

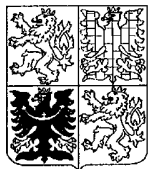
# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2000 - 4563**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.06.1999**

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

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/MI001311**

(33) Země priority: **IT**

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

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03881**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/64027**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 35/78**

**A 61 P 25/24**

(71) Přihlašovatel:

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

(72) Původce:

Bombardelli Ezio, Milano, IT;

Gabetta Bruno, Milano, IT;

Morazzoni Paolo, Milano, IT;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Extrakty z Hypericum perforatum a přípravky je obsahující**

(57) Anotace:

Extrakty Hypericum perforatum, získávané frakcionizací vodně-alkoholických, alkoholických nebo acetonových rostlinných extraktů s vodo-nemísitelnými estery C<sub>1</sub> až C<sub>5</sub> alkoholů, vykazují vysokou stabilitu a výhodně farmakologické charakteristiky a jsou využitelné pro přípravu farmaceutických přípravků pro použití jako antidepresiva.

CZ 2000 - 4563 A3

Extrakt z *Hypericum perforatum* a přípravky je obsahující

### Oblast techniky

Vynález se týká extraktu z *Hypericum perforatum* (St.-John's wort), které se získávají frakcionací vodně-alkoholických, alkoholických nebo acetonových extraktů rostliny s estery vodo-nemísitelných C<sub>1</sub> až C<sub>5</sub> alkoholů a přípravků je obsahujících.

### Dosavadní stav techniky

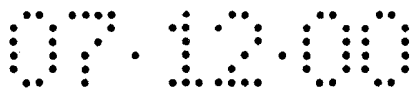
Kvetoucí vrcholky *Hypericum perforatum* obsahují mnoho tříd strukturně odlišných látek působících přímo nebo nepřímo na centrální nervový systém.

Je známo, že *Hypericum perforatum* obsahuje celou sérii aktivních látek jako je 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, jak bude detailně popsáno dále a aktivita na benzodiazepinové receptory. Aktivita hypericinu je diskutována již delší čas vzhledem k rozporným údajům popsaným v literatuře.

Kontroverzní antidepresivní účinky Hypericinu byly v nedávné době potvrzeny pomocí farmakologického in vivo modelu. Bylo skutečně prokázáno, že hypericin je aktivní, je-li podáván v přítomnosti dimerních prokyanidinů, obsažených v extraktu *Hypericum perforatum* (45. th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, 7. až 12. září, 1997, Regensburg, Německo, V. Butterwecke et al., Abstrakt č. 011).

Hyperforin 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. Další komponenty, které jsou považovány za důležité, jsou dimerické flavony odvozené od apigeninu, na něž se nahlíží jako na přírodní benzodiazepiny, jak je popsáno v „Naturally Occuring Benzodiazepines Structure, distribution and function“, I. Izquierdo and J. Medicine Eds., 1993, str. 33.

Tyto produkty, a obzvláště hyperforin, nejsou příliš stabilní za obvyklých podmínek 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, sulfurované aminokyseliny a pod.

EP 0599307 (Schwabe) popisuje odstraňování hypericinu, odpovědného za nežádoucí foto-sensitizující účinek, pomocí polyvinylpyrrolidonu a dalších chemikálií; zmíněný patent popisuje extrakty s obsahem hyperforinu nejméně 5%, získané bez použití antioxidantu.

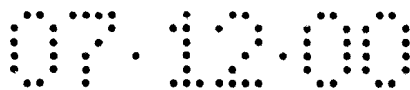
Komparativní farmakologická a klinická data mezi normálními methanolickými extrakty nebo extrakty získanými podle předpisu v lékopisném článku Komise E a extrakty připravenými podle EP 0599307 a WO 97/13489, nejsou dostupná. Na druhé straně, konvenční extrakt z *Hypericum perforatum* pozorovatelně obsahuje velké množství flavonoidů, které jsou potenciálně zachytávači radikálů a jsou tedy přirozenými stabilizujícími činidly pro snadno oxidovatelné sloučeniny, společně s dalšími látkami, které mohou významně přispívat k aktivitě extraktu.

