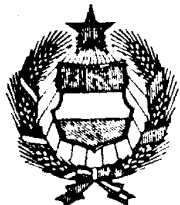


SZABADALMI LEÍRÁS

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

(11)

198035

B
Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,

C 07 D 31/62

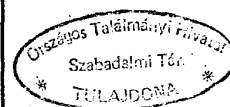
A 61 K 31/35

A bejelentés napja: (22) 1986. III. 7. (21) 3028/86

A bejelentés elsőbbsége: (33) JP
(32) 1985. III. 8.
(31) 60/85-44625

A közzététel napja: (41) (42) 1987. VI. 29.

Megjelent: (45) 1989. 10. 10.



Feltaláló(k): (72)

Nishioka Itsuo, Nonaka Genichiro, Fujiwara Michijiro,
Ueki Showa, Fukuoka, JP

Szabadalmas: (73)

Tsumura Juntendo Inc., Tokió, JP

(54) Eljárás új tannin-származékok és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására

(57) KIVONAT

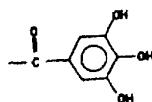
A találmány szerint az (I) általános képletű vegyületek elegyét állítják elő, a képletben
l 0 vagy 1-6 egész szám,
m 0 vagy 1,
n 0 vagy 1-6 egész szám, és
l+m+n = 6

R₁ hidrogénatom vagy G, emellett G jelentése az (a) képletű galloilcsoport, amelyből három csoport van jelen,

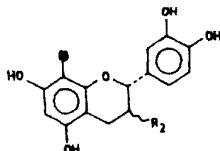
X egy (b) vagy (c) általános képletű csoport, a képletben R₂ OH, -OG vagy -OH, és

a fekete pontok kötés helyeket jelentenek, emellett kötés nem lehet az egyes egységekben a kölcsönös negyedik helyzetekben, és csak egy kötés van a negyedik helyzet és a hatodik helyzet között.

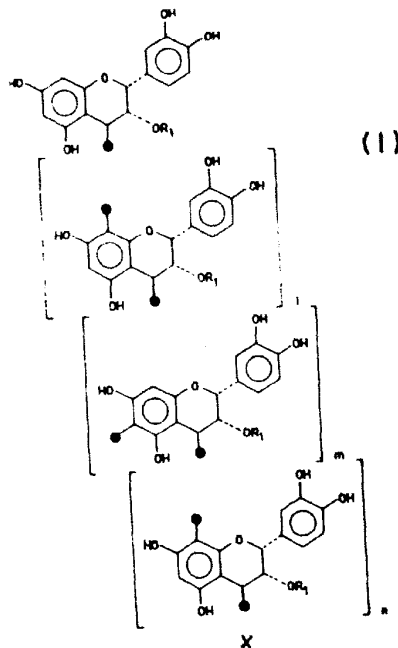
A találmány szerint előállított tannin-származékok és az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények elme-zavarok, így akut és krónikus szkizofrénia kezelésére alkalmazhatók.



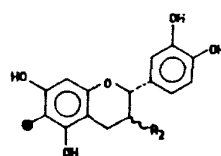
(a)



(b)



(1)



(c)

A találmány tárgya eljárás új tannin-származékok elegyének előállítására, amelyek elmezzavarok, így akut és krónikus szkizofrénia és hasonló kezelésére alkalmazhatók.

A Rhei Rhizoma egyfajta, már régebben ismert nyers drog, és a tradicionális kínai receptben (Kampo) gyakran használták. A Rhei Rhizoma eddig ismert tulajdonságai a baktérium elleni hatás, a vér karbamid-nitrogénjét csökkentő hatás és gyulladás elleni hatás. Az ilyen hatásokat biztosító anyagok kitermelése céljából eddig különféle keveréket és/vagy vegyületeket, így a sennoside A-t izolálták a Rhei Rhizomából. A Rhei Rhizomából izolált vegyületek között azonban egyáltalán nem voltak ismeretese olyan vegyületek, amelyek elmezzavarok kezelésére alkalmazhatók lettek volna.

A következő kémiai vegyületek voltak ismertek, mint a szkizofrénia kezelésére szolgáló elmezbajok elleni drogok:

a levomepromazin, klórpromazin, flufenazin és haloperidol erős hallucináció és érzécsalódás elleni hatást mutatnak, és a szulpirid enyhe szedatív hatású és hallucináció és érzécsalódás elleni hatású. Ezeket a szereket a beteg tüneteire és a betegség lefolyására reagálva, speciális jellegzetességeknek megfelelően, szelektíven használták. Jól tudjuk azonban, hogy ezek a gyógyszerek ártalmas hatásokat is kifejtenek, így extrapiramidális szindrómákat, így izommerevséget, diszkinéziát és parkinsonizmust, továbbá autonóm tüneteket, így a nyálfolysást, szájszárazságot és székrekedést. Ezért tehát régóta kíváncs volt kifejleszteni ártalmas hatások nélküli gyógyszert elmezzavarok kezelésére.

A találmány célja új tannin-készítmények előállítására.

A találmány másik célja a Rhei Rhizomából extrahált új tannin-készítmények előállítása.

A találmány egy további célja elmezzavarok ellen erős hatással rendelkező új tannin-készítmények előállítása, amelyek ártalmas hatások kifejtése nélkül alkalmazhatók akut és krónikus szkizofrénia kezelésére.

