

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

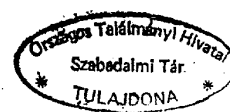
(11) (13)

190 938 B

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) Int. Cl.₄:
A 61 K 37/42
A 61 K 35/78

(21) (2960/84) (22) A bejelentés napja: 84. 08. 03.
A bejelentés elsőbbsége:
(33) FR
(32) 83. 08. 04.
(31) (83 12849)

(41) (42) Közzététel napja: 85. 07. 29.
(45) A leírás megjelent: 90. 01. 31



Feltaláló(k): (72)

Balansard Guy, Timon-David Pierre, Marseille, FR

Szabadalmas: (73)

Synthelabo S. A., Párizs, FR

(54) ELJÁRÁS MALÁRIA ELLENI GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás szinergizmuson alapuló malária gyógyítására és megelőzésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására.

Az új gyógyszerkészítményeket úgy állítják elő, hogy a kínafa kérgéből kivont kinint vagy gyógyászatban alkalmazható sóját, vagy kinin és cinkonin elegyét vagy ezek gyógyászatban alkalmazható sójának elegyét, amely 2/3 rész kinint és 1/3 rész cinko-

nint tartalmaz és az alkaloid bázisra vonatkoztatott 45–65 súly% mennyiségben, az Annona senegalensisből extrahált tiszta vagy 60%-os kondenzált tannint a tiszta tanninra vonatkoztatott 35–55 súly% mennyiségben, a gyógyszertechnológiában szokásosan alkalmazott segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítják.

A találmány tárgya eljárás malária elleni gyógyszerkészítmények előállítására.

A kinin maláriaellenes hatása közismert. Azt találtuk, hogy azok a gyógyszerkészítmények, amelyek a kinin és az *Annona senegalensis*-ből kivont tannin keverékét tartalmazzák, különösen hatásosak a malária ellen.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények kinint tartalmaznak, adott esetben só formájában, az *Annona senegalensis*-ből kivont tiszta tanninnal vagy 60%-os tanninnal és adott esetben cinkoninnal összekeverve.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények sokkal hatásosabbak, mint a kinin önmagában. A kínafa kérgéből kivont kinin és cinkonin az irodalomból maláriaellenes hatásukról ismertek. A cinkonin – mivel kissé toxikusabb, mint a kinin – a terápiában nem alkalmazható önmagában.

A tiszta tannint és a 60%-os kondenzált tannint az *Annona senegalensis* törzsének kérgéből extraháljuk.

A kivonat 60% kondenzált tannin mellett glükózt, aminosavakat és peptideket tartalmaz.

A tiszta tannint preparatív folyadékkromatográfia eljárással különítjük el, melynek során hordozóanyagként szilikagél (RP 8 Merck), eluálószerként először desztillált vizet, majd 10% metanolt tartalmazó vizet és ezt követően 70% vizet tartalmazó metanolt használunk.

A Stiasny-reagenssel mutatjuk ki a kondenzált tanninok egyedüli jelenlétét.

Az *Annona senegalensis* tisztított kivonatát a következő módon állítjuk elő:

Az *Annona senegalensis* törzsének szárított és porított kérgét ötszörös mennyiségű metanol-víz (55:45 súlyarányú) eleggyel lúgozzuk ki. A kapott folyadékból a metanolt csökkentett nyomás alatt elpárologtatjuk. A maradék vizes oldatot azonos mennyiségű etil-acetáttal kétszer extraháljuk.

Az etil-acetátban oldódó frakciókat leöntjük.

A maradék vizes fázisból a vizet finom porlasztással vagy liofilezással eltávolítjuk. A kapott maradékot melegen kétszer, súlyára vonatkoztatott tízszeres mennyiségű aceton-etil-acetát (1:1 térfogatarányú) eleggyel extraháljuk.

Az etil-acetátban oldhatatlan anyagot vízben oldjuk, és a vizet finom porlasztással vagy liofilezással eltávolítjuk. A kapott *Annona senegalensis*-kivonat világosbarna por, amely igen jól oldódik vízben, részlegesen oldódik metanolban és etanolban, nem oldódik acetonban és éterben.

A kivonatban lévő kondenzált tannint több vizsgálattal és reagenssel jellemeztük.