#### Podstata vynálezu

Bylo zjištěno, že stabilní, obzvláště aktivní extrakty *Hypericum perforatum*, obsahující hlavní sloučeniny zodpovědné za jejich farmakologickou aktivitu, obzvláště hypericin, hyperforin, flavonoidy a xanthony, mohou být připraveny procesem, který zahrnuje:

- a) extrakci květních vrcholků *Hypericum perforatum* s alkoholem nebo acetonem;
- b) filtraci extraktů a jejich zakoncentrování;
- c) naředění koncentráту z kroku b) s vodou nebo směsí voda/alkohol;
- d) extrakci vodné směsi z kroku c) s alifatickými estery;
- e) filtraci a odpaření do sucha esterového extraktu z kroku d) a případně,
- f) rozpuštění v roztoku organické kyseliny ve vodném ethanolu a odpaření rozpouštědla při teplotách pod 40 °C.

Způsob podle tohoto vynálezu je s výhodou prováděn tak, že se první extrakce (krok a) provede s ethanolem nebo methanolem při poměru droga:rozpouštědlo (hmotnost/objem) pohybujícím se od 1:2 do 1:10, při teplotách v rozmezí od laboratorní teploty do teploty varu daného rozpouštědla, s výhodou při teplotách od laboratorní teploty do 40 °C.



Alifatické estery používané v kroku c) jsou například ethylacetát, methylacetát, butylacetát, přičemž ethylacetát je nejvíce preferován.

Extrakce pomocí zmíněných esterů se provádí po zpracování zakoncentrovaných alkoholických nebo acetonových extraktů se stejným objemem vody nebo směsi voda/alkohol v objemových poměrech pohybujících se od 1:2 do 1:5.

Objemový poměr mezi vodnou směsí a esterem není kritický a může se pohybovat v širokém rozmezí, obvykle se ovšem pohybuje od 1:0,5 do 1:2.

Extrakce se s výhodou provádí opakovaně, obecně alespoň třikrát, s využitím čerstvého podílu rozpouštědla.

Nepovinný krok f) se provádí rozpouštěním koncentráту z kroku e) v roztoku organické kyseliny, jako je kyselina citronová, jablečná, acetylaspartamová nebo fosforečná kyselina v 95% ethanolu.

Vzniklý extrakt podle tohoto vynálezu, analyzovaný podle M. Brolis et al., J. of Chromatography, 825 (1998), 9-16, obsahuje hyperforin v množstvích pohybujících se od 5 do 20 % hmotnosti, při použití bezprostřední rostlinné biomasy, zatímco hyperforinový obsah od 10 do 50 % hmotnosti se získá, je-li použita vybraná rostlinná biomasa. V obou případech, celkový obsah hypericinu je vyšší než 0,5%, zatímco dimerické flavony jsou přítomny v množstvích od 1 do 2 % hmotnosti. Tato široká variabilita obsahu závisí na čase sběru rostlin, obsahu semen v květních vrcholcích a na množství stonků přítomném v biomase.

Tento extrakt, ve srovnání s celkovým extraktem, má překvapivě vyšší aktivitu v různých farmakologických modelech používaných pro vyhodnocení antidepresivního a anxiolytického působení a je časově stabilní bez dalšího zvláštního opracování.

Kromě toho, způsob podle tohoto vynálezu zajišťuje stabilní extrakty bez potřeby dalšího zpracování. Extrakty by však přesto měly být chráněny před světlem, abychom se vyhnuli fotodegradaci.

Vzniklý extrakt má následující aktivitu na inhibici spotřeby serotoninu (5-HT) s dopaminu (DA).

Tabulka 1

Působení extraktu z *Hypericum perforatum* připraveného podle Příkladu 1 na inhibici spotřeby  $^3\text{H}$  5-HT a  $^3\text{H}$  DA.