A találmány szerint előállított új tannin-származékok az (I) általános képletnek felelnek meg, a képletben

l 0 vagy 1–5 egész szám,
m 0 vagy 1,
n 0 vagy 1–6 egész szám, és
l+m+n=6,

R₁ hidrogénatom vagy G, emellett G jelentése az (a) képletű galloilcsoport, amelyből három csoport van jelen,

X egy (b) vagy (c) általános képletű csoport, a képletekben R₂ OH, -OG vagy -OH, és

• a fekete pontok kötéshegyeket jelentenek, emellett kötés nem lehet a kölcsönös negyedik helyzetekben az egyes egységekben és csak egy kötés van a negyedik és hatodik helyzet között.

A találmány szerint a fenti tannin-származékok elegyét a következő műveletekkel állítjuk elő:

a Rhei Rhizomából vízzel extraktumot készítünk, az extraktumot vagy folyadékkoncentrátumát gél-sűrűs kromatográfiával elkülönítjük, sorba egymás után vizet, vizes etanolt, etanolt és metanolt használva, így metanolos eluátumot állítunk elő,

a metanolos eluátumot, folyadékkoncentrátumát

vagy megszáritott szilárd maradékát gél-sűrűs kromatográfiával szétválasztjuk víz, etanol és acetone keverékével, s így eluátumot állítunk elő,

ezt az eluátumot nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiának alávetve (oszlop: Nucleosil 5C₁₈, Macherey-Nagel, 4 x 250 mm, mozgó fázis: 14–80% acetoneitril/víz (25 mmol oxálsav), áramlási sebesség: 1 ml/perc, oszlophőmérséklet: 40 °C) szétválasztjuk, így eluált frakciót állítunk elő 10–25 perc retenciós idővel,

és az eluátumból az oldószer eltávolítjuk.

A találmány szerint előállított fenti tannin-származékok hatásosak elmezzavarok, így akut és krónikus szkizofrénia kezelésére.

A találmány szerinti új tannin-származékok előállításához használt Rhei Rhizoma nyers drog formájában a kereskedelembe kapható. Az eredeti Rhei Rhizoma növény élő gyógynövény, amely a Polyonaceae családba tartozik.

A találmány szerint eljárva először extraháljuk a Rhei Rhizomát, vizet használva, így kapjuk az előállítani kívánt extraktumot. Ezt az extrakciós eljárást szobahőmérséklet és az extraháláshoz használt oldószer forráspontja közötti hőmérsékleten végezzük. A Rhei Rhizomát előzetesen előnyösen megporítjuk, ebben az esetben nagy extrakciós hatásfokot érünk el. A legajánlatosabb az extrahálást víz alkalmazásával, 12–24 órán át szobahőmérsékleten végezni. Ily módon a kapott extraktum a találmány szerinti tannin-származék mellett minimális szennyeződést tartalmaz. A fenti extrakciós eljárás 2–4-szer megismételve, nagyobb extrakciós hatásfokot érünk el.

A fenti extrakciós eljárásban kapott extraktumot közvetlenül alávetjük a gél-sűrűs kromatográfiának. De úgy is eljárhatunk, hogy az extraktumot koncentrálljuk, mielőtt azt kromatográfiának alávetnénk. A gél-sűrűs kromatográfiában előnyösen használható gélek például a Sephadex® (Pharmacia Fine Chemicals), MCI gel® (Mitsubishi kasei) és μ-Bondapak® (Waters Associates). Mint eluáló oldószereket egymás után vizet, vizes etanol-oldatot, etanolt és metanolt használunk. Abban az esetben, amikor MCI gel® vagy μ-Bondapak gél (kerül felhasználásra, a metanolt közvetlenül a víz bevezetése után vihetjük be. Ezzel az eljárással metanolos eluátumot kapunk.

A fenti eluálási eljárásban kapott metanolos eluátumot, ennek folyadék koncentrátumát vagy száritott szilárd maradékát gél-sűrűs kromatográfiának vetjük alá. A kromatográfia során, amelyhez a víz, etanol és acetone oldószerek közül legalább kettőnek a keverékét használjuk, eluátumot kapunk. A gél-töltetbe használt gélek például a Sephadex® (Pharmacia Fine Chemicals), MCI gel® (Mitsubishi kasei) és μ-Bondapak® (Waters Associates). Abban az esetben, amikor gél-töltetként Sephadex® kerül alkalmazásra, a legelőnyösebb oldószer az etanol, víz és acetone keveréke. Abban az esetben, amikor az oszlop töltete MCI gel®, akkor a legmegfelelőbb oldószer az etanol-víz keveréke. Ily módon az előállítani kívánt eluátumot kapjuk.

A fenti eljárásban kapott eluátumot úgy ahogy van, alávetjük nagyteljesítményű folyadékkromatográfiának (oszlop: Nucleosil 5C₁₈, Macherey-Nagel, 4 x 250 mm, a mozgó fázis 11–80% acetoneitril/víz (25 mmol oxálsav), áramlási sebesség 1 ml/perc, az oszlop hőmérséklete: 40 °C).

A 10–25 perc retenciós idővel eluált frakciót el

különítjük, így kapjuk az előállítani kívánt eluált frakciót.

