

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4562

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.06.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/MI001312**

(33) Země priority: **IT**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.06.2001**
(Věstník č. 6/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03880**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/64388**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C 49/653

C 07 C 49/753

A 61 K 35/78

(71) Přihlašovatel:

INDENA S. P. A., Milano, IT;

(72) Původce:

Bombardelli Ezio, Milano, IT;

Morazzoni Paolo, Milano, IT;

(74) Zástupce:

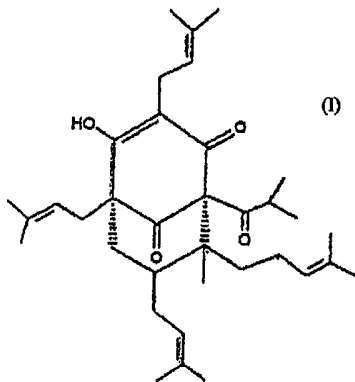
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Hyperforinové deriváty, jejich využití a
přípravky je obsahující**

(57) Anotace:

Nové deriváty obecného vzorce I, vykazující zvýšenou stabilitu a lepší farmakologické vlastnosti, které lze využít pro přípravu farmaceutických přípravků použitelných jako antidepresiva.



Hyperforinové deriváty, jejich využití a přípravky je obsahující

Oblast techniky

Vynález se týká nových hyperforinových derivátů, jejich využití pro léčení depresí a úzkostních stavů, stejně jako přípravků, které je obsahují.

Dosavadní stav techniky

Kvetoucí vrcholky *Hypericum perforatum* obsahují mnoho tříd strukturně odlišných látek působících přímo nebo nepřímo na centrální nervový systém.

Konkrétně zmíněné sloučeniny zahrnují hypericin, hyperforin a dimerní flavony, které vykazují antidepresivní a anxiolytické působení na zvířata a lidi.

Mechanismy působení těchto sloučenin jsou různé: anti-MAO působení, působení na uvolňování serotoninu a aktivita podobná působení benzodiazepinu.

Hyperforin, který je jednou z hlavních složek lipofilní frakce kvetoucích vrcholků *Hypericum perforatum*, byl v nedávné době předmětem četných studií, které potvrdily jeho důležitou roli jako antidepresiva, studie prováděné autory tohoto vynálezu prokázaly, že tato molekula má aktivitu podobnou serotoninu.

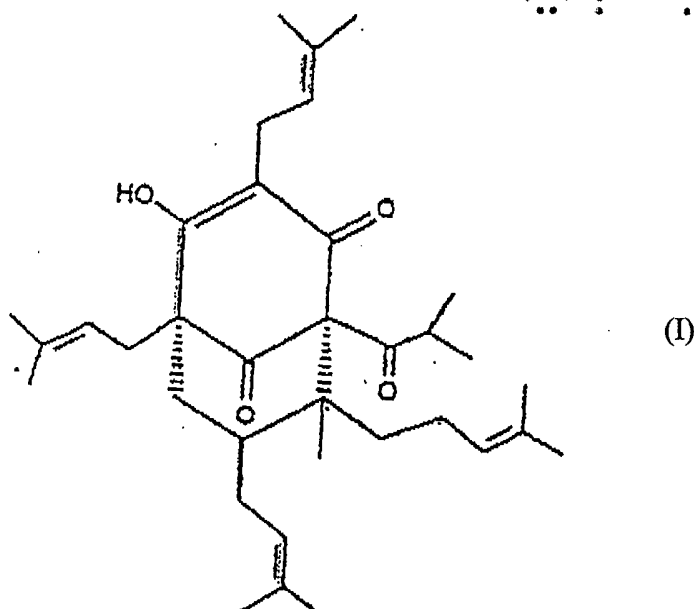
Hyperforin není příliš stabilní za normálních okolností extrakce a konzervace, podle WO 97/13489 (Schwabe), obsah hyperforinu ve vodně alkoholickém extraktu *Hypericum perforatum* již po několika týdnech klesá téměř na nulu.

Podle WO 97/13489 aby se získal stabilní extrakt s konstantním obsahem hyperforinu, měla by být extrakce, čištění a konzervace prováděna v přítomnosti antioxidantů jako jsou vitamín C a jeho estery, sulfátované aminokyseliny a pod.

Vysoká nestabilita hyperforinu činí tedy přípravu přípravků poněkud obtížnou.