Sloučeniny	IC50 $\mu\text{g/ml}$	
	$^3\text{H}$ DA	$^3\text{H}$ 5-HT
Alkoholický extrakt	4,05 $\pm$ 0,93	28,0 $\pm$ 1,7
Hexanový extrakt	0,86 $\pm$ 0,02	3,08 $\pm$ 0,62
Příklad 1	0,32 $\pm$ 0,04	2,72 $\pm$ 1,1
Hyperforin	1,54 $\pm$ 0,23	4,75 $\pm$ 0,79
Hypericin	> 50	>50
Pseudo-hypericin	1,40 $\pm$ 0,13	27,0 $\pm$ 1,10

Tato data jasně ukazují, že extrakt podle tohoto vynálezu má účinnost několikanásobně vyšší než hyperforin a další známé extrakty.

Při in vivo testech vykázal extakt podle tohoto vynálezu vyšší aktivitu než známé produkty, většinou obsahující alkoholické, methanolické, hexanové extrakty s nebo bez hypericinu; kromě toho bylo dokázáno, že extrakt má vyšší reprodukovatelnost a stabilitu působení v čase. Jako in vivo test pro ověření antidepressivního působení byl vybrán test rozvoje únikového deficitu a inhibice spotřeby ethanolu u sardinských krys preferujících alkohol podle modelů známých z literatury.

V testu rozvoje únikového deficitu vykázal překvapivě extrakt podle tohoto vynálezu vyšší aktivitu než známé extrakty a aktivitu srovnatelnou s aktivitou známých medikamentů jako je třeba imipramin. V tomto testu jsou krysy připoutány 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 (přirozený 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 antidepressiva jako je imipramin nebo fluoxetin. Extrakt *Hypericum perforatum* podle tohoto vynálezu podáváný orálně krysám jednu hodinu před vystavením nevyhnutelným stresům, způsobují zvýšení reaktivity při únikových testech, které je vyšší v případě, že byl extakt podáván 1 až 2 týdny.

## Tabulka II:

Antidepresivní účinek extraktu *Hypericum perforatum* a jeho frakcí na krysy při únikovém testu s předchozím doutýdenním podáváním.

Látka	Dávka/mg/kg	Množství úniků
Alkoholický extrakt <i>Hypericum</i>	1000	16,6 ± 2,8
Hexanový extrakt	600	17,2 ± 1,6
Příklad 1	200	23,3 ± 0,4
Příklad 1	100	18,3 ± 0,2
Příklad 1	50	13,3 ± 0,4
Kontrolní vzorek	-	1,6 ± 0,1
Přirozený kontrolní vzorek	-	24,1 ± 0,1

Statistická analýza: Kruskal-Wallis neparametrická

ANOVA KW = 13,462 p = 0,0012

*Hypericum* alkoholický extrakt a

versus přirozený kontrolní vzorek

p < 0,01

Extrakt *Hypericum* Příklad 1 versus přirozený kontrolní vzorek

n.s.

Přirozený 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 extrakty podle tohoto vynálezu po třídenním podávání 75 % snížení spotřeby alkoholu na úkor vody ve srovnání s kontrolním vzorkem, zatímco redukce spotřeby alkoholu po podávání methanolického nebo hexanového extraktu je 30 popř. 40 %.

Extrakt podle tohoto vynálezu může být zahrnut do přípravků pro orální použití, jako jsou roztoky pro bezprostřední použití, měkké želatinové kapsle, tuhé želatinové kapsle, tablety, čípky a tablety s řízeným uvolňováním. Dávky extraktu v přípravcích se pohybují od 10 do 100 mg na dávku v obvyklých přípravcích a až do 300 mg v přípravcích s řízeným uvolňováním, v tomto případě je preferovaná 300 mg denní dávka.

### Příklady provedení vynálezu

Příklady dále uvedené ilustrují detailněji tento vynález.

Příklad 1: Příprava suchého extraktu *Hypericum perforatum*, standardizovaného na aktivní složky.

4 kg květních vrcholků *Hypericum perforatum* bylo extrahováno se 4 x 15 l methanolu v extrakční nádobě o velikosti 25 l. Spojené methanolické extrakty byly ve vakuu zkoncentrovány na 2,5 l, koncentrát byl naředěn stejným objemem vody, poté protiproudě extrahován 3 x 1,5 l ethylacetátu. Organická fáze byla zfiltrována a zkoncentrována do sucha ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v roztoku 2 g kyseliny citronové v 1,3 l 95 % ethanolu. Organická vrstva byla poté odpařena do sucha za vakua při teplotách ne vyšších než 40 °C za vzniku 0,32 kg hnědo-žlutého extraktu obsahujícího 20 % hyperforinu, 0,9 % celkově hypericinů (hypericin plus pseudohypericin) a 1 % diapigeninu.

