.0370
200 μM	0.005	0.0344
$K_M =$		151 μM

Rezultati so predstavljeni na sl. 4a in 4b.

Primer 5

Vpliv na aktivnost MAO

a) Vpliv ekstrakta Corydalis

Kot kažeta naslednja tabela in sl. 8, zavira ekstrakt iz Corydalis cava aktivnost MAO. Pri tem uporabimo 20 oz. 40 μl 1:10 razredčene raztopine ekstrakta (2 oz. 4 μl originalne snovi). Te količine ustrezajo glede na celotni reakcijski volumen 2 ml razredčenju 1:1000 oz. 1:500. Lastna absorpcija ekstrakta pri 241 nm zaradi prisotnosti številnih aromatskih spojin ovira preiskavo v večjih količinah ekstrakta, ker potem ni več možna ničelna izravnava reakcijske in referenčne kivete.

Aktivnost MAO /mE/min/ pod vplivom Corydalis

Reakcijski pogoji:	fosfatni pufer, pH = 7,4, 100 mM benzilamin 2,5 mM monoaminooksidaza 0,01, 0,02 U/nastavek ekstrakt Corydalis, 1:10, spremenljiv	
	benzaldehyd (mE/min)	
	0.01 U MAO:	0.02 U MAO:
	8.35 $\pm$ 0.50 (100 %)	18.4 $\pm$ 1.00 (100 %)
+ 2 μ l COR	6.30 $\pm$ 0.02 (75 %)	12.6 $\pm$ 1.00 (68.5%)
+ 4 μ l COR	5.50 $\pm$ 0.00 (65.9 %)	12.2 $\pm$ 0.45 (66.3%)

Rezultati so navedeni na sl. 8.

b) Vpliv ekstrakta Eschscholtzia:

Na osnovi višje transparence ekstrakta Eschscholtzia lahko v tej preiskavi uporabimo 20, 40 in 60 μ l 1:10 razredčene raztopine. V reakcijskem nastavku se nahaja potem 1:1000, 1:500 ali 1:330 razredčena raztopina ekstrakta Eschscholtzia.

Naslednja tabela in sl. 9 pojasnujeta visoko zaviralno kapaciteto tega ekstrakta: že z razredčenjem 1:500 vzdržujemo aktivnost monoaminooksidaze jasno pod 50%, z razredčenjem 1:330 se zmanjša aktivnost encima na tretjino prvotne vrednosti.

Aktivnost MAO pod vplivom Eschscholtzia

Reakcijski pogoji: fosfatni pufer, pH = 7,4, 100 mM
benzilamin 2,5 mM
monoaminooksidaza 0,01, 0,02 U/nastavek
ekstrakt Eschscholtzia, 1:10, spremenljiv

benzaldehyd (mE/min)			
	MAO	0.01 U	0.02 U
		10.3+/-1.50 (100%)	20.0+/-0.30 (100%)
2 µl ESCH		6.75 / 0.25 (55.5%)	11.8 / 0.55 (59%)
4 µl		4.50 / 0.00 (43.7%)	8.50 / 0.30 (43.5%)
6 µl		3.50 / 0.00 (33.9%)	7.50 / 0.30 (37.5%)

Rezultati so predstavljeni na sl. 9.

Primer 6

Priprava farmacevtskega pripravka

a. Priprava tinkture

Za pripravo tinkture pomešamo po primeru 1 dobljene alkoholne izvlečke droge, in sicer 20 ml izvlečka droge *Corydalis cavae* rhizoma in 80 ml izvlečka droge *Eschscholtzia californicae* herba. Dobimo 100 ml za uporabo primerne tinkture.

b. Priprava tablet

Po primeru 1 dobljene ekstrakte iz *Corydalis cavae* rhizoma in *Eschscholtzia californicae* herba posušimo (npr. liofiliziramo) in suhe ekstrakte v masnem razmerju *Eschscholtzia/Corydalis* = 4/1 pomešamo skupaj z uprašenim škrobom (kot farmacevtskim nosilcem) in stisnemo v tabletirni preši v tablete (0,5 g, premer 0,6 cm). Delež ekstrakta učinkovite snovi v tabletah je 2 mas.%.

PATENTNI ZAHTEVKI

1. Zdravilo, označeno s tem, da obsega kot učinkovite snovi z alkoholno ekstrakcijo (2,5:10) dobljene ekstrakte *Corydalis* in *Eschscholtzia* v danem primeru poleg splošno običajnih dodatkov, pri čemer je masno razmerje ekstraktov *Eschscholtzia* proti *Corydalis* v območju od 20:1 do 1:1.
2. Zdravilo po zahtevku 1, označeno s tem, da vsebuje ekstrakte vodne in/ali alkoholne raztopine v obliki praška.
3. Zdravilo po zahtevku 1 ali 2, označeno s tem, da vsebuje ekstrakte v obliki alkoholnega izvlečka drog.
4. Zdravilo po zahtevku 3, označeno s tem, da je v obliki alkoholnega izvlečka drog.
5. Zdravilo po zahtevku 1 do 4, označeno s tem, da znaša razmerje alkoholnih izvlečkov drog *Eschscholtzia* in *Corydalis* 10:1 do 2:1.
6. Zdravilo po zahtevku 1 do 4, označeno s tem, da znaša razmerje *Eschscholtzia* proti *Corydalis* 4:1 glede na ekstrakte drog.
7. Zdravilo po zahtevku 1 do 6, označeno s tem, da vsebuje kot učinkovite snovi ekstrakte *Corydalis cavae* rhizoma in *Eschscholtzia californicae* herba.
8. Zdravilo po zahtevku 1 do 7, označeno s tem, da je v oralni dajalni obliki.
9. Zdravilo po zahtevku 8, označeno s tem, da je v obliki tablet, dražej, kapsul ali tinktur.
10. Uporaba z alkoholno ekstrakcijo (2,5:10) dobljenega ekstrakta *Corydalis* in *Eschscholtzia* za pripravo zdravila za lajšanje oz. odpravo stanj vznemirjenja in živčnih disfunkcij, ki temelje na motnjah aminske bilance.