Podstata vynálezu

Nyní byly nalezeny hyperforinové deriváty, které jsou stabilní a aktivnější jako antidepresiva v určitých farmakologických testech. Deriváty podle tohoto vynálezu mají následující obecný vzorec I:



kde R je:

- nasycená nebo nenasycená, rovná nebo rozvětvená C_1 až C_{22} acylová skupina, případně mající jeden nebo více substituentů, které mohou být stejné nebo rozdílné, vybrané ze skupiny obsahující atomy halogenů, nitro, amino, C_1 až C_6 alkylamino, di- C_1 až C_6 alkylamino, C_1 až C_6 acylaminoskupiny,
- cykloalifatický nebo aromatický acylový zbytek, ve kterém má aromatická skupina případně jeden nebo více substituentů, které mohou být stejné nebo rozdílné, vybrané ze skupiny obsahující atomy halogenu, hydroxy, methoxy, aminoskupiny,
- zbytky glycidů, ve kterých jsou jedna nebo více hydroxylových skupin případně alkylovány nebo acylovány.

„Aromatický acylový zbytek“ s výhodou označuje benzoylový nebo cinnamoylový zbytek, mající jeden nebo více amino nebo alkoxy skupin.

„Zbytek glycidu“ označuje zbytek jednoho cukru, vázaný etherovou vazbou k hydroxylové skupině v poloze 1 pyranosylového nebo furanosylového kruhu, přičemž ostatní hydroxylové skupiny cukru jsou případně methylovány nebo acetylovány.

Preferované R skupiny jsou acetyl, monochloracetyl, butyryl, γ -aminobutyryl, p-aminobenzyl, trimethoxybenzyl, trimethoxycinnamyl, β -glukosyl a β -galaktosyl.

Hyperforinové deriváty podle tohoto vynálezu mohou být připraveny pomocí konvenčních způsobů acylací nebo glykosylací hydroxylových skupin.

Například, prakticky čistý hyperforin nebo extrakt obohacený hyperforinem může být podroben reakci s chloridy kyselin nebo anhydridy kyselin $RCOOH$ (R je definováno výše) ve vhodných rozpouštědlech jako je třeba pyridin.

Na druhé straně, glykosilace může být provedena s využitím vhodně chráněných reaktivních derivátů požadovaného cukru (ROH), např. α -D-glukopyranosylbroid tetraacetát.

Podle obzvláště výhodného aspektu tohoto vynálezu se sloučeniny I připravují extrakcí květních vrcholků *Hypericum perforatum* s oxidem uhličitým za superkritických podmínek, následným rozdělením mezi rozpouštědla a derivatizací hyperforinu ve vzniklém extraktu.

Listy a květní vrcholky *Hypericum perforatum*, jednotlivě nebo ve směsi, obvykle jako přírodní směs, jsou extrahovány s oxidem uhličitým za superkritických podmínek pod tlakem 180 až 260 barů, s výhodou 240 barů a při teplotách v rozmezí od 35 do 50 °C, s výhodou 40 °C. Získává se lipofilní extrakt obsahující asi 50 % hyperforinu. Extrakt obsahuje značné množství xanthonů, vosků, mastných kyselin a triglyceridů. Obsah hyperforinu se následně zvyšuje podle dalšího aspektu tohoto vynálezu, rozpouštěním vzniklého extraktu v methanolu nebo ve vodném acetonitrilu a poté extrahováním roztoku s n-hexanem nebo alifatickými uhlovodíky. Uhlovodíková fáze obsahuje nežádoucí látky, které se odstraňují, hydrofilní fáze se naředí asi stejným množstvím vody a alifatickými uhlovodíky. Extrakt *Hypericum perforatum* získaný zakoncentrováním lipofilní fáze, může být použit pro přípravu derivátů podle výše uvedeného popisu.

Deriváty podle tohoto vynálezu nevykazují žádnou aktivitu na receptory *in vitro*, zatímco jsou obzvláště aktivní *in vivo*, kde vykazují silnou antidepresivní aktivitu závislou na dávkování.

V *in vivo* testech na myších a krysách vykazaly sloučeniny podle tohoto vynálezu vyšší aktivitu než hyperforin a ethanolický nebo methanolický extrakt z *Hypericum*.

Jako *in vivo* testy k ověření antidepresivního působení byl vybrán test rozvoje únikového deficitu a inhibice spotřeby ethanolu v krysách sardinských krysách preferujících alkohol podle modelů známých v literatuře.