1. A kivonat néhány mg-ját 5 ml 5n sósavban forrásig melegítjük, intenzív vörös elszíneződés keletkezik. A lehülés után oldhatatlan csapadékként flobafént kapunk. Ez a reakció a flavándiolokból származó kondenzált tanninok tulajdonsága.
2. 100 ml vízben oldott 100 mg kivonathoz hozzáadunk 50 ml Stiasny-reagenst (25 ml 40%-os formalin és 25 ml sósav) és így gesztenyeszínű csapadékot kapunk, ami a kondenzált tanninokra jellemző.
3. 0,5 ml 2%-os vas(III)-klorid-oldat hozzáadása 5 ml 0,5% kivonatot tartalmazó vizes oldathoz

zöld elszíneződéshez vezet, ami a fenolok jelenlétére jellemző.

4. A kivonat 2%-os oldatából vett 2 ml-es mintához hozzáadunk 1 ml 0,1n kénsavat és 3 ml 10%-os vizes ammónium-molibdát-oldatot. Ez narancssárga elszíneződést eredményez, ami az orto-difenolok jellemzője.
5. 10 ml 5n sósavban feloldunk 0,2 g kivonatot, majd az oldatot 2 percig forró vízfürdőben tartjuk. Lehülés után a keletkezett antocianidint 1 ml izoamil-alkohollal extraháljuk. Az antocianidint kromatográfia eljárással azonosítottuk.

	Kivonat	Kontroll cianidin
15	Whatman-féle 1. sz papír Forestal-féle oldószer*	$R_f = 0,17$ $R_f = 0,17$
20	CCM-cellulóz, Merck HCOOH-HCl-H ₂ O (10-1-3)	$R_f = 0,42$ $R_f = 0,42$
25	CCM-cellulóz, Merck Amilalkohol -CH ₃ COOH-H ₂ O (2-1-1)	$R_f = 0,46$ $R_f = 0,46$

*Forestal: ecetsav – tömény sósav – víz (5-3-10).

30. Papírkromatográfia eljárással a foltokat Merck-gyártmányú metanollal eluáltuk. Spektroszkópiás vizsgálatnál a próba és a kontroll maximális abszorpciója egyaránt 537 nm-nél van. Ez a két próba lehetővé teszi a cianidin meghatározását a tannin (savas) hidrolízise után.
 35. Vas(III)-klorid jelenlétében a kivonatot egyszerű, majd oxidációs hidrolízisnek vetjük alá, majd a vizes fázist nátrium-kloriddal telítjük és éterrel extraháljuk. A vas(III)-klorid 0,5%-os vizes oldatával rázott éteres fázis nem mutat galluszsavra jellemző kék elszíneződést, ami arra utal, hogy a kivonat nem tartalmaz gallusz-típusú hidrolizálható tanninokat.
 40. Az alkaloidokra és szaponinokra irányuló vizsgálat negatív volt, ellentétben az irodalomban leírtakkal.
 45. 8. Ultraibolya-spektroszkópia:
a 25 µg/ml arányban desztillált vízben oldott tiszta tannin abszorpciós maximuma 279-280 nm-nél mutatkozott. 280 nm-nél a DO értéke 0,30 és 0,33 közötti.
 50. A 25 µg/ml arányban desztillált vízben oldott 60%-os kivonat 279-280 nm-nél mutatott abszorpciós maximumot, a DO értéke pedig 0,18 és 0,20 között volt.
 55. A glükózt a glükóz-oxidáz sávok pozitív reakciójával és szilikagélen (GF 254 Merck) végzett vékonyréteg-kromatográfiával mutattuk ki. A futtatószer izopropanol – M/30 bórsav (85:15 térfogatarányú) elegy volt.
 60. A kimutatást anilin-ftalát porításával és 5 percig 105 °C-on, szárítószekrényben való hevítéssel végeztük.
 65. A vizsgálandó és a kontroll glükóz gesztenyeszínű foltot ad; az R_f megfelelő értéke 0,5 körül van.
- Az összes aminosav meghatározását egy Carlo-

Erba 3A 27B típusú aminosav-analizátorral végeztük, Molla, P. módszere szerint (szakdoktori disszertáció, Marseille, 1975.).

5n sósavval végzett savas hidrolízis után kimutatunk:

5 bázisos aminosavat: gamma-amino-vajsav, ornitin, lizin, hisztidin, arginin, valamint

12 semleges aminosavat: aszparaginsav, treonin, szerin, prolin, glutaminsav, glicin, alanin, valin, izoleucin, leucin, tirozin, fenil-alanin.