11. Uporaba po zahtevku 10, pri čemer temelje stanja vznemirjanja in živčne disfunkcije na zmanjšani koncentraciji dopamine/dopamina v metabolizmu pacienta.
12. Uporaba po zahtevku 10 za pripravo zdravila za lajšanje oz. odpravo depresij.
13. Uporaba po zahtevku 10 za pripravo zdravila za lajšanje težav pri parkinsonizmu.
14. Postopek za pripravo zdravila, označen s tem, da izvedemo alkoholno ekstrakcijo *Corydalis cavae* rhizoma in *Eschscholtzia californicae* herba, pri čemer vzdržujemo razmerje droga:ekstrakt 2,5:10 in je masno razmerje ekstraktov *Eschscholtzia* proti *Corydalis* v območju od 20:1 do 1:1.

Za

Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH:



22118-II-93-mn

POVZETEK

Izum se nanaša na zdravilo in na njegovo uporabo za zdravljenje stanj vznemirjenja in živčnih disfunkcij, ki kot učinkovite snovi vsebuje z alkoholno ekstrakcijo (2,5:10) dobljene ekstrakte *Corydalis* in *Eschscholtzia* v danem primeru poleg splošno običajnih dodatkov, pri čemer je masno razmerje ekstraktov *Eschscholtzia* proti *Corydalis* v območju 20:1 do 1:1.

