



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäÙ § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

210 277

Int.Cl.³

3(51)

C 07 D493/14

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 07 D/ 2488 264
(31) 357,805,358,191

(22) 15.03.83
(32) 15.03.82;15.03.82

(44) 06.06.84
(33) US:US

(71) siehe (73)

(72) DARKO, LASZLO L.,DR.:US;NAKANISHI, KOJI;JP;NAKAGAWA, MASASHI;JP;

(73) RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT., BUDAPEST, HU

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PHYSIOLOGISCH AKTIVE PTEROCARPANVERBINDUNGEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung physiologisch aktiver Pterocarpan-Verbindungen. Sie werden angewandt als Arzneimittel gegen toxische Gifte von Giftschlangen, Spinnen und anderen Insekten und auch E. Coli Endotoxinen. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines wirtschaftlichen Verfahrens zur Isolierung reiner kristalliner Pterocarpan-Verbindungen aus Wurzeln des Baumes Cabeca de Negra. ErfindungsgemäÙ wird aus den zerkleinerten Wurzeln ein wäÙriger-alkoholischer Extrakt hergestellt, zu einem öligen Rückstand eingeeengt, dieser mit Hexan extrahiert, die wäÙrige Phase mit Äther extrahiert, die ätherische Schicht nach chromatographischen Methoden in an sich bekannter Weise aufgetrennt und die Verbindung der Formel I erhalten. Formel I

Berlin, den 10.1.1984

62 164/18

Verfahren zur Isolierung von physiologisch aktiven Pterocarpan-Verbindungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft aus rohen Extrakten von in der Natur vorkommenden Produkten isolierte, wesentlich reine kristalline Pterocarpan-Verbindungen und Methoden zur Isolierung derselben.

Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen werden angewandt als Arzneimittel bei der Behandlung der Wirkungen von Bissen giftiger Schlangen und Insekten sowie von pathogenen bakteriellen Toxinen, welche das Zentralnervensystem beeinflussen und eine Atemlähmung hervorrufen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß die wäßrigen alkoholischen Extrakte der Wurzel des in Südamerika vorkommenden Cabeba de Negra Baumes durch die im Dschungel des oberen Amazonas tätigen Plantagenarbeiter gegen Schlangengift als orales Antidotum (Gegengift) verwendet wurden. In Südamerika sind ungefähr 10 Varianten der Spezies Cabeca de Negra bekannt. Es wurden weder die Natur der Wirkstoffe, noch deren Nebenwirkungen noch die pharmakologische Aktivität und Stabilität der erfindungsgemäßen Verbindungen offenbart. Pterocarpane mit antimikrobieller Wirkung wurden in der Literatur beschrieben [Heterocycles, Vol. 15, 1163 (1981)].

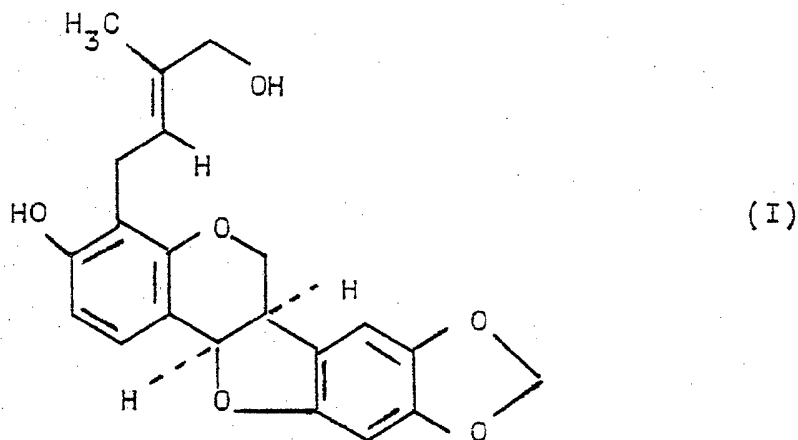
Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines einfachen und wirtschaftlichen Verfahrens zur Herstellung von physiologisch aktiven Pterocarpan-Verbindungen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Verfahren zur Isolierung kristalliner Pterocarpan-Verbindungen aus der Wurzel des Baumes Cabeca aufzufinden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, in wesentlich reiner kristalliner Form isolierte neue Pterocarpan-Verbindungen der allgemeinen Formel I



herzustellen.