Végül a fenti eljárásban kapott eluált frakcióból az eluáló oldószert csökkentett nyomáson végzett bepárlással eltávolítjuk, így a találmány szerint előállított tannin-származék elegyet izoláljuk.

A nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiában használt szivattyúk előnyösen például a Toyosoda CCPD Dual Pump (Toyosoda Kogyo), Waters 6000A-type Pump (Waters Associates), JASCO TRI ROTAR-VI Pump (Nihon Bunko kogyo), Hitachi 655-type Pump (Hitachi Seisakusho), stb. A nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiában használt detektorok előnyösen például Toyosoda UV-8 Modell II (Toyosoda kogyo), Waters Model 440 Absorbance detector (Waters Associates), JASCO UVIDEC-100-VI UV Spektrometer (Nihon Bunko kogyo), Hitachi 638-41-type Variable-wavelength UV Monitor (Hitachi Seisakusho), stb. A kimutatáshoz megfelelő hullámhossz 280 nm.

A tannin-származékok találmány szerinti előállítását közelebbről a példával szemléltetjük.

Példa

3 kg porított Rhei Rhizomat 15–25 liter ioncserélt vízbe beáztatunk és szobahőmérsékleten 12–24 órán át extraháljuk. Ezt az extrakciót háromszor végezzük el, így három egyforma extraktumot kapunk. Az egyesített extraktumokat csökkentett nyomáson 4 literre koncentrálnak. Ezt a koncentrátumot oszlop-gél-kromatográfiának alávetjük (Sephadex® LH-20/Pharmacia Fine Chemicals, 25–100 µm, 11x50 cm). Az oszlop eluálásához egymás után 20–20 liter vizet, víz-etanol (1:1) keveréket, etanolt metanolt és acetont (1:1) keveréket használunk, s így frakciókat kapunk. A bepárolt négy frakció kitermelése 525, 193, 67, illetve 47 g.

A 4. frakciót (36 g) alávetjük oszlop-gél-kromatográfiának (Sephadex® LH-20, 5,8 x 50 cm), és az oszlopot a következő, egyenként 4 liter, etanol-víz-aceton keverékekkel eluáljuk: 1:0:0, 19:0,5:0,5, 18:1:1, 17:1,5:1,5, 16:2:2, 15:2,5:2,5, 14:3:3, 13:3,5:3,5, 12:4:4, 11:4,5:4,5, 10:5:5, 8:6:6, 0:1:1. A kapott 13 eluátomat egyesítve alávetjük nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiának (szivattyú: TOYOSODA CCPD Dual Pump, detektor: TOYOSODA UV-8 Modell II, oszlop: Nucleosil 5C₁₈, Macherey-Nagel, 4 x 250 mm, mozgó fázis: 14–80% acetonitril/H₂O (25 mM oxálsav), áramlási sebesség: 1 ml/perc, oszlophőmérséklet: 40 °C, abszorpció: 280 nm-en). A 10–25 perc retenció idővel eluált frakciót elkülönítjük. Az elválasztott frakcióból az oldószert lepárlással eltávolítjuk, így végtermékként 15,6 g tannin-származékot állítunk elő.

Gyógyszerészeti kiértékelés

A kísérleti anyagot sóoldatban (0,9%-os NaCl) feloldjuk és egyetlen dózist használó kísérletben patkányoknak i.p. vagy p.o. beadjuk. A kontrollcsoportnak csak sóoldatot (i.p.) vagy vizet (p.o.) adunk be.

1. Kísérlet

8–8 darab, 5–6 hetes, him SD patkányt használunk minden egyes i.p. dózishoz (0,5, 10, 20 és 50 mg/kg). Az ún. open field tesztben a kísérleti anyag a dózistól függően csökkent a mozgási aktivitást és a

felállást.

A fentiek igazolják, hogy a kísérleti anyag szedatín hatású.

2. Kísérlet

8–8 darab, 5–6 hetes, him SD patkányt használunk minden egyes i.p. dózishoz (0,1 és 2 mg/kg). A kísérleti anyagot 1 órával korábban beadjuk, mint a d-metamfetamint (1 mg/kg s.c.). Ismeretes, hogy a d-metamfetamin az állatoknál abnormális viselkedést idéz elő. Az 1 és 2 mg/kg kísérleti anyag gátolta a d-metamfetamin által indukált mozgási hiperaktivitást (lásd: 1.A és 1.B ábra).

A kísérletekből világosan kitűnik, hogy a kísérleti anyag metamfetamin elleni hatással rendelkezik. Ez az inhibitor-hatás kétszer erősebb, mint a klórpromaziné.

3. Kísérlet

10–10 darab, 5–6 hetes, him Wistar-king A patkányt használunk minden egyes csoportban. Ezeknek a patkányoknak a szaglógumóit eltávolítottuk (O.B. patkányok), ami agresszív viselkedést eredményezett. A kísérleti anyag hatásait a szaglógumó kimetszésével előidézett agresszív viselkedési módokra a következő 6 paraméter alapján értékeltük ki:

1. támadás: támadási reakció, ha az állat orra elé botot tartunk,
2. ütés: ugrási vagy ijedtségi reakció, ha az állat hátsó részére ütünk,
3. becsípés: menekülési vagy támadási reakció, ha az állat farkát becsípjuk,
4. megfogás: küzködési reakció, ha az állatot meg akarjuk fogni,
5. vokális: az állat hangot ad a megfigyelési időszak alatt,
6. egérlés: az állat egérlő.