Fig.1

Pregled kateholaminskega metabolizma

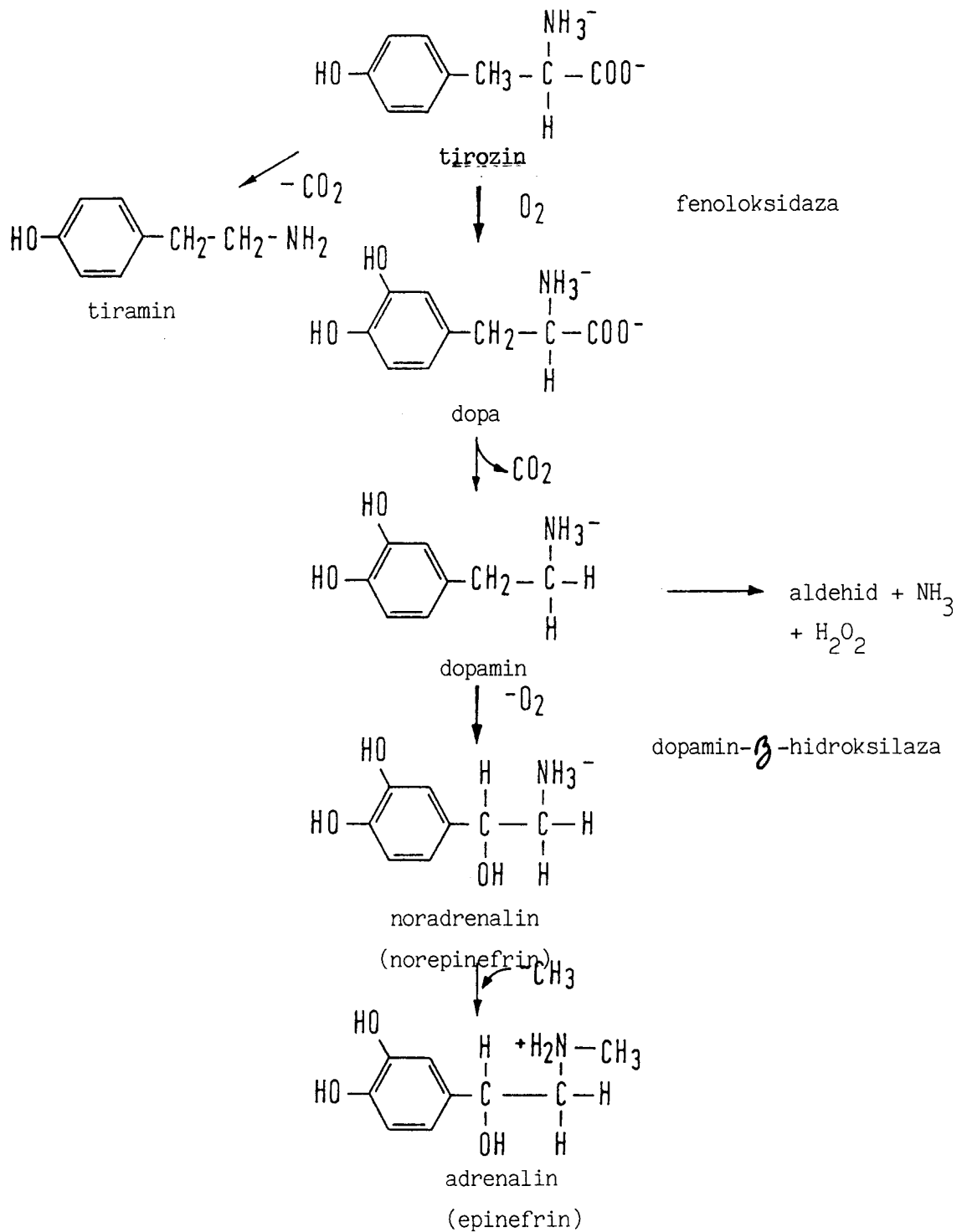


Fig. 2

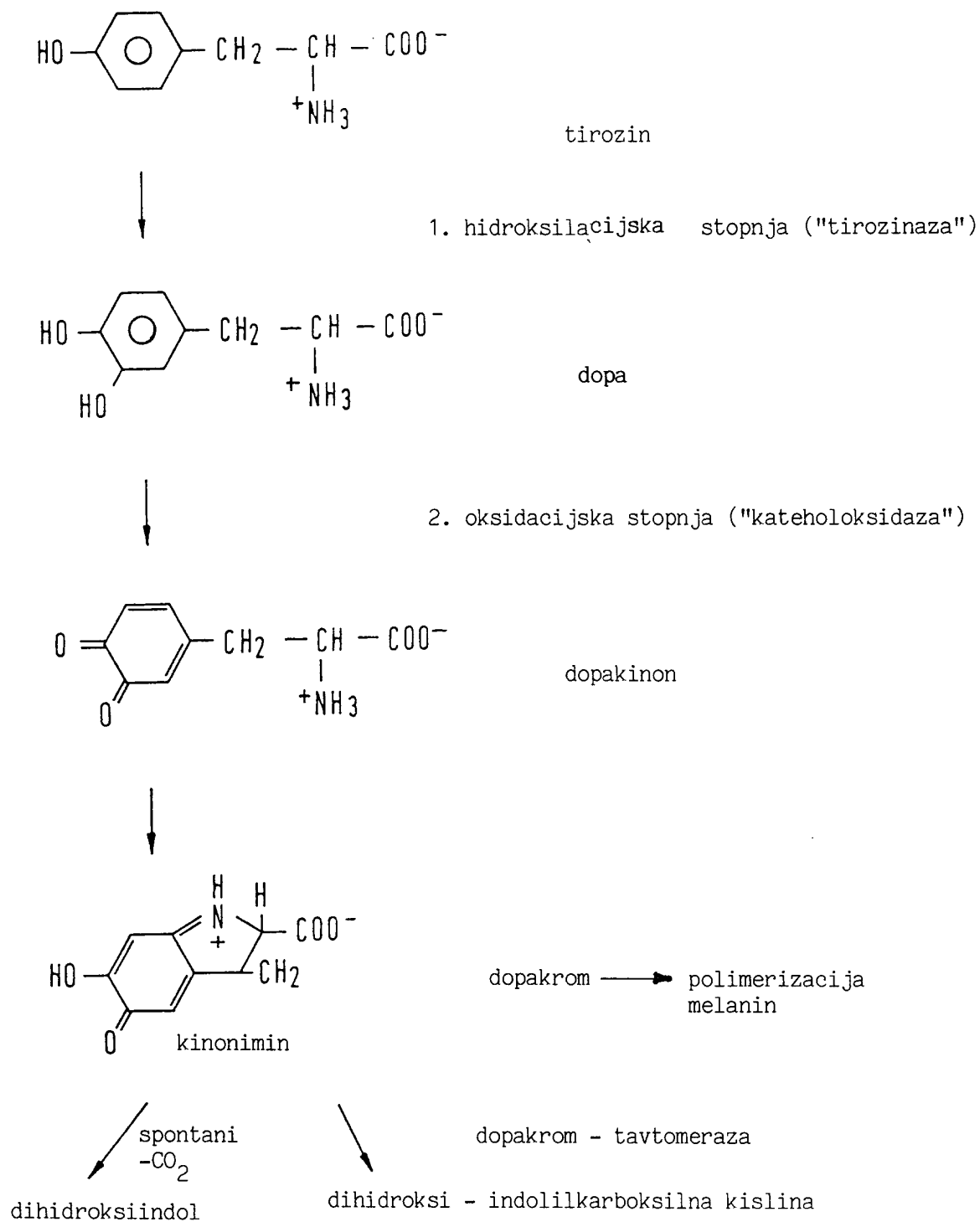
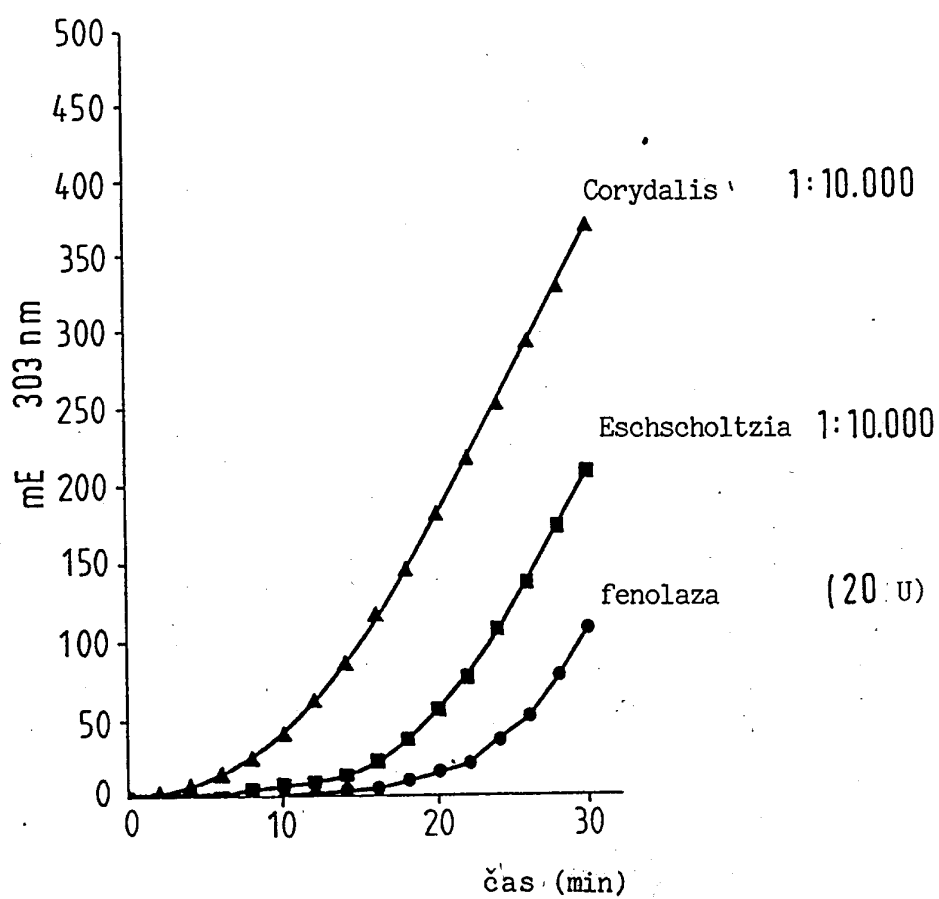