Der Einfachheit halber wird die Verbindung der obigen Struktur weiterhin als Cabenegrin I [3-Hydroxy-4-(3-hydroxy-methyl-buten-2)-8,9-methylenedioxy-pterocarpan] oder Verbindung der allgemeinen Formel I bezeichnet.

10.1.1984

- 3 -

62 164/18

Gegenstand der Erfindung ist ein stufenweises Verfahren zur Gewinnung und Isolierung eines wesentlich reinen (95 bis 100 %) kristallinen Produkts Cabenegrin I.

In ähnlicher Weise kann durch Extraktion aus den Wurzeln des Baumes Cabeca de negra auch die Verbindung Cabenegrin II hergestellt werden; die Herstellung dieser Verbindung - welche auch mit dem Cabenegrin I kombiniert angewendet werden kann - gehört aber nicht zum Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist gekennzeichnet dadurch, daß man

- a) aus der zerkleinerten Wurzel des Baumes Cabeca de Negra ein rohes wäßriges-alkoholisches Extrakt herstellt;
- b) das rohe Extrakt zu einem öligen Rückstand einengt;
- c) den so erhaltenen öligen Rückstand mit wäßrigem Methanol behandelt und danach mit einem 5 bis 8 Kohlenstoffatome enthaltenden aliphatischen Kohlenwasserstoff extrahiert;
- d) die bei der Stufe c) erhaltene wäßrige Phase mit Äther extrahiert;
- e) die bei der Stufe d) erhaltene ätherische Schicht nach chromatographischen Methoden in an sich bekannter Weise auftrennt.

Erfindungsgemäß wird der bei der Stufe c) erhaltene ölige Rückstand mit Hexan extrahiert.

Die bei der Stufe d) erhaltene ätherische Phase wird einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie unterworfen und als

10.1.1984

- 4 -

62 164/18

Eluierungsmittel eine methanolhaltige Lösung verwendet, eine erste Fraktion und eine zweite Fraktion abgetrennt und aus der ersten Fraktion die Verbindung I isoliert.

Nach einer weiteren Ausbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die erste Fraktion einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie unterworfen werden und die Verbindung I unter Anwendung eines Methanol und Methylenchlorid enthaltenden Eluierungsmittels isoliert werden.

Die Verbindung Cabenegrin I übt eine wertvolle pharmazeutische Wirkung bei der Behandlung von durch Giftschlangen und Giftinsekten vergifteten Menschen und Säugetieren aus. Dementsprechend ist die obige Verbindung ein wertvolles Antidota gegen die Wirkung von Giften von Schlangen und Insekten. Die Verbindung der allgemeinen Formel I kann auch bei der Behandlung der Wirkungen von anderen bekannten organischen Toxinen (z. B. E. Coli Endotoxin und das durch Clostridium botulinum produzierte Toxin, im allgemeinen genannt als Botulismus) bei Lebensmittelvergiftungen eingesetzt werden. Die pharmazeutische Wirksamkeit wird im allgemeinen bei der Behandlung der Wirkungen von Toxinen, und zwar Endotoxinen und Exotoxinen, pathogenen Bakterien beobachtet, welche das zentrale Nervensystem des Opfers (Säuger) angreifen und insbesondere eine Paralyse des Atmungsapparates verursachen. Eine Wirksamkeit gegen cardiovascular Toxine wird ebenfalls festgestellt.

Die obige Verbindung kann oral in Form einer Flüssigkeit oder Suspension oder mit einem kompatiblen pharmazeutischen

Träger solubilisiert verabreicht werden. Die reine kristalline Substanz kann oral mit geeigneten pharmazeutischen Trägern vermischt in Form von Kapseln oder Tabletten verabreicht werden. Auf eine alternative Weise kann das Cabenegrin I in einem geeigneten flüssigen pharmazeutischen Träger gelöst werden, und die Lösung kann entweder intravenös mit Hilfe einer Spritze oder mit einem Katheter verabreicht werden, falls eine Monitoreinrichtung zur Bestimmung der therapeutischen Wirkungen vorhanden ist. Die Verbindung der Formel I kann auch in verschiedenen Mengenverhältnissen vermischt und das so erhaltene Gemisch unter Anwendung pharmazeutischer Träger in pharmazeutische Präparate überführt werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert.