Ezeket a paramétereket 0–4 osztályzattal értékeltük ki. (0 pontszám = nincs reakció, 4 pontszám = maximális reakció). A végső eredményt a 6 paraméter pontszámainak az összeadásával számítottuk ki. A kísérleti anyag 1, 2 és 5 mg/kg i.p. dózisokban beadva jelentősen csökkentette az agresszív viselkedések összes pontszámát (2. ábra). Ez a hatás körülbelül 6 órán át tartott. Ha a kísérleti anyagot 10 és 20 mg/kg orális dózisokban adtuk be, akkor ezek a fenti i.p. beadással elértékhez hasonló gátló hatásokat eredményeztek.

A fenti eredmények azt igazolják, hogy a kísérleti anyagok agresszivitás elleni hatásúak.

Ez a gátló hatás tízszer erősebb, mint a haloperidol és kétszer erősebb, mint a klórpromaziné.

A fenti három kísérlet során katelepszia (merevség), ataxia (a mozgás koordinációjának a hiánya) és izomrelaxáció (izomelernyedés) nem volt megfigyelhető.

Toxikológiai kiértékelés

A kísérleti anyag LD₅₀-értékeit, egérben a következő táblázat szemlélteti. A kísérleti anyagot sóoldatban oldottuk fel, kivéve az orális beadást, amikor az oldószert víz volt.

A kísérleti állatok 4 hetes ddY him egerek (n=10) voltak.

A beadás módja	LD ₅₀ (mg/kg)
Intravénás beadás	70,9
Intraperitoneális beadás	369,4
Orális beadás	> 1000
Szubkután beadás	> 1000

Az összes fenti eredmény azt szemlélteti, hogy a kísérleti anyagok emberekben bizonyos elme-zavarok kezelésére alkalmazhatók.

A találmány szerint előállított tannin-származékok felhasználásával gyógyszereket állíthatunk elő számos különböző formában, így folyadék, por, granulált por, pirula, tableta, enterális bevonatú tableta és kapszula alakjában, a szokásos eljárásokkal, a megfelelő oldószerekkel, kötő- és segédanyagokkal stb. együtt. Ezeket a gyógyszereket előírás esetén más gyógyszerhatóanyagokba keverhetjük. Orális beadásra a gyógyszerkészítmények felírhatók folyadék, por, granulált por, pirula, tableta, enterális bevonatú tableta és kapszula alakjában, legalább egy kötőanyag, így keményítő, laktóz, szacharóz, mannit vagy karboxi-metil-cellulóz alkalmazásával. A fenti gyógyszerkészítmények előállításához használhatunk még síkosító anyagokat, így magnézium-sztearátot, nátrium-laurátot és talkumot, kötőanyagokat, így dextrint, kristályos cellulózt, polivinil-pirrolidont és zselatint, a szétesést elősegítő anyagokat, így burfonyakeményítőt és karboxi-metil-cellulózt. A találmány szerinti tannin-származékok beadhatók szuszpenzió, emulzió, szirup vagy elixír alakjában, amelyek illatanyagokat és színezékeket is tartalmazhatnak.

Injektálható gyógyszerkészítmények előállítása esetében hígítóként használhatunk injektálható növényi olajokat, propilén-glikol vagy polietilén-glikolt. Szükség esetén adhatunk még a készítményekhez izotóniás anyagokat, stabilizátorokat, antiszeptikumokat és fájdalomcsillapítókat. Az injektálható hatóanyagokat előnyösen sterilizált injektáló közegben oldjuk fel.

A találmány szerinti eljárással előállított termék ¹³C-NMR spektrumát a 3. ábra mutatja be.

A ¹³C-NMR-spektrum adataiból az a következőt vonható le, hogy

a) a termék az (I) általános képletnek megfelelő gyűrűs szerkezeti egységeket tartalmazza, és

b) galloilcsoportok vannak jelen.

Ezt követően a terméket tannázzal hidrolizálva galluszsvavat kaptunk.

A galluszsav kitermelése és a galluszsvától mentes maradék alapján meghatároztuk a molekula galluszsav tartalmát, amiből az adódott, hogy három galluszsav-rész van a molekulában.

A termék tiolízisével – o-toluoltióllal – megállapítottuk, hogy a (+)-katechinból, (-)-epikatechinből és 3-o-galloil-(-)-epikatechinből tevődik össze.

5

A tiolízist megszakítva két olyan dimer jelenléte mutatható ki, amely 4–6 és 4–8 kötések létezésére utal.

A termék HPLC-kromatográfiájával és ismert molekulatömegű monomerrel, dimerrel, trimerrel, tetramerrel és pentamerrel azonos körülmények között összehasonlítva a mért retenciók idői alapján meghatároztuk a molekulatömeget (4. ábra).

Az eredmények azt igazolták, hogy a találmány szerinti eljárással előállított termék az (I) általános képlettel meghatározható vegyületek elegye (637 egyedi vegyületből áll).