Fig.3

Tirozinska hidroksilacija pri 303 nm



RAY 111 110384

11

Fig. 4a

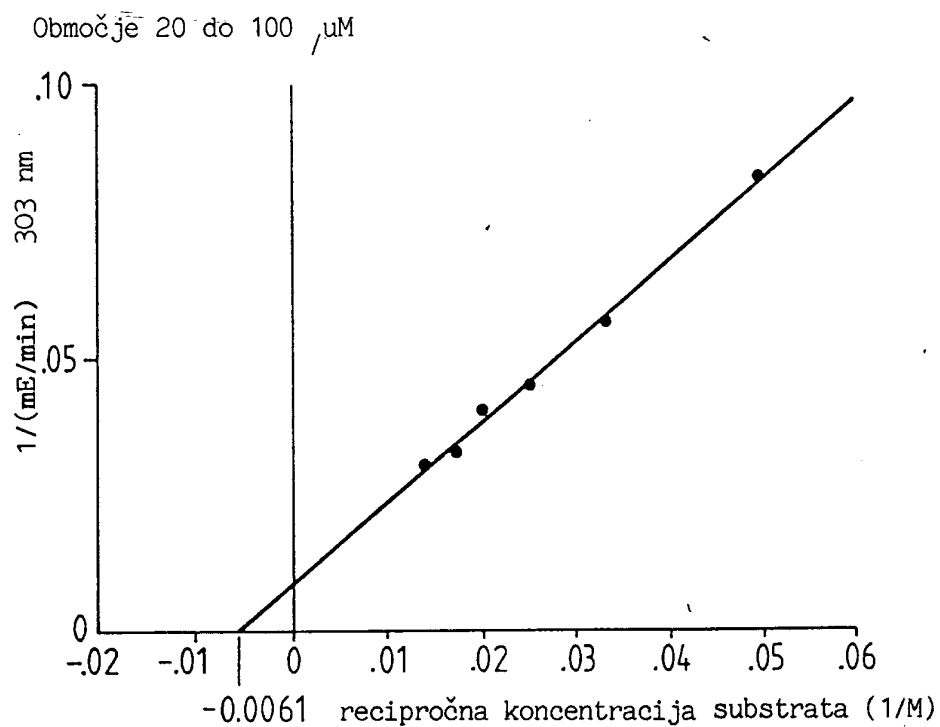


Fig. 4b