Ungefähr 580 g der gewaschenen Wurzel des Baumes Cabeça de Negra werden zu kleinen Teilen zerkleinert, welche dann pulverisiert oder einer anderen ähnlichen Behandlung unterworfen werden, um die Faserstruktur zu zerstören. Dieser Verfahrensschritt kann in einer Mischeinrichtung oder einem laboratorischen Homogenisatorapparat durchgeführt werden. Die durch Pilze oder Schimmel infizierten Wurzeln können nicht verwendet werden. Die gepulverten Wurzeln werden in einem großen Glaskolben oder einen anderen geeigneten Behälter gebracht und dort gerührt. Die gepulverten Wurzeln werden durch Zugabe einer geeigneten Menge eines Gemisches

von Wasser und einem 1 bis 4 Kohlenstoffatome aufweisenden aliphatischen Alkohol - vorzugsweise ein 77 : 23 Gemisch von Äthanol und Wasser - gedeckt und einige Minuten lang kräftig gerührt. Der das wäßrige Äthanol und die Wurzeln enthaltende Kolben wird bei Raumtemperatur mindestens 48 Stunden lang stehengelassen und gelegentlich gerührt. Am Ende dieser Periode wird die wäßrige alkoholische Lösung, welche das rohe Extrakt enthält, von den Wurzeln nach geeigneten Methoden abgetrennt. (Z. B. wird die Lösung durch Filtrierpapier mittlerer Größe gegossen). Die pulverisierten Wurzeln werden weggeworfen. Die filtrierte Lösung hat eine Farbe ähnlich des starken Tees.

Aus dem so hergestellten rohen Extrakt werden die Wirkstoffe nach den folgenden Methoden isoliert.

Das wäßrige-äthanolische rohe Extrakt (135 ml) wird durch leichtes Erwärmen unter vermindertem Druck eingeeengt. Es werden 1,2 g eines braunen öligen Rückstandes erhalten. Das Konzentrat wird mit 50%igem wäßrigem Methanol behandelt und die Lösung mit einem 5 bis 8 Kohlenstoffatome enthaltenden aliphatischen Kohlenwasserstoff (vorteilhaft Hexan) unter kräftigem Schütteln extrahiert. Die Hexanphase wird abgetrennt und weggeworfen. Die wäßrige Schicht wird unter kräftigem Schütteln mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wird von der wäßrigen Schicht getrennt, und die abgetrennte Ätherphase (640 mg) wird zur Seite gelegt. Die wäßrige Schicht wird unter kräftigem Schütteln mit n-Butanol extrahiert. Die n-Butanolphase wird abgetrennt und für weitere mögliche Versuche zur Seite gelegt. Die wäßrige Schicht wird

10.1.1984

- 7 -

62 164/18

weggeworfen.

Die so extrahierte ätherische Phase wird nach bekannten chromatographischen Methoden getrennt. Die Ätherphase wird vorteilhaft einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) unterworfen. In der ersten Stufe wird Sephadex LH-20 und in der nächsten Stufe Silikagel eingesetzt. Wäßriges Methanol dient als Eluierungsmittel. Nach dieser Methode werden zwei Fraktionen erhalten. Die erste Fraktion wird durch HPLC unter Anwendung von Partisil-10 und 3 % Methanol enthaltendem Methylenchlorid als Eluierungsmittel einer weiteren Abtrennung unterworfen. Es wird eine reine feste Verbindung erhalten.

Diese Verbindung wird als Cabenegrin I identifiziert und in Form von weißen Kristallen mit einer Ausbeute von 44 mg erhalten. Die Verbindung weist einen scharfen Schmelzpunkt von 167 bis 168 °C auf, und die Analyse entspricht der Zusammensetzung von $C_{21}H_{20}O_6$. Der R_F -Wert der Verbindung I nach Dünnschichtchromatographie beträgt 0,53 [Silikagel CO/ Kieselgur F-254 und ein Benzol/Äthylacetat/Methanol-Gemisch von 15 : 4 : 1].