10

15

Szabadalmi igénypontok

1 Eljárás az (I) általános képletű új okta-mer tannin-származékok elegyének előállítására – a képletben

20

10 vagy 1–6 egész szám,

m – vagy 1,

n – vagy 1–6 egész szám, és

l, m és n összege 6,

R₁ hidrogénatom vagy G, emellett G jelentése az

25

(a) képletű galloilcsoport,

X egy (b) vagy (c) általános képletű csoport, a képletben R₂ OH, OG vagy -OH,

• a fekete pontok kötés helyeket jelentenek, emellett a kötés az egyes egységekben a kölcsönös negyedik helyzetektől eltérő helyzetű, és csak egy kötés van a negyedik helyzet és a hatodik helyzet között, és összesen három galloilcsoport van jelen –

30

a z z a l j e l l e m e z v e , h o g y

Rhe1 Rhizomát vízzel extrahálunk,

az extraktumot vagy koncentrátumát gél-sűrűsítés kromatográfiával egymás után vízzel, vízes etanollal, etanollal és metanollal eluálva szétválasztjuk,

35

a metanolos eluátumot, koncentrátumát vagy száraz maradékát gél-sűrűsítés kromatográfiával víz, etanol és acetán oldószerszerrel eluálva szétválasztjuk,

a kapott eluátumot nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiának alávetve – amelynél az oszlop Nucleosil 5C₁₈ (Macherey-Nagel 4x250 mm), a mozgó fázis 14–80% acetonitril) víz (25 mM oxálsav), az áramlási sebesség 1 ml/perc, és az oszlop hőmérséklete 40 °C – szétválasztjuk és a 10–25 perc retenció idővel eluált frakciót elkülönítjük, és

45

a fenti eluált frakcióból az oldószert eltávolítjuk.

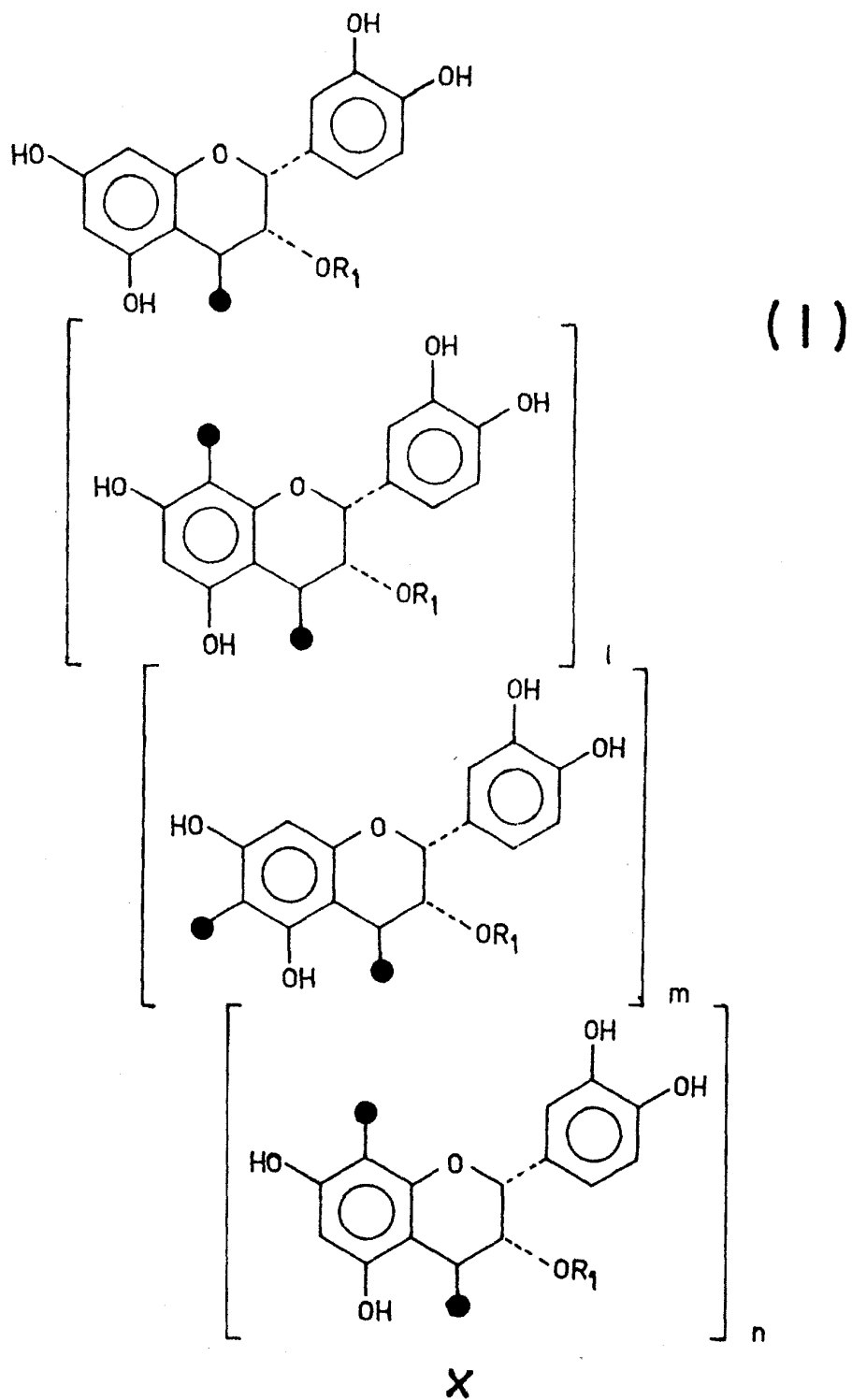
2. Eljárás az (I) általános képletű vegyületek elegyét – a képletben l, m, n, R₁, X és • az 1. igénypon:ban megadottak – hatóanyagként tartalmazó, elme-zavarok, így akut és krónikus szkizofrénia kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , h o g y a z 1. igénypont szerinti eljárással előállított hatóanyag elegyet a gyógyszerkészítmények szokásos hordozó-, hígító-, töltő és/vagy egyéb segédanyagaival együtt elkészítjük.