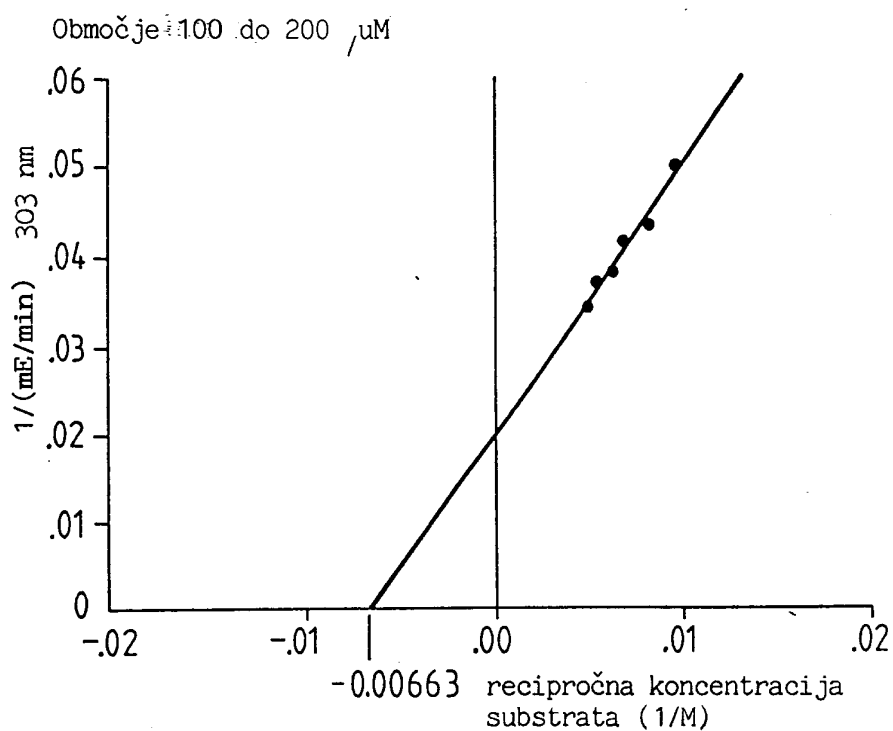


Fig.4c

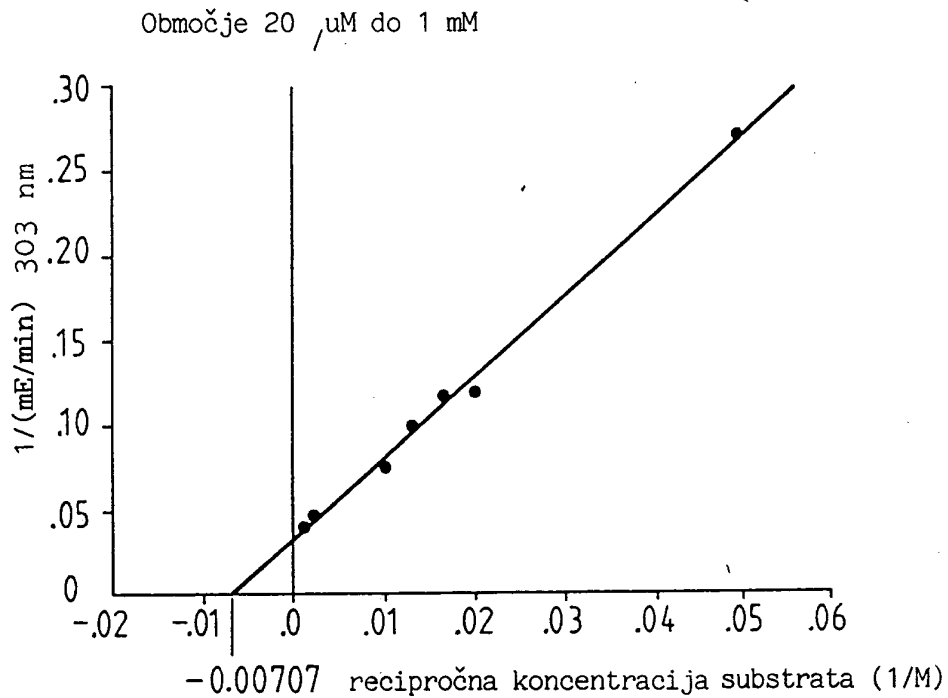


Fig.4d

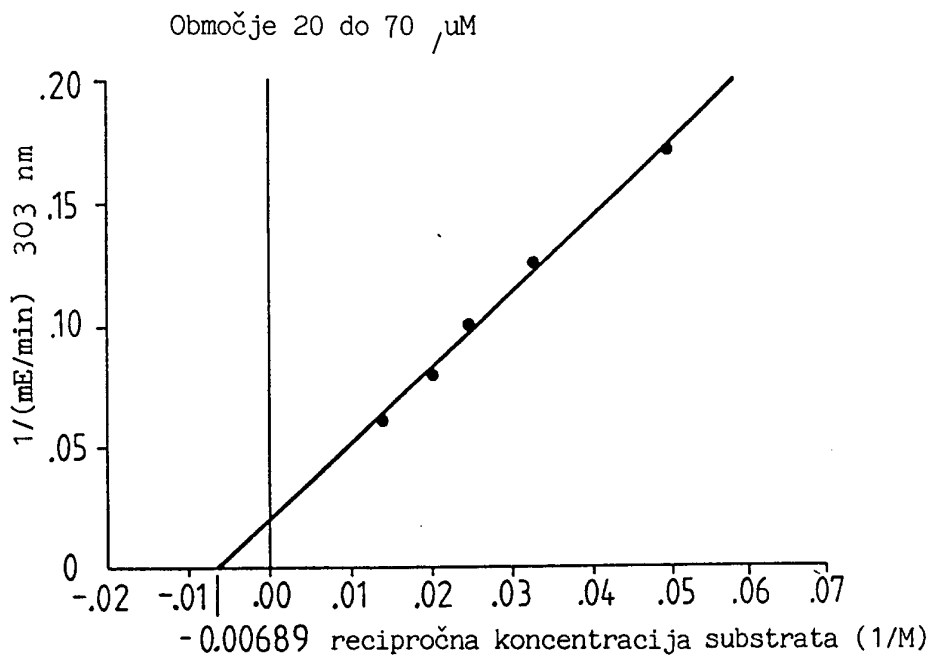


Fig. 4e