Die UV, CD und IR-Spektren der Verbindung I sind wie folgt:
UV (in MeOH): 209 nm (ϵ 75.000); 233 nm (Schulter ϵ 24.000),
309 nm (ϵ 13.000)
CD (in MeOH): 213 nm ($\Delta\epsilon$ -25,58), 220 nm ($\Delta\epsilon$ -2,00),
238 nm ($\Delta\epsilon$ -9,84), 302 nm ($\Delta\epsilon$ +3,15)
IR (in $CHCl_3$): 3550 cm^{-1} , 1113 cm^{-1} , 925 cm^{-1} .

10.1.1984

- 8 -

62 164/18

Neben den obigen spektralischen Angaben werden die folgenden ^1H -NMR, ^{13}C -NMR und MS (EI) Daten für Cabenegrin I gemessen:

^1H -NMR: 1,83 (3H) d, 1 Hz, $4'\text{-CH}_3$);
3,40 (2H, br, d, 7 Hz, 0,1');
3,40 (2H, ddd, 7, 7,5 Hz, C 6a);
3,61 (2H, d, d, 11,7 Hz, C, 6b);
3,90 (2H, $-\text{OCH}_2\text{O}-$);
3,99 (2H, br, s, $-\text{CH}_2\text{-CH}$);
4,28 (1H, dd, 11,5 Hz, C 6);
5,45 (1H, br, t, Hz, C2');
5,45 (1H, d, 7 Hz, C 11a);
6,41 (1H, s, C 10);
6,52 (1H, d, 9 Hz, C 2);
6,70 (1H, s, C 7);
7,23 (1H, d, 9 Hz, C 1) ppm.

^{13}C -NMR: 13,74 ($4'\text{-CH}_3$); 21,88 (C 1'); 40,16 (C 6a);
66,72 (C 6); 68,72 ($-\text{CH}_2\text{-OH}$); 79,10 (C 11a);
93,77 (C 10); 104,73 (C 7); 109,6 (C 2);
112,63 (C 4 cr C 1a); 115,01 (C 4 cr C 1a);
118,04 (C 6b); 123,49 (C 2'); 129,15 (C 1);
136,07 (C 3'); 141,67 (C 8); 148,06 (C 9);
154,20 (C 10a cr C 4a); 154,20 (C 10a cr C 4a);
155,08 (C 3) ppm.

15 MS

(18 eV): M^+ = 3,68, 50 %

m/e = 350, 100 %, 335, 95 %, 335, 95 %

176, 65 %, 161, 90 %.

Das zweite Muster der nach HPLC isolierten Substanz besteht aus einem öligen Gemisch (etwa 10 mg). Aus dieser Fraktion kann die nicht zum Gegenstand dieser Erfindung gehörende Verbindung Cabenegrin II gewonnen werden.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte neue Verbindung kann als Wirkstoff von pharmazeutischen Präparaten eingesetzt werden, die bei der Behandlung der Wirkungen von Bissen giftiger Schlangen und Insekten am Menschen und anderen Säugetieren als Antidotum verwendet werden können.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin pharmazeutische Präparate zur Behandlung von Wirkungen von pathogenen bakteriellen Toxinen (z. B. E. Coli Endotoxin, Botulismus usw.), welche das Zentralnervensystem beeinflussen und eine Atemlähmung hervorrufen. Diese Präparate können auch zur Behandlung von Wirkungen der cardiovascularen Toxine an Säugetieren verwendet werden.

Die physiologische Wirksamkeit der nach den erfindungsgemäßen Extraktionsmethoden erhaltenen neuen Verbindung wird nach in vivo Testversuchen an Mäusen nachgewiesen. Als Testtiere werden weiße Swiss Webster Mäuse beiden Geschlechts eingesetzt (Gewicht 20 bis 25 g). Alle Tiergruppen werden durch intraperitoneale Verabreichung einer 2,5fachen letalen Dose des Giftes der Schlange Fer de Lance (Borthrops Atrox) vergiftet. Die unbehandelten Tiere stürzen binnen einigen Minuten zusammen.