V testu rozvoje únikového deficitu vykazují sloučeniny podle tohoto vynálezu vyšší aktivitu než známé extrakty a aktivitu srovnatelnou s aktivitou známých medikamentů jako je imipramin. V tomto testu jsou krysy upoutány a podrobeny jemným, krátkým, nevyhnutelným elektrickým šokům po dobu 50 min (předběžný test). Po dvaceti čtyř hodinách jsou zvířata testována na jejich schopnost vyhybat se stimulům na jejich ocasu za situace, kdy je únik nemožný. Krysa v průměru učiní 26 úniků ze 30 stimulů (kontrolní vzorek), zatímco zvířata podrobená předběžnému testu učiní pouze 1 až 3 úhybných úniků (ED vzorek). Hyporeaktivita indukovaná předběžným testem není vyvolána u krys, kterým byly předem 1 až 3 týdny podávány antidepresiva jako je imipramin nebo fluoxetin. Sloučeniny podle tohoto vynálezu podávané

krysám jednu hodinu před vystavením nevyhnutelným stresům, způsobují zvýšení reaktivity při únikových testech, která je vyšší v případě, že byly sloučeniny podávány 1 až 2 týdny.

Například, podává-li se krysám sloučenina I, kde R je acetyl, vede to k výsledkům popsaným v následující tabulce:

Tabulka: Antidepresivní působení Hyperforin acetátu na krysy v únikovém testu s předchozím dvoutýdenním podáváním.

Sloučenina	Dávka (mg/kg)	Počet úniků
Hyperforin acetát	6,25	12,6 ± 2,8
Hyperforin acetát	12,5	17,3 ± 1,9
Hyperforin acetát	25,0	21,2 ± 1,3
Hyperiko alkoholický extrakt	1000	15,6 ± 2,4
Hyperiko hexanový extrakt	600	16,9 ± 1,2
ED vzorek		2,6 ± 0,7
Kontrolní vzorek		23,6 ± 1,2

Statistická analýza: Kruskal-Wallis bez parametrů

ANOVA KW = 13,462 p = 0,0012

Hypericum alkoholický extrakt a

hexanový extrakt versus kontrolní vzorek p < 0,01

Hyperforin acetát 25 mg versus kontrolní vzorek n.s.

Kontrolní vzorek versus AND p < 0,01

V testu redukce spotřeby alkoholu u sardinské krysy (což je index deprese a úzkosti) podle způsobů známých z literatury, indukují sloučeniny podle tohoto vynálezu po dvoudenním podávání 60 až 75 % snížení spotřeby alkoholu na úkor vody ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Sloučeniny obecného vzorce I mohou být formulovány do měkkých želatinových kapslí, tuhých želatinových kapslí, tablet, čípků, s výhodou jsou sloučeniny podle tohoto vynálezu formulovány do měkkých želatinových kapslí nebo do přípravků s řízeným uvolňováním. Dávky sloučenin v přípravcích se pohybují od 5 do 50 mg na dávku v obvyklých přípravcích a až do 200 mg v přípravcích s řízeným uvolňováním, v tomto případě je preferovaná dávka 200 mg denně.

Příklady provedení vynálezu

Příklady dále uvedené ilustrují detailněji tento vynález.

Příklad 1: Příprava Hyperforinem obohaceného extraktu

10 kg biomasy *Hypericum perforatum* bylo extrahováno podle níže popsané procedury, v 25 l extrakční nádobě pro superkritické plyny, vybavené dvěma separátory.

10 kg květních vrcholů *Hypericum perforatum*, mechanicky sušených po sebrání při teplotách nepřevyšujících 60 °C jsou vytlačeny do tvaru kostek aby došlo k rozbití buněk a byly extrahovány s CO₂ za superkritických podmínek za následujících experimentálních podmínek:

- teplota: 45 °C v extraktoru, 30 °C v prvním separátoru a 20 °C ve druhém separátoru,
- tlak: 240 barů v extraktoru, 100 barů v prvním separátoru a 50 barů ve druhém separátoru.

Tok CO₂ byl 10 l za minutu po dobu 45 minut. Extrakt byl zakoncentrován ve druhém separátoru, zatímco většina vody přítomná v rostlinné hmotě byla zkoncentrována v prvním separátoru. Extrakt přítomný v druhém separátoru se rozpustí v 3,2 l methanolu a tento roztok se extrahuje s 3 x 1,5 l n-hexanu.