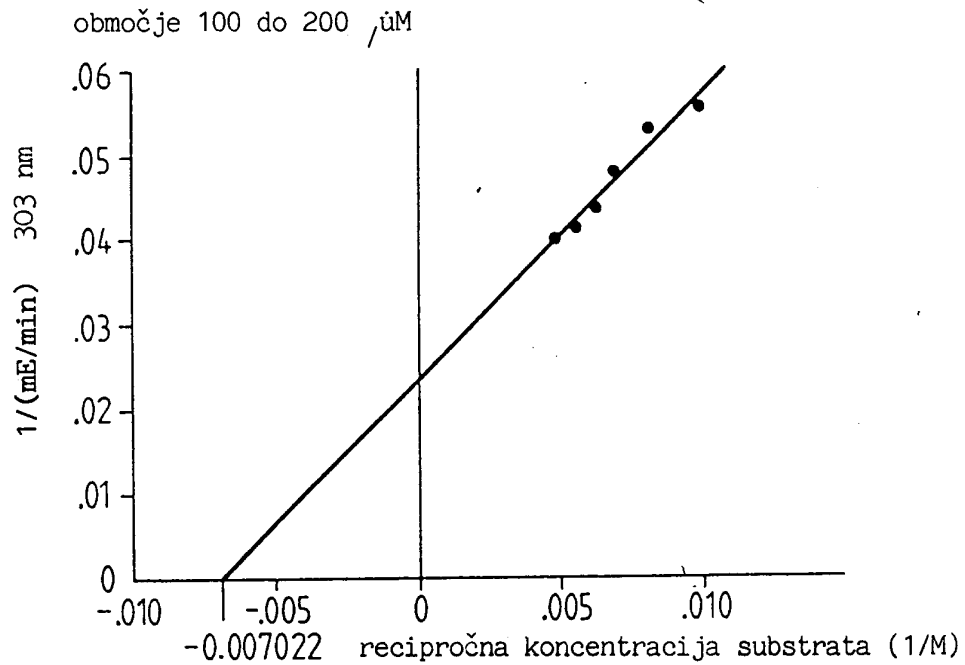


Fig. 4f

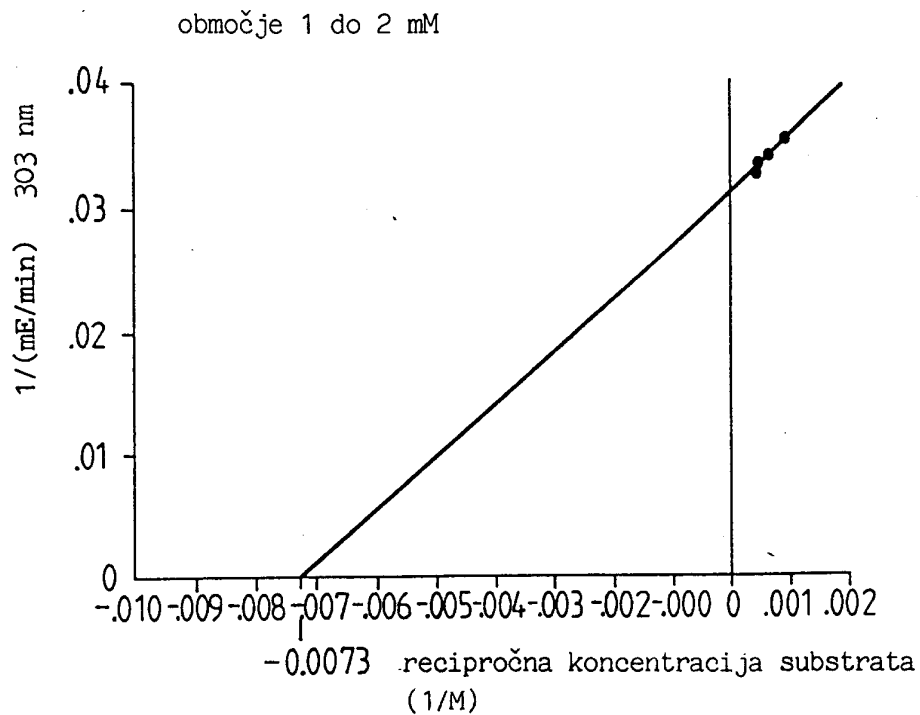


Fig. 5

Fenolazna reakcija s 3,4-dihidroksibenzenom