Die Antidotumaktivität der aus dem obigen Extraktionsver-

10.1.1984

- 10 -

62 164/18

fahren erhaltenen Konzentrate der Verbindung I wird getestet. Die aus den einzelnen Fraktionen isolierten Substanzen werden in wäßrigem Äthanol (77 : 23) gelöst, und diese Lösung wird unmittelbar nach der Vergiftung in die Mäuse injiziert.

Jedes Tier wird mit 0,25 ml der entsprechenden Lösung behandelt. Aufgrund dieses Protokolls beträgt die für das Überleben notwendige minimale Dosis gegen das Fer de Lance Schlangengift für Cabenegrin I 2,8 mg/kg.

Zwecks toxikologischer Versuche werden wäßrige-äthanolische Lösungen der Verbindung Cabenegrin I gesunden Testtieren verabreicht. Es werden keine wesentlichen Veränderungen der vitalen physiologischen Funktionen festgestellt. Die Testverbindung kann durch intravenöse oder intramuskuläre Injektion oder oral mit Hilfe einer Magensonde verabreicht werden. Nach Verabreichung der Verbindung I an normale gesunde (d. h. mit Schlangengift nicht vergiftete) Tiere wird keine wesentliche Veränderung des arteriellen Blutdruckes, der Herzfrequenz, der Atmung, des Elektrokardiogramms oder des zentralen venösen Druckes bei beliebigem Zeitpunkt beobachtet.

Die Verabreichung der Verbindung I verursacht keine wesentliche Veränderung des Ruheaktionspotentials, des Nervenendplattepotentials, der Nervenimpulsübertragung, der neuromuskularen Funktion oder der Gehirnwellenaktivität der Versuchstiere.

1. Antidotum-Aktivität gegen Schlangengift an Hunden

Die durch eine letale Dose von Schlangengift (z. B. *Bothrops atrox*, *Crotalus adamanteus* oder *Crotalus atrox*) verursachte Vergiftung ruft eine schlagartige arterielle Blutdrucksenkung, eine Herabsetzung der Herzfrequenz und eine Erhöhung des zentralen venösen Blutdruckes hervor. Diese Symptome werden von einer partiellen Wiederherstellung der obigen Parameter gefolgt und dann kommt ein vollständiger Zusammensturz der respiratorischen und kardiovaskulären Systeme. Als Todesursache kommt eine Kombination des peripherischen vascularen Zusammensturzes und der Abbrechung des normalen Atmungsmechanismus in Betracht. Daneben üben diese Schlangengifte eine gewisse Wirkung auf das Zentralnervensystem der Testtiere aus. Diese ZNS-Wirkungen zeigen sich in einer Verminderung des α - und β -Rhythmus des Gehirnes (EEG). Diese Veränderung ist mit einer Verminderung der Impulsübertragung durch die motorischen Nerven und einer progressiven Blockierung des neuromuskulären Apparates verbunden; dies ist der Wirkung von Kurate ähnlich. Die Schlangengifte üben keine Wirkung durch direkte Reizung hervorgerufene Muskelreaktion aus.

Die Wirksamkeit von Cabenegrin I gegen Schlangengifte wird an einer Gruppe von 7 erwachsenen Dachshunden getestet. Die Hunde wurden mit Natriumpentobarbital (30 mg/kg) anästhetisiert, und die Veränderungen des arteriellen Blutdruckes, der Herzfrequenz, des EKGs und der Atmung werden registriert.

Letale Dosen, das 5- bis 10fache des LD_{50} -Wertes von lyo-

10.1.1984

- 12 -

62 164/18

philisiertem wieder aktivem Schlangengift der Schlange *Bothrops atrox* (Fer de Lance) (2,5 mg - 5,0 mg/kg) oder 10 mg/kg vom Schlangengift der südamerikanischen Klapperschlange werden verabreicht.