A kondenzált tanninok mennyiségét a kivonatban – ellentétben az elkülönített tiszta tannin meghatározásával – preparatív folyadékkromatográfiával határoztuk meg.

A két alkalmazott eljárás,

a Stiasny-reagensek használata és

a 280 nm hullámhosszon végzett ultraibolya-spektroszkópiás módszer

60% $\pm$ 3% értéket adott.

A találmány szerinti készítmények maláriaellenes hatását Plasmodium berghei-vel fertőzött fehér egereken vizsgáltuk in vivo.

A Plasmodium berghei az egérfélékben (Muridae) elsőnek felfedezett hematozoon. A legelterjedtebben használt laboratóriumi állatokban, így fehér egerekben és patkányokban, valamint hörcsögökben történő könnyű szaporítása és fenntartása miatt ez a parazita az új maláriaellenes szerek kutatásában kitűnően alkalmazható.

Egy anyagnak akkor van in vivo maláriaellenes hatása, ha a parazitemiát csökkenti és egyidejűleg a kezelt egerek túlélési idejét is meghosszabbítja.

Míg a szerzők nagy része a 4 napos vizsgálatot (4 days test) alkalmazza, amely az ED_{50} és ED_{90} kutatását teszi lehetővé a fertőzött egerek 4 napos kezelésének végén, mi a kezelt egerek parazitemiájának kifejlődését elpusztulásukig, illetve esetleges gyógyulásukig kísértük figyelemmel. Ez a módszer, amelyet Peters alkalmazott a Plasmodium berghei Chloroquin-nal szembeni rezisztenciájának vizsgálatakor, lehetővé teszi a parazitémia kifejlődése és a kezelt egerek túlélése közötti szoros kapcsolat megállapítását.

20 $\pm$ 2 g-os fehér egereknek 0,05 ml. fertőzött vörösvérsejteket tartalmazó vért adtunk be intraperitoneálisan. Ez $2 \cdot 10^7$ parazitával fertőzött vörösvérsejtek felel meg.

Minden egyes vizsgálati csoport 10 egérből állt, és minden egyes csoporthoz egy azonos létszámú kontrollcsoport tartozott.

A termékeket steril desztillált vízben szuszpendáltuk és orálisan adagoltuk; az egerek kezelése a parazitával történő fertőzés napján kezdődött, és ezt 5 napon keresztül minden egyes egér esetében a napi dózis beadása követte. A keneteket a 3. vagy a 4. napon kezdtük vizsgálni. A vizsgálat végén meghatároztuk a parazitával fertőzött vörösvérsejtek százalékos arányát.

Először a kinin-hidrokloridnak azt a minimális dózisát határoztuk meg, amely képes a parazitemiát csökkenteni, továbbá a kezelt egerek túlélését meghosszabbítja a kontrollcsoport állataihoz képest.

Ez a dózis 80 mg/kg körül van. A kinin-hidroklorid ebben az adagolásban csökkenti a parazitemiát a kezelés ideje alatt. A kezelt egerek kevésbé túléltek a kontrollállatokkal.

A kinin-hidrokloridot 120 és 150 mg/kg dózisban adagolva a kezelt egerek parazitemiájának százalékos aránya csökkent. 30 napig végzett ellenőrzési periódus végén a túlélő egerekben nem mutattunk ki parazitákat.

A cinkonin-hidroklorid 120 mg/kg-os dózisa ugyanazt a hatást fejt ki, mint az azonos dózisban beadott kinin-hidroklorid.

Megvizsgáltuk a találmány szerinti, vagyis kinin-hidrokloridot és tiszta tannint (100 mg/kg) tartalmazó két készítményt. A termékeket 120 mg/kg, illetve 150 mg/kg kinin-hidrokloridot és 100 mg/kg tannint tartalmazó készítmény alakjában adtuk be.

Amint a találmány szerinti készítményekkel kezeltük az egereket, azok elhullási aránya (mortalitása) erősen csökkent.

A következő I. táblázatban bemutatjuk a találmány szerinti készítményekkel és a csak kinin-hidrokloriddal való kezeléseket összehasonlító adatait.