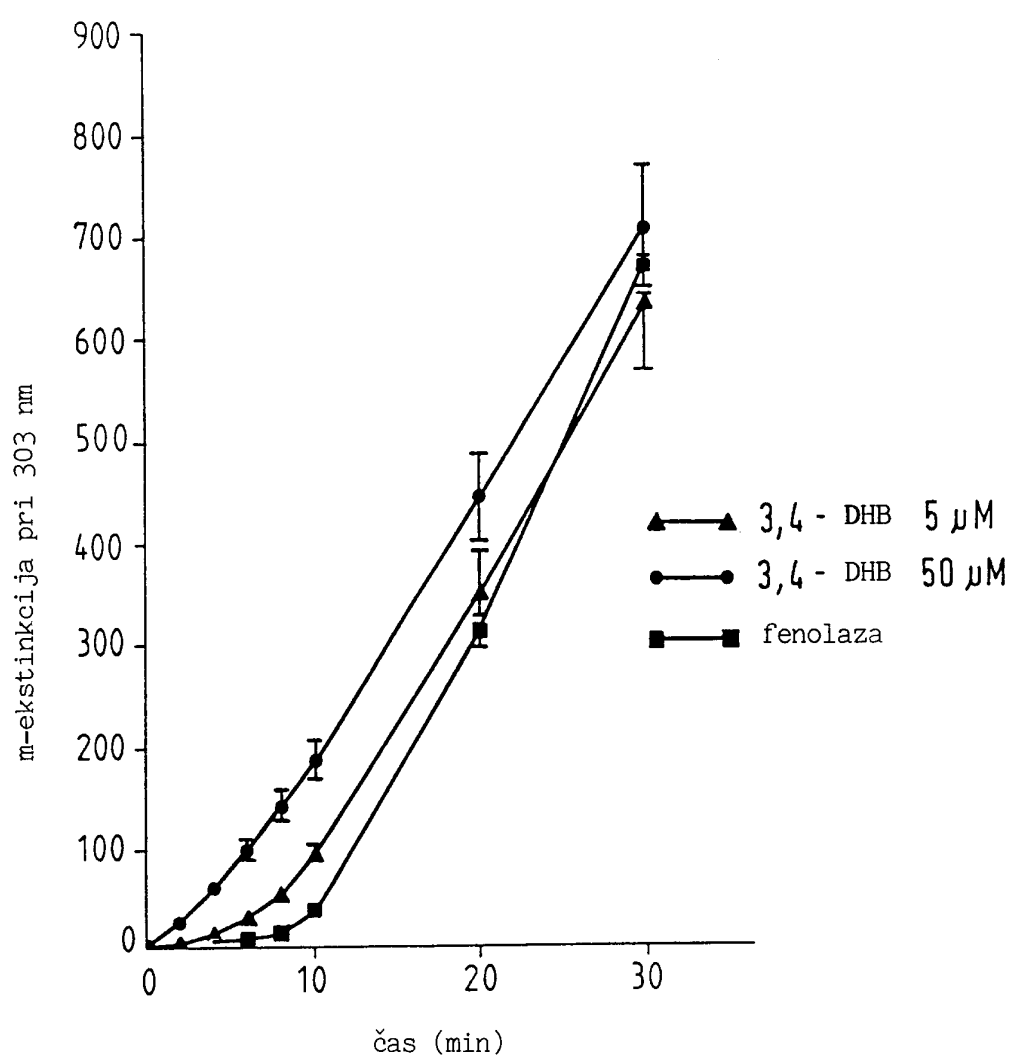


Fig. 6

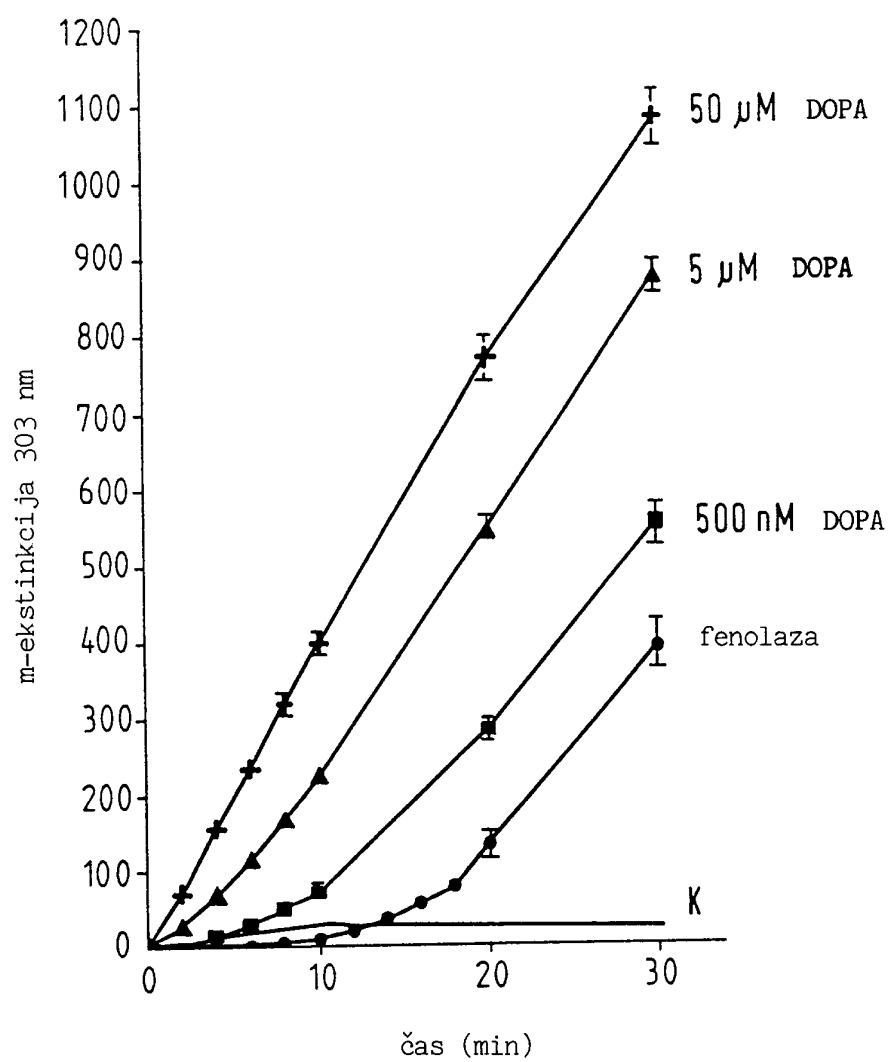


Fig. 7

Inhibicija dopamin- β -hidroksilaze