Innerhalb von 15 Minuten nach der Vergiftung wird eine ausgeprägte Herabsetzung der Herzfrequenz und des Blutdruckes registriert. Nach einer Zeitspanne von 15 bis 30 Minuten tritt eine Senkung der Atmung durchschnittlich von 20/Minuten zu 5/Minuten ebenfalls auf. Die Behandlung wird beim Auftreten von schweren kardiovaskulären Störungen und sichtbaren Atmungsschwierigkeiten begonnen (im allgemeinen 15 bis 30 Minuten nach der Vergiftung).

Eine Lösung von Cabenegrin I wird durch Auflösen von 33 mg dieser kristallinen Substanz in 100 ml wässrigem Athanol (25 : 75) hergestellt. Die zu verabreichenden Dosen werden durch Vermischen von je 5 ml der obigen alkoholischen Lösungen der Verbindung I mit 5 ml Wasser hergestellt.

Die Lösung der Testverbindungen werden durch eine Schlauchsonde in den Magen der Hunde verabreicht. Die Behandlung wird folgendermaßen durchgeführt: Nach der Therapie wird keine sofortige Reaktion festgestellt. Der Blutdruck, die Herzfrequenz und die Atmung bleiben äußerst schwach. Um etwa 30 Minuten nach der Verabreichung der ersten Dose der alkoholischen Lösung der Testverbindung I kann eine langsame allmähliche Verbesserung der Atmung und darauffolgend eine partielle Wiederherstellung der Herzfrequenz und des Blutdruckes festgestellt werden. Eine anhaltende Therapie

10.1.1984

- 13 -

62 164/18

wird in Zeitintervallen von 30 Minuten in 50 ml Wasser solange fortgesetzt, bis alle registrierten vitalen Lebenszeichen in einem Bereich von 10 % der Kontrolle wiederhergestellt werden. Der wirksame Dosenbereich beträgt 10 bis 20 ml vom Antischlangengiftextrakt per Versuchstier. Es sind 2 bis 4 Dosen notwendig. Nach einer Beobachtungszeit von 8 bis 10 Stunden werden die Versuchstiere in einen Käfig gesetzt und mit Nährstoff und Wasser versehen. Nach 24 Stunden zeigen alle 7 Tiere Symptome einer zurückgedrängten Aktivität. Nach 72 Stunden nehmen alle Hunde Nährstoff und Wasser zu sich. Keine weitere Therapie ist notwendig.

2. Aktivität von Cabenegrin I gegen E. Coli Endotoxin

Die Wirksamkeit der Verbindung Cabenegrin I bei der Behandlung von durch E. Coli Endotoxin hervorgerufenen Schock wird an drei erwachsenen Dachshunden getestet. Die Hunde werden mit Natriumpentobarbital (30 mg/kg) anästhetisiert, und die Veränderungen des arteriellen Blutdruckes, der Herzfrequenz, des EKGs und der Atmung werden registriert. Letale Dosen (1 mg/kg) von E. Coli Endotoxin werden durch einen Katheter in die Vene der Hinterglieder der Tiere intravenös injiziert. Im ersten Versuch wird keine Antidotum-Therapie durchgeführt, und die Tiere verendeten 2 Stunden nach der Vergiftung. In drei weiteren Fällen wird eine Antidotum-Behandlung bei dem Auftreten von schwerem kardiovaskularem Zusammenbruch und Atmungsschwierigkeiten eingeleitet. Dies erfolgte im allgemeinen binnen etwa anderthalb Stunden nach der Verabreichung des Toxins.

Die auf die oben beschriebene Weise hergestellten Lösungen der Verbindung Cabenegrin I werden den Hunden durch eine Magensonde in einer einzigen Dose von 10 ml in 100 ml Wasser verabreicht. Die so behandelten Tiere überleben die Vergiftung, und ihre normale Aktivität wird wiederhergestellt.