Hexanová fáze byla protiproudě promyta s 98 % methanolem s využitím hyperforinu jako značky, která by měla zůstat v methanolové fázi. Hexanová fáze byla odstraněna, zatímco methanolové fáze byly spojeny a naředěny s 0,6 l vody a znovu extrahovány s 2 x 0,6 l n-hexanu.

Spojené hexanové fáze byly odbarveny s 0,3% aktivního uhlí, sušeny nad Na₂SO₄, poté zkoncentrovány za vakua při teplotách nikoliv nad 40 °C za vzniku oleje. Bylo získáno 0,22 kg voskového extraktu, majícího obsah hyperforinu kolem 70 %.

Příklad 2: Syntéza hyperforin acetátu

K roztoku 12 g rostlinného extraktu získaného v Příkladu 1 ve 48 ml pyridinu byl přidán acetanhydrid (9,8 ml) a roztok byl míchán při laboratorní teplotě. Reakce byla sledována pomocí TLC (hexan: EtOAc 95:5, R_f hyperforinu: 0,24, R_f acetátu: 0,49). Po 24 h byla reakční směs naředěna vodou a extrahována se směsí hexan-ether (3:1). Organická fáze byla promyta ředěnou kyselinou chlorovodíkovou, nasyceným roztokem NaHCO₃ a roztokem chloridu sodného. Po sušení nad Na₂SO₄ a odpaření byl zbytek čištěn chromatografií na sloupci silikagelu (30 g),



eluovány nejdříve petroletherem aby byly odstraněny tuky a poté s využitím směsi hexan-AcOEt 95:5 jakmile se začne eluovat titulní sloučenina, bylo získáno 3,34 g (0,28 %) hyperforin acetátu ve formě bezbarvé pasty.

$C_{37}H_{54}O_5$, molekulová hmotnost: 578

CI-MS: 579 (M+H)⁺

IR (kapalný film): 1779, 1732, 1660, 1634, 1447, 1377, 1339, 1146 cm^{-1}

¹H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): 5,03 (brs, 2H), 5,00 (brs, 2H), 3,05 (dd, J = 15, 7 Hz, 1H), 2,87 (dd, J = 15, 7 Hz, 1H), 2,22 (s, OAc), 1,66-1,53 (brs, 8 x 3H), 1,08 (d, J = 6,5 Hz, 3H), 0,98 (s, 3H), 0,85 (d, J = 6,5 Hz, 3H).

Příklad 3. Syntéza hyperforin 3,4,5-trimethoxybenzoátu

Do roztoku rostlinného extraktu z Příkladu 1 (1,0 g) ve 4 ml pyridinu bylo přidáno 323 mg 3,4,5-trimethoxybenzoylchloridu a roztok byl míchán 24 h při laboratorní teplotě. Reakce nemůže být kontrolována pomocí TLC protože výchozí materiál a produkt mají velmi blízké R_f hodnoty v různých rozpouštědlech. Reakční směs byla naředěna s vodou a extrahována se směsí ether-hexan (3:1). Organická fáze byla promyta ředěnou HCl, nasyceným roztokem $NaHCO_3$ (promytí roztokem chloridu sodného způsobuje tvorbu emulze). Po sušení nad Na_2SO_4 a odpaření byl zbytek čištěn chromatografií na sloupci silikagelu (ca 5 g), eluovaném nejdříve petroletherem za účelem odstranění tuků, poté se směsí hexan-AcOEt 95:5 za vzniku hyperforin trimethoxybenzoátu (317 mg) ve formě bezbarvého oleje.

$C_{45}H_{62}O_8$, molekulová hmotnost: 730

CI-MS: 731 (M+H)⁺

IR (kapalný film): 1732, 1660, 1634, 1589, 1465, 1331, 1153, 1130, 914 cm^{-1} .

¹N NMR (200 MHz, $CDCl_3$): 7,27 (s, 2H), 5,04 (brs, 2H), 5,02 (brs, 2H), 3,86 (s, OMe), 3,82 (s, 2 x OMe), 3,10 (dd, J = 15, 7 Hz, 1H), 2,92 (dd, J = 15, 7 Hz, 1H), 1,66 - 1,53 (br s, 8 x 3H), 1,13 (d, J = 6,5 Hz, 3H), 1,04 (s, 3H), 0,99 (d, J = 6,5 Hz, 3H).