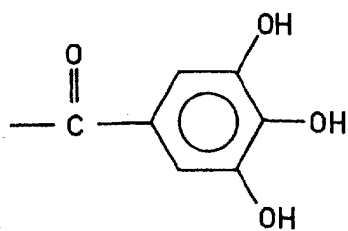
50

7 db rajz

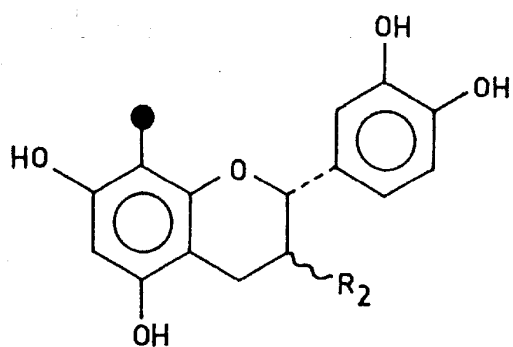
Kiadja: Országos Találmányi Hivatal
Felelős kiadó: Himer Zoltán o.v.

KÓDEX

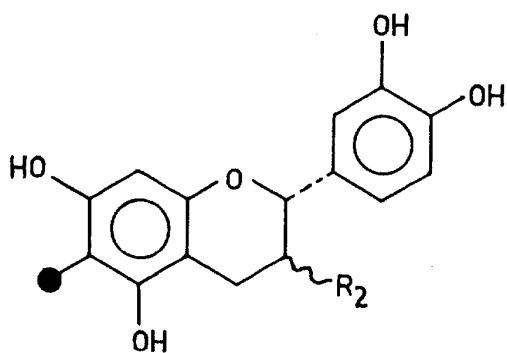




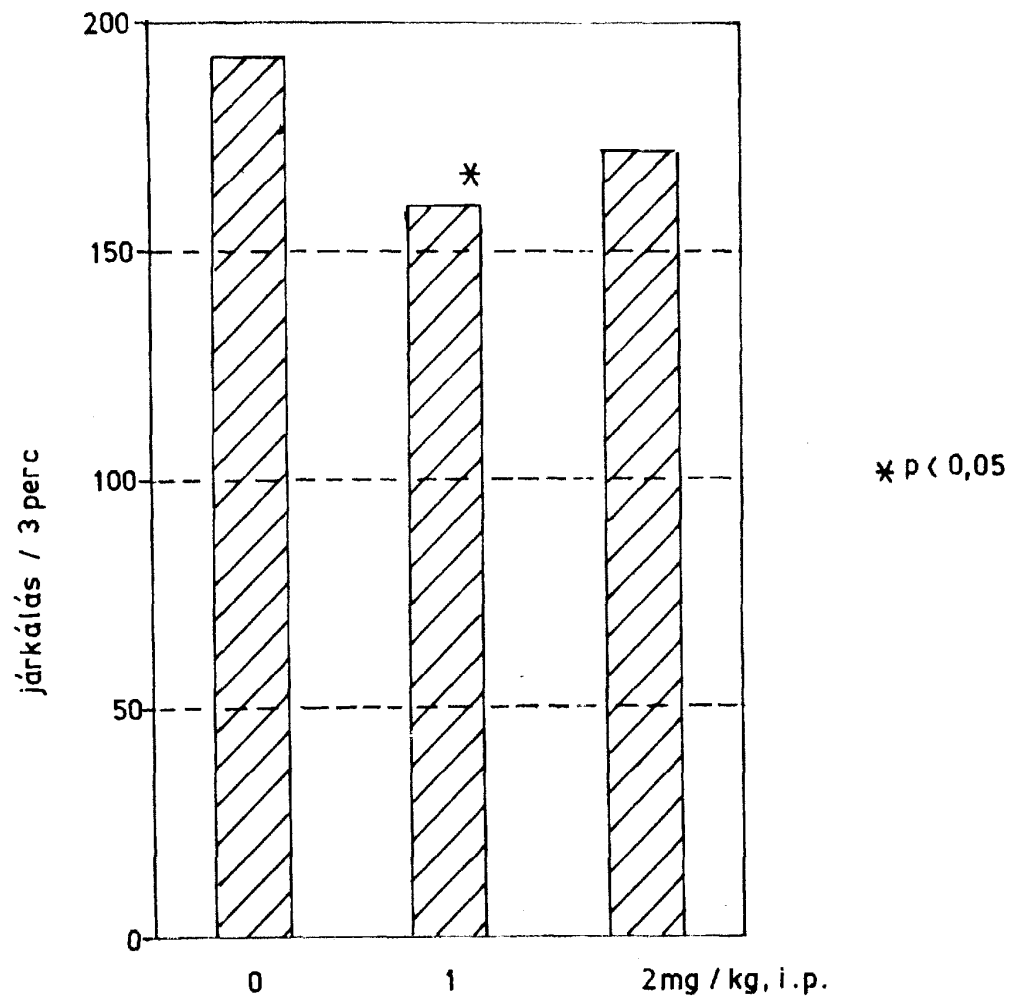
(a)