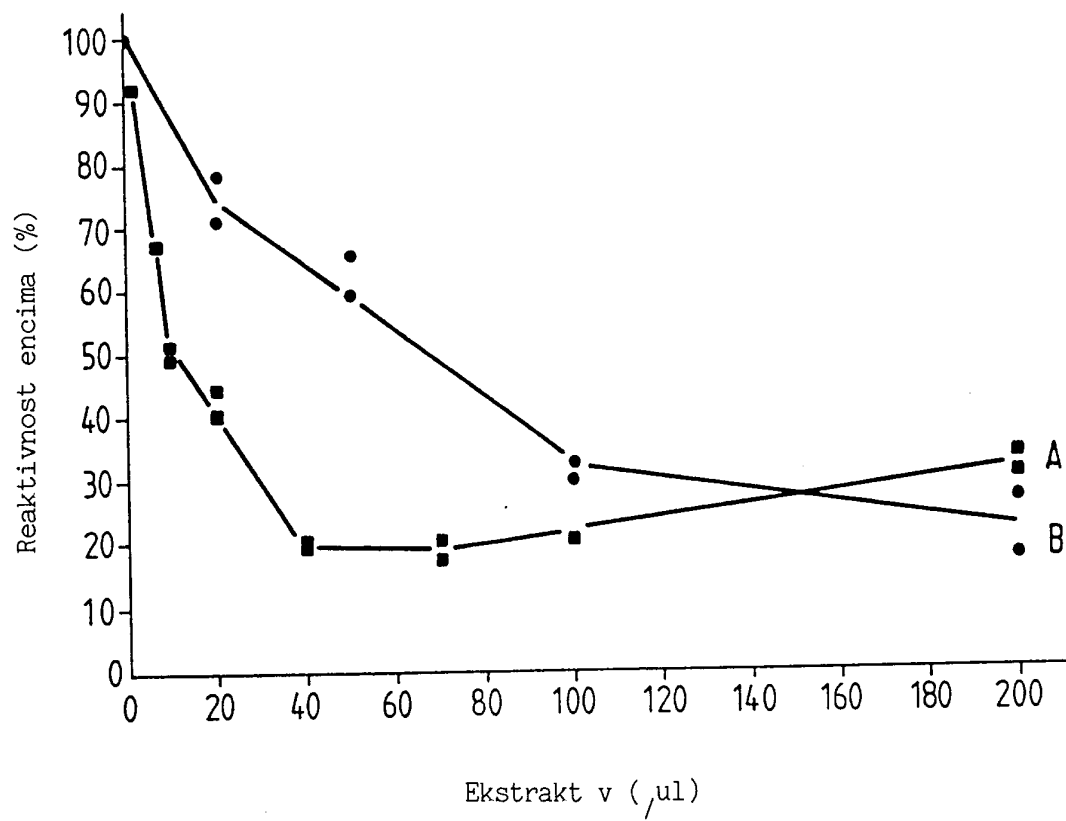


Fig. 8

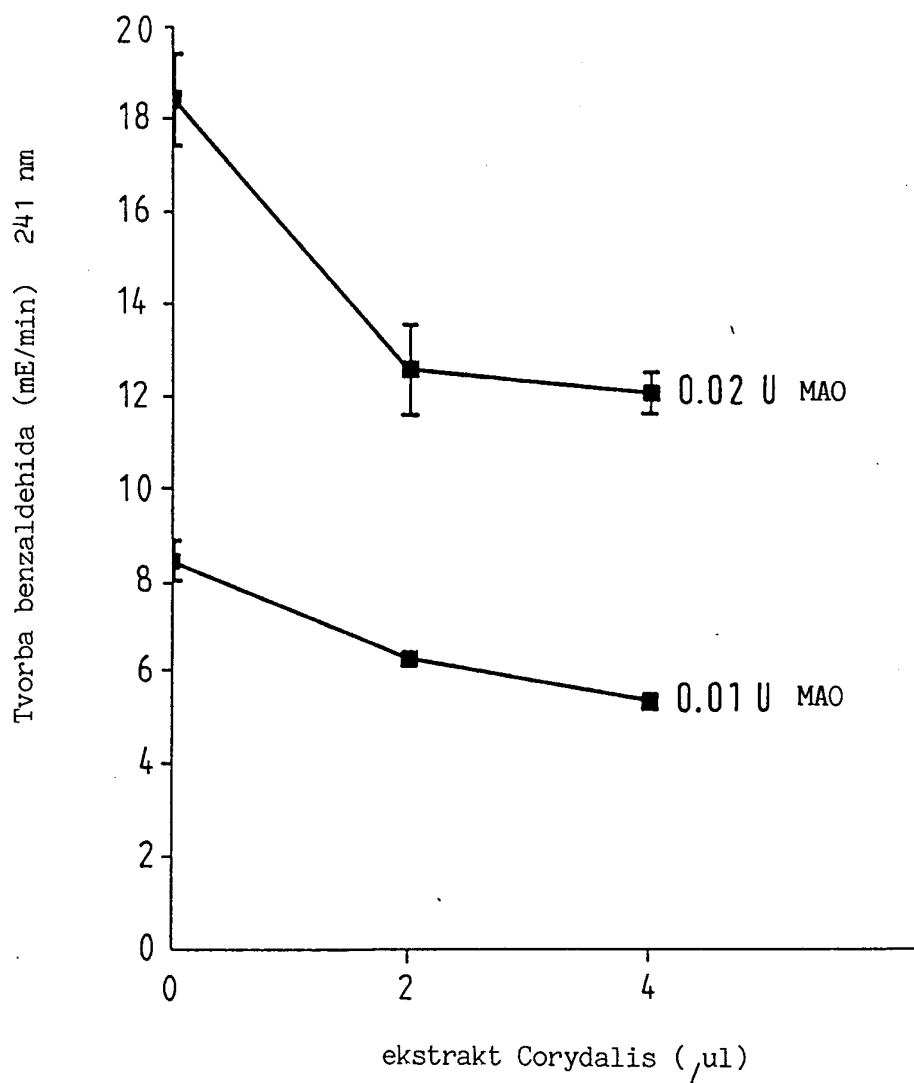


Fig. 9

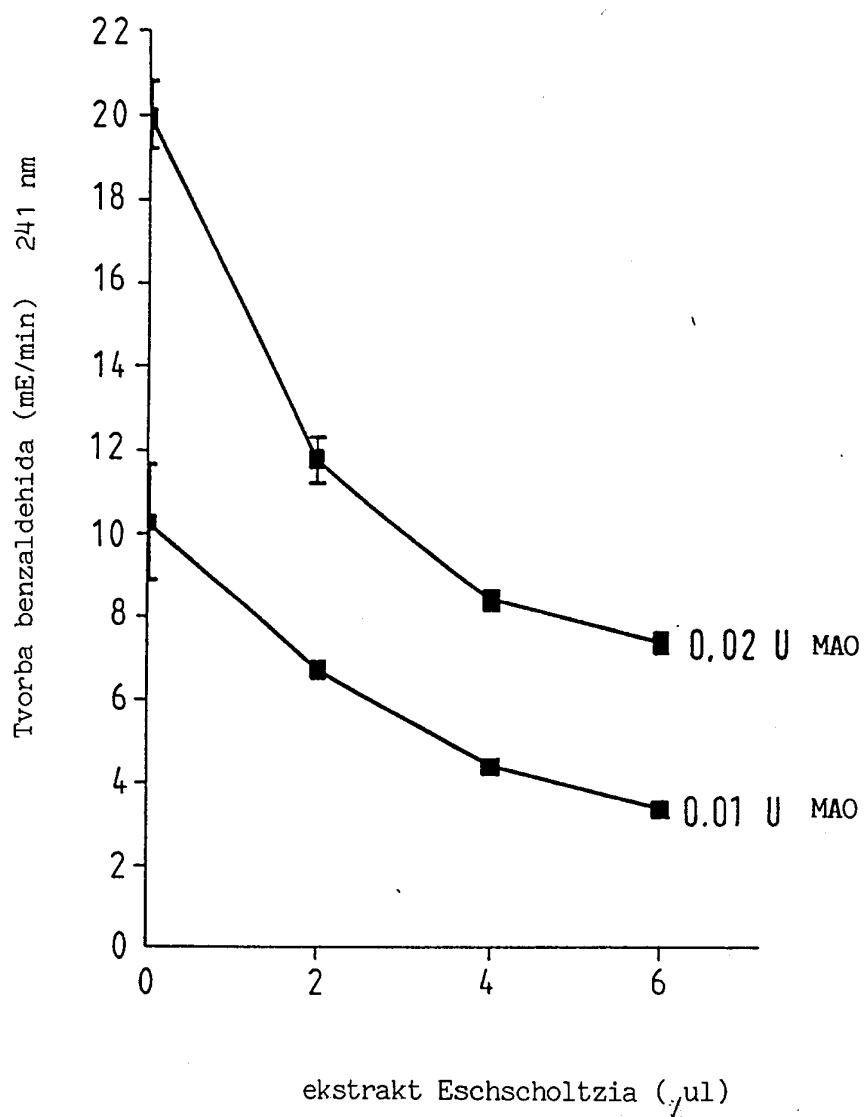


Fig. 10