Příklad 4 - Potažené tablety obsahující produkt z Příkladu 2

Hyperforin acetát	100 mg
polysacharidy	18,25 mg
zesíťovaná natrium	

karboxymethylcelulosa	13,50 mg
silikát	6,50 mg
polyvinylpyrrolidon	5,00 mg
stearát hořčnatý	0,50 mg
Potáhnutí:	
Hydroxypropylmethylcelulosa	3,75 mg
Talek	2,75 mg
Oxid titaničitý	1,25 mg
Triacetin	0,75 mg
Polysorbát 80	0,25 mg
Červený oxid železa	1,00 mg

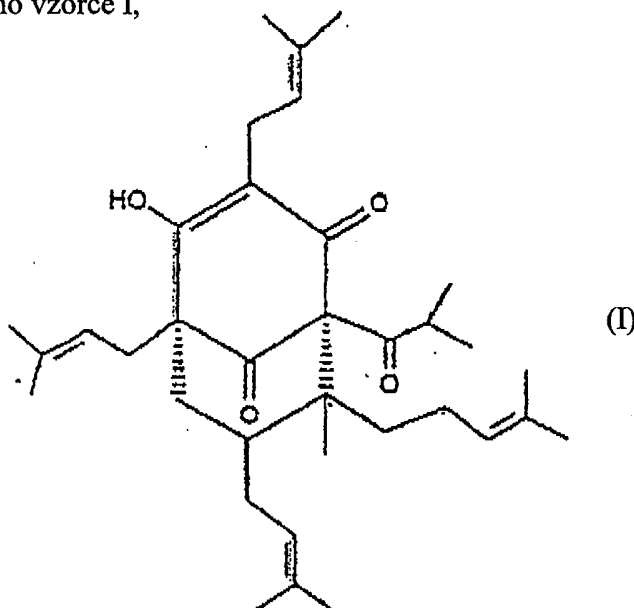
Průmyslová využitelnost

Nové hyperforinové deriváty mají vysokou stabilitu a výhodné farmakologické charakteristiky a jsou využitelné pro přípravu farmaceutických přípravků pro použití jako antidepresiva.


BYTSEKVIS
Praha a.s.
- 8 -

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina obecného vzorce I,



kde R je:

- nasycená nebo nenasycená, rovná nebo rozvětvená C₁ až C₂₂ acylová skupina, případně mající jeden nebo více substituentů, které mohou být stejné nebo rozdílné, vybrané ze skupiny obsahující atomy halogenů, nitro, amino, C₁ až C₆ alkylamino, di-C₁ až C₆ alkylamino, C₁ až C₆ acylaminoskupiny;
- cykloalifatický nebo aromatický acylový zbytek, ve kterém má aromatická skupina případně jeden nebo více substituentů, které mohou být stejné nebo rozdílné, vybrané ze skupiny obsahující atomy halogenu, hydroxy, methoxy, aminoskupiny;
- zbytky glycidů, ve kterých jsou jedna nebo více hydroxylových skupin případně alkylovány nebo acylovány.

2. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, kde R je vybraný ze skupiny obsahující acetyl, monochloracetyl, butyryl, γ -aminobutyryl, p-aminobenzyl, trimethoxybenzyl, trimethoxycinnamyl, β -glukosid a β -galaktosyl.

3. Extrakt z *Hypericum perforatum*, vyznačující se tím, že obsahuje sloučeninu podle nároku 1 nebo 2.

4. Extrakt z *Hypericum perforatum* podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jej lze získat způsobem zahrnujícím:

- a) extrahování květních vrcholků *Hypericum perforatum* pomocí superkritického CO₂;
- b) rozpuštění lipofilního extraktu z kroku a) ve vodném methanolu nebo acetonitrilu a jeho extrahování s alifatickými uhlovodíky;
- c) naředění hydrofilní fáze s vodou a její protiproudou extrakci s alifatickými uhlovodíky;
- d) zakoncentrování lipofilní fáze;
- e) reakci koncentráту z kroku b) s reaktivním intermediátem kyseliny RCOOH nebo cukru ROH, kde R je definován v nároku 1.

5. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní složku sloučeninu podle nároků 1 nebo 2 nebo extrakt podle nároků 3 nebo 4 ve směsi s vhodným nosičem.

6. Sloučeniny obecného vzorce I jako antidepresiva.

PATENTSERVIS

Praha, a.s.

[Handwritten signature]