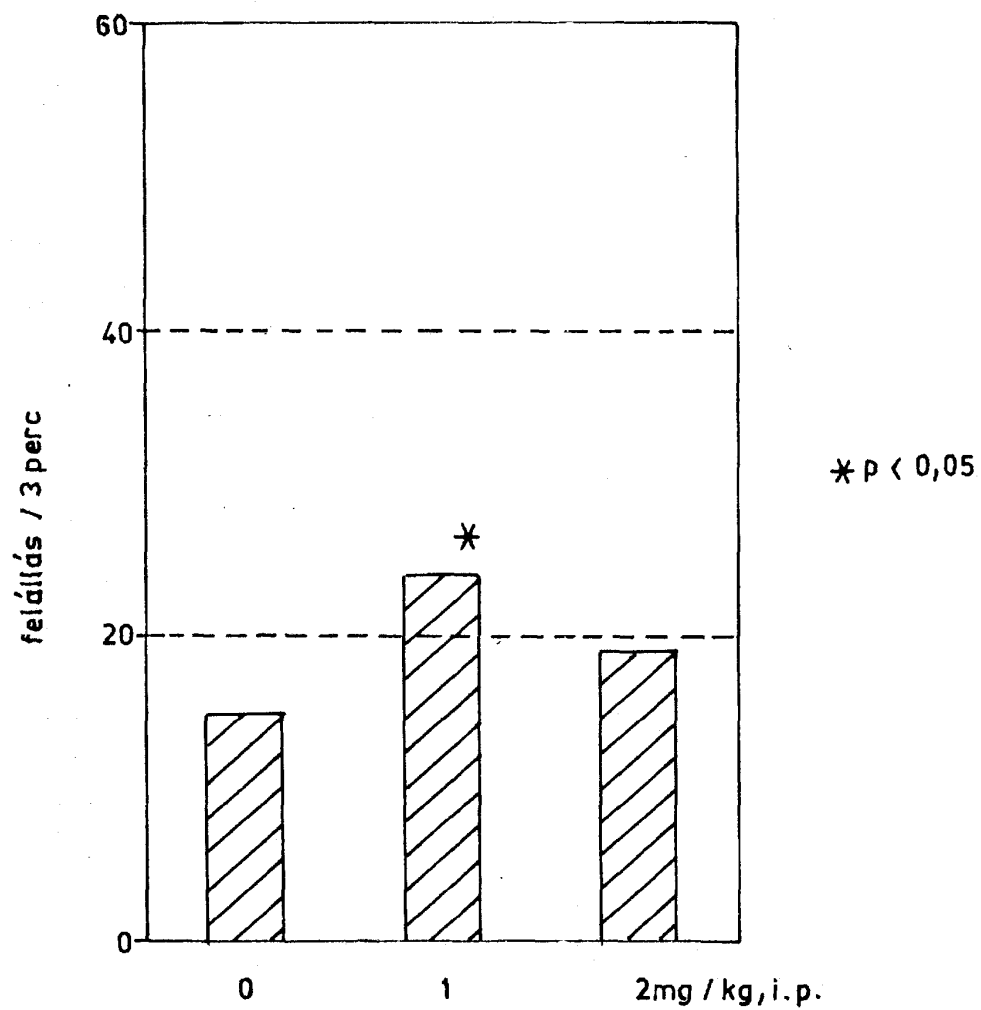
(b)



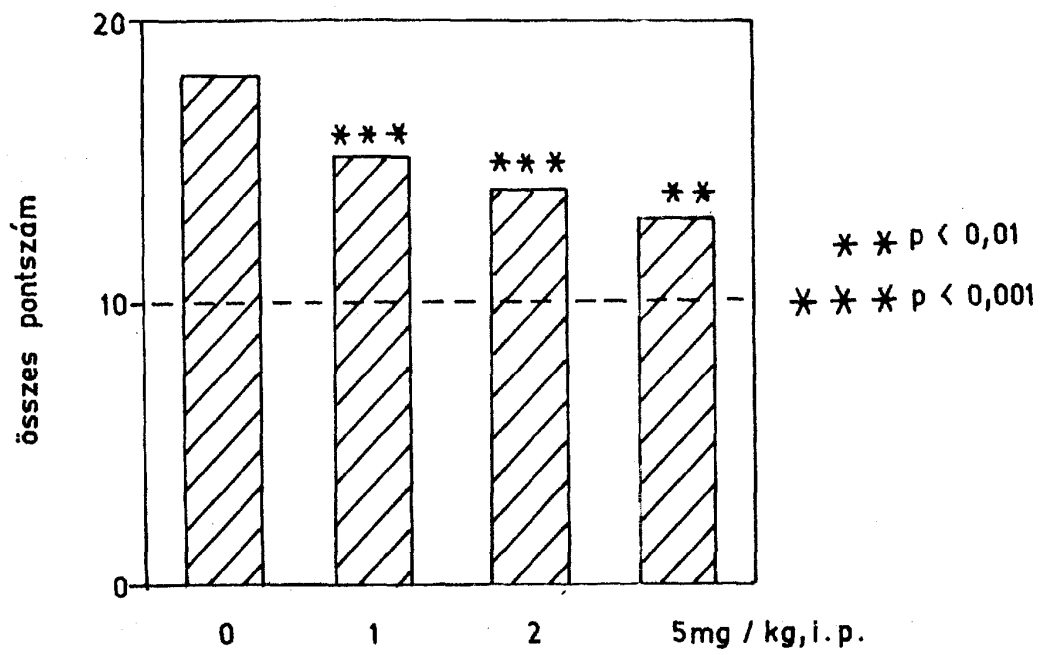
(c)