(I. táblázat)

Ellen- őrzési időpont	A parazitémia %-os aránya a kezelt egereknél 10-es csoportok			
	Kinin-hidro- klorid (120 mg/kg)	Kinin-hidro- klorid (120 mg/kg) és tannin (100 mg/kg)	Kinin-hidro- klorid (150 mg/kg)	Kinin-hidro- klorid (150 mg/kg) és tannin (100 mg/kg)
T ₀ + 3 nap	0,5%	0,8%	0,1%	0 %
T ₀ + 7 nap	0 %	0 %	0 %	0 %
T ₀ + 9 nap	0,3%	0 %	0,1%	0 %
T ₀ + 10 nap	1,6%	1 %	0,4%	0 %
T ₀ + 11 nap	9 %	1,5%	2 %	0 %
T ₀ + 12 nap	28 %	3,5%	5,8%	0,2%
T ₀ + 14 nap	34 %	8 %	16,5%	0,3%
T ₀ + 15 nap	52 %	16,5%	24 %	1,5%
T ₀ + 16 nap	62 %	18 %	25 %	3,5%
T ₀ + 17 nap		18,5%	19 %	7,5%
T ₀ + 18 nap		19 %	16 %	11 %
T ₀ + 21 nap		21 %	0 %	12 %
T ₀ + 25 nap		12 %	0 %	8 %
T ₀ + 26 nap		0 %	0 %	0 %
T ₀ + 28 nap		0 %	0 %	0 %
T ₀ + 30 nap		0 %	0 %	0 %
A gyógyult állatok %-osaránya	0 %	30 %	30 %	50 %

3

Megvizsgáltuk azt a találmány szerinti készítményt, amely 80 mg/kg kinin-hidrokloridot, 40 mg/kg cinkonin-hidrokloridot és 100 mg/kg tiszta tannint tartalmaz, összehasonlítottuk a kinin- és a cinkonin-hidroklorid keverékével.

Az eredményeket a II. táblázat mutatja:

II. táblázat

Ellenőrzési időpont	A parazitémia %-os aránya a kezelt egereknél (10-es csoportok)	
	Kinin-hidroklorid 80 mg/kg Cinkonin-hidroklorid 40 mg/kg	Kinin-hidroklorid 80 mg/kg Cinkonin-hidroklorid 40 mg/kg Tannin 100 mg/kg
T ₀ + 3 nap	0,4%	0,2%
T ₀ + 4 nap	0,1%	0,1%
T ₀ + 5 nap	0 %	0 %
T ₀ + 7 nap	0 %	0 %
T ₀ + 8 nap	0 %	0 %
T ₀ + 9 nap	0 %	0 %
T ₀ + 10 nap	0 %	0 %
T ₀ + 11 nap	0,1%	0 %
T ₀ + 12 nap	0,2%	0,1%
T ₀ + 13 nap	1 %	0,1%
T ₀ + 14 nap	6 %	0 %
T ₀ + 15 nap	11 %	0 %
T ₀ + 17 nap	12 %	0 %
T ₀ + 18 nap	16 %	0 %
T ₀ + 19 nap	20 %	0 %
T ₀ + 21 nap	26 %	0 %
T ₀ + 23 nap	18 %	0 %
T ₀ + 24 nap	0 %	0 %
T ₀ + 25 nap	0 %	0 %
T ₀ + 27 nap	0 %	0 %
T ₀ + 29 nap	0 %	0 %
T ₀ + 30 nap	0 %	0 %
A gyógyult állatok		
%-os aránya	30 %	100%

Ezekből az eredményekből következik, hogy az *Annona senegalensis*-ből nyert és önmagában nem aktív tannin potenciózza a kinin, illetve a kinin és cinkonin elegy hatásának erősségét.

A megfigyelt szinergizmus lehetővé teszi kisebb mennyiségű kinin használatát a malária kezelésénél és megelőzésénél.