3. Isoliertes Herz-(Lengendorff)-Präparat

Eine Serie von 2 Hundenherzpräparaten wird zwecks Bestimmung der Antischlangengiftwirkung auf Koronardurchströmung, Herzfrequenz, Elektrokardiogramm, ventrikuläre Kontraktionskraft und Koronarvaskularwiderstand getestet. Cabenegrin I wird entweder vor oder nach Zugabe einer letalen Schlangengiftosis verabreicht. Es wird festgestellt, daß die Behandlung die toxischen Wirkungen des Schlangengiftes auf die kardiovaskulären Funktionen behebt. Diese Wirkungen sind eine Verminderung der Kontraktionskraft und der Herzfrequenz. Auch der Koronarvaskularwiderstand wird nach der Verabreichung des Schlangengiftes allmählich erhöht. Falls man eine Lösung der Verbindung I (Wirkstoffgehalt 0,05 mg/ml) in den Blutkreislauf unmittelbar vor der Verabreichung des Giftes der tropischen Klapperschlange injiziert, werden keine schädlichen Wirkungen auf das Herz festgestellt. Im Gegenteil, es tritt eine Erhöhung der Kontraktionskraft und der Koronardurchströmung von etwa 15 bis 20 % auf.

Falls man die Verbindung I nach der Vergiftung mit einer letalen Dosis des tropischen Klapperschlangengiftes verabreicht, stellt das Antidotum die Kontraktionskraft und Herzfrequenz auf den normalen Stand wieder her, und das durch die

Vergiftung hervorgerufene Minorarrhythmia wird behoben.

4. Neurophysiologische Funktion

Die auf die neuromuskuläre Funktion, das Aktionspotential und die Gehirnwellenaktivität ausgeübte Antidotum-Wirkung wird nach der Verabreichung einer letalen Dose des Fer de Lance Schlangengiftes an drei Hunden und einer Katze getestet. Das Schlangengift setzt sowohl die Gehirnwellenaktivität als auch die Nervenimpulsübertragung herab. Durch Zugabe von Cabenegrin I werden diese Parameter beinahe oder sogar vollständig auf den normalen Wert wiederhergestellt.

Das Aktionspotential und die neuromuskuläre Funktion bleiben für etwa 30 bis 60 Minuten nach der Behandlung mit den beiden Testverbindungen zurückgedrängt. Danach erhalten diese Funktionen das normale vorherige Niveau langsam und allmählich innerhalb von 12 bis 24 Stunden.

In einigen Versuchen tritt eine vollständige neuromuskuläre Blockierung auf, die Tiere sind zur spontanen Atmung unfähig, und eine künstliche Atmung ist solange notwendig, bis die Testverbindung ihre Wirkung entfaltet. Dies kann nach der Vergiftung geschehen. Sollte sich jedoch der Zustand der Tiere stabilisieren und die Tiere die spontane Atmung beginnen, ist keine weitere Therapie mehr erforderlich.

Die corticale elektrische Aktivität wird durch das Schlangengift ausgeprägt (25 bis 35 %) zurückgedrängt. Durch Verabreichung der Verbindung Cabenegrin I werden diese Verän-

10.1.1984

- 16 -

62 164/18

derungen zum normalen Zustand wiederhergestellt. Nach der Behandlung werden keine weiteren Veränderungen beobachtet.

Die obigen Testversuche zeigen, daß die orale oder intravenöse Verabreichung von Cabenegrin I zur Behandlung von klinischen Zuständen sowohl kardiotoxischer als auch neurotoxischer Natur fähig ist, und es treten keine schädlichen Nebenwirkungen auf.

Gegenstand der Erfindung sind die neue Verbindung I enthaltende pharmazeutische Präparate, die vorteilhaft oral oder parenteral (Injektion) verabreicht werden können.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate enthalten neben dem Wirkstoff übliche inerte pharmazeutische Träger.

Die zur oralen Verabreichung geeigneten pharmazeutischen Präparate können vorteilhaft gegenüber der Magenschleimhaut inerte Flüssigkeiten enthalten. In solchen flüssigen Trägern können stabile Suspensionen der Verbindungen der Formel I hergestellt werden. Als flüssige Träger können auch die zum Auflösen der Verbindung Cabenegrin I fähigen Lösungsmittel eingesetzt werden. Im letzteren Fall können flüssige pharmazeutische Lösungen sowohl zur oralen Verabreichung als auch parenteralen Injizierung hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen oralen Präparate können auch durch Vermischen von Cabenegrin I mit geeigneten trockenen, an sich bekannten pharmazeutischen Trägern hergestellt werden. Diese trockenen Präparate können in geeigneten Dosierungs-

einheiten eingesetzt werden (z. B. Dragees, Tabletten, Kapseln).