1A. ábra

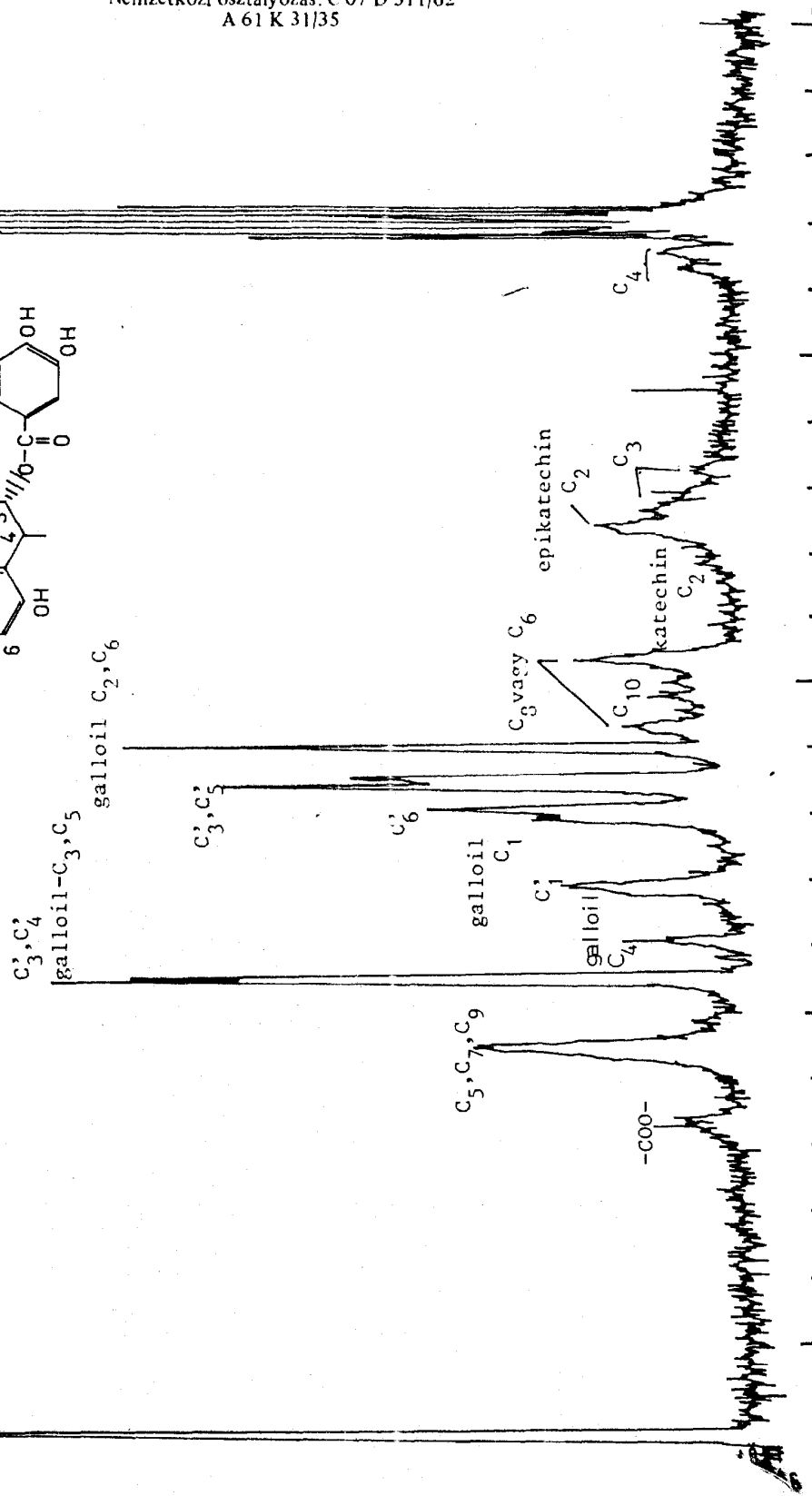
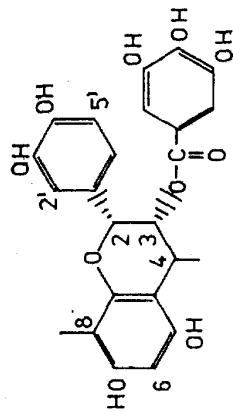


1B. ábra



2. ábra

3. ÁBRA



4. ÁBRA