A találmány szerinti készítményeket humán alkalmazás céljaira is elkészíthetjük. Ezek összetétele:

1. gyógykezeléshez a napi adag: 6–15 mg/kg kininbázisnak megfelelő mennyiségű kininsót, vagy 2/3 rész kininsót és 1/3 rész cinkoninsót, azaz 4–10 mg/kg kinint és 2–5 mg/kg cinkonint tartalmazó keveréket, továbbá 5–16 mg/kg *Annona senegalensis*-ből nyert tiszta tannint, illetve 8–25 mg/kg *Annona senegalensis*-ből nyert és 60%-os tannin-kivonatot tartalmazó anyag;

2. megelőző (preventív) kezeléshez naponta: 1–2,5 mg/kg kininbázisnak megfelelő kininsót, vagy 2/3 rész kininsót és 1/3 rész cinkoninsót (azaz 0,66–1,6 mg/kg kinint és 0,33–0,8 mg/kg cinkonint) tartalmazó keveréket, továbbá 1–2,5 mg/kg *Annona sen-*

galensisből nyert tiszta tannint, illetve 1,5–4,5 mg/kg *Annona senegalensis*-ből nyert és 60%-osnak titrált tannin-kivonatot tartalmazó anyag.

5 A 20 g $\pm$ 2 g súlyú egereken vizsgált, hidrokloridja formájában lévő kinin és cinkonin toxicitása a következő:

A DL₅₀ értékek kinin-hidroklorid esetében 820 mg/kg körül, cinkonin-hidroklorid esetében 720 mg/kg körül vannak.

10 Az *Annona senegalensis*-ből kapott kivonat és a tiszta tannin esetében a toxicitás a következő: 60%-os kivonat DL₅₀ értéke orális adagolás esetén 4 g/kg feletti, míg a tiszta tanniné orális adagolás esetén 2,5 g/kg körül van.

15 A találmány szerinti gyógyszerkészítmények 45–65 súlyszázalék kinint vagy kinin–cinkonin keveréket és 35–55 súlyszázalék tiszta tannint tartalmazhatnak.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítményeket a malária kezelésére, illetve megelőzésére használhatjuk.

A készítmények orális vagy parenterális beadásra alkalmas segédanyagokat tartalmaznak.

25 Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás malária gyógyítására és/vagy megelőzésére alkalmas, cinkonin és/vagy kinin hatóanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a kínafe kérgéből extrahált kinint vagy gyógyászatban alkalmazható sóját vagy kinin és cinkonin elegyét vagy ezek gyógyászatban alkalmazható sójának elegyét, amely 2/3 rész kinint és 1/3 rész cinkonint tartalmaz és az alkaloid-bázisra vonatkoztatott 45–65 súly% mennyiségben, az *Annona senegalensis*-ből extrahált tiszta vagy 60%-os kondenzált tannint a tiszta tanninra vonatkoztatott 35–55 súly% mennyiségben, a gyógyszerkeletológiában szokásosan alkalmazott segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

40 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy alkaloidként kinint vagy gyógyászatban elfogadható sóját alkalmazzuk.

45 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kínafe-alkaloidok elegyenként a kinint és a cinkonint vagy ezek gyógyászatban elfogadható sóját alkalmazzuk.

50 4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy alkaloidként kinin-hidrokloridot használunk.

55 5. Az 1. igénypont szerinti eljárás malária elleni készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 6–15 mg/kg dózisnak megfelelő kininbázist, 5–15 mg/kg *Annona senegalensis*-ből kivont tiszta tannint vagy 8–25 mg/kg mennyiségű, *Annona senegalensis*-ből kivont 60%-os tannint a gyógyszerkeletológiában szokásos segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

60 6. Az 1. igénypont szerinti eljárás malária gyógyítására szolgáló készítmények előállítására *azzal jellemezve*, hogy a 4–10 mg/kg kininbázist és 2–5 mg/kg cinkoninbázist 5–15 mg/kg *Annona senegalensis*-ből kivont tiszta tannint vagy 8–25 mg/kg *Annona senegalensis*-ből kivont 60%-os tannint a gyógyszerkeletológiában szokásos segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

65

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás malária megelőzésére szolgáló készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 1–2,5 mg/kg dózisnak megfelelő kininbázist 1–2,5 mg/kg *Annona senegalensis*ből kivont tiszta tannint vagy 1,5–4,5 mg/kg *Annona senegalensis*ből kivont 60%-os tannint a gyógyszer technológiában szokásos anyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

5

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás malária megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,66–1,6 mg/kg kininbázist és 0,33–0,8 mg/kg cinkoninbázist 1–2,5 mg/kg *Annona senegalensis*ből kivont tiszta tannint vagy 1,5–4,5 mg/kg *Annona senegalensis*ből kivont 60%-os tannint a gyógyszer technológiában szokásos segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

Rajz nélkül