Mit Hilfe von Mikrokapsulierungsmethoden können Präparate mit verzögerter Wirkstoffabgabe hergestellt werden.

In mehreren Fällen ist es in Abhängigkeit vom giftigen Toxin oder dem verschlechterten Zustand des Opfers notwendig, eine flüssige Dosierungseinheit zu verabreichen, um eine schnelle und instantane Ausübung der therapeutischen Wirksamkeit zu ermöglichen. Bei der Behandlung von Menschen oder Tieren, welche entweder bewußtlos sind oder deren vitale Lebenszeichen auf einen fortgeschrittenen Zustand der Vergiftung hinweisen, ist es oft notwendig, den Wirkstoff entweder oral durch eine Magensonde oder intravenös durch eine Spritze oder Katheter zu verabreichen.

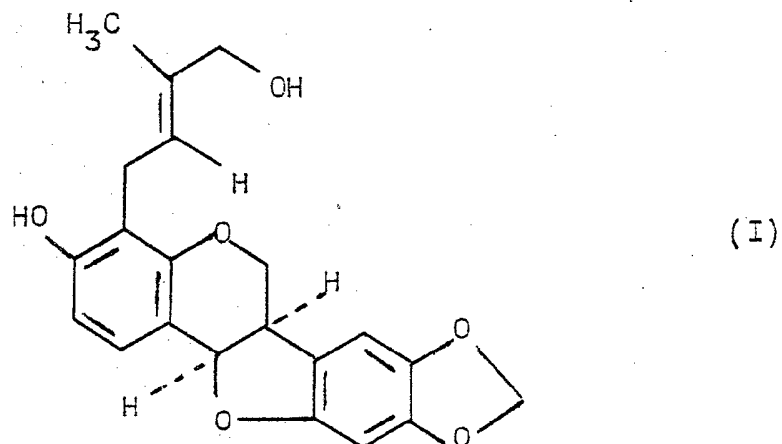
Ein pharmazeutisches Präparat wird durch Vermischen der nachstehenden Substanzen in den angegebenen Mengenverhältnissen hergestellt:

Verbindung I	20
Stärke	15,0
Magnesiumstearat	2,0
Natriumbenzoat	6,0
Benzalkoniumchlorid	2,0

Die obige trockene Mischung wird gründlich vermischt und zu Tabletten verarbeitet. Eine jede Tablette enthält 100 mg der Verbindung I.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung der Verbindung



gekennzeichnet dadurch, daß man

- a) aus der zerkleinerten Wurzel des Baumes Cabeça de Negra ein rohes wäßriges-alkoholisches Extrakt herstellt;
- b) das rohe Extrakt zu einem öligen Rückstand einengt;
- c) den so erhaltenen öligen Rückstand mit wäßrigem Methanol behandelt und danach mit einem 5 bis 8 Kohlenstoffatome enthaltenden aliphatischen Kohlenwasserstoff extrahiert;
- d) die bei der Stufe c) erhaltene wäßrige Phase mit Äther extrahiert;
- e) die bei der Stufe d) erhaltene ätherische Schicht nach chromatographischen Methoden in an sich bekannter Weise auftrennt.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man den bei der Stufe c) erhaltenen öligen Rückstand mit Hexan extrahiert.

10.1.1984

- 19 -

62 164/18

3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man die bei der Stufe d) erhaltene ätherische Phase einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie unterwirft und als Eluierungsmittel eine methanolhaltige Lösung verwendet, eine erste Fraktion und eine zweite Fraktion abtrennt und aus der obigen ersten Fraktion die Verbindung I isoliert.
4. Verfahren nach Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß man die erste Fraktion einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie unterwirft und die Verbindung I unter Anwendung eines Methanol und Methylenchlorid enthaltenden Eluierungsmittels isoliert.