Příklad 2: Příprava extraktu *Hypericum perforatum*, standardizovaného na aktivní složky.

60 kg květních vrcholků *Hypericum perforatum*, sebraných a mechanicky sušených při teplotách nepřesahujících 60 °C, bylo extrahováno za mírného refluxu se 4 x 20 objemy acetonu. Spojené extrakty byly zfiltrovány za účelem odstranění zbytků biomasy, poté ve vakuu zkoncentrovány do sucha za vzniku 3 kg oxtraktu obsahujícího celkově 0,4% hypericinů a kolem 25 % hyperforinu. tento extrakt byl suspendován v 10 l směsi methanol/voda 3:7 a protiproudě extrahován s butylacetátem za účelem odstranění polyfenolů, přičemž odstraňování bylo kontrolováno pomocí TLC chromatografie na silikagelu, eluováním se směsí ethylacetát/mehanol/voda 100:13,5:10. Vodná fáze byla odstraněna, zatímco organická fáze byla sušena nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zkoncentrována ve vakuu do sucha při teplotách nepřevyšujících 40 °C za vzniku 1,6 kg extraktu obsahujícího celkově 0,7 % hypericinů, kolem 40% hyperforinu a 1,4 % dimerních flavonů.

Příklad 3: Příprava multisložkového extraktu *Hypericum perforatum*, standardizovaného na aktivní složky

Příklad 2: Příprava extraktu *Hypericum perforatum*, standardizovaného na aktivní složky.

60 kg květních vrcholků *Hypericum perforatum*, sebraných a mechanicky sušených při teplotách nepřesahujících 60 °C, bylo kontinuálně extrahováno s 98% methanolem až do úplného odstranění všech extrahovatelných látek. Methanolický extrakt byl poté zakoncentrován na 30 l a koncentrát byl naředěn stejným objemem vody, nerozpustné látky byly zfiltrány a čirý roztok byl extrahován 3 x 30 l ethylacetátu nasyceného vodou, poté sušen nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu za vzniku 3,8 kg hnědého extraktu obsahujícího 25 % hyperforinu, celkově 1,2 % hypericinů a 1,2 % dimerních diflavonů.

#### Příklad 4:

Roztok obsahující lipofilní extrakt *Hypericum perforatum*, připravený podle Příkladu 1.

#### Extrakt *Hypericum perforatum*, připravený

podle příkladu 1.	10,0 g
Glycyrrhizinát amonný	0,5 g
propylenglykol	35,0 g
70% sorbitolový roztok	25,0 g
Čistá voda	doplněno na 100 ml

#### Příklad 5

Potažené tablety obsahující extrakt *Hypericum perforatum*, připravený podle Příkladu 2.

#### Extrakt *Hypericum perforatum*, připravený

podle příkladu 2	300,00 mg
polysacharidy	54,75 mg
laktosa	46,00 mg
zesíťovaná sodná karboxymethylcelulosa	40,00 mg
silikát	20,00 mg
polyvinylpyrrolidon	5,00 mg
Talek	2,50 mg
stearát hořečnatý	1,75 mg

## Potáhnutí:

Hydroxypropylmethylcelulosa	10,00 mg
Talek	8,50 mg
Oxid titaničitý	5,00 mg
Triacetin	2,00 mg
Polysorbát 80	0,50 mg
Červený oxid železa	1,00 mg

---

## Příklad 6

## Měkké želatinové kapsle

Extrakt *Hypericum perforatum* z

Příkladu 1	100 mg
Monopalmitát sacharosy	100 mg
Polyethylenglykol 400	220 mg
Glycerín	15 mg
Čistá voda	15 mg

---

Průmyslová využitelnost

Extrakty *Hypericum perforatum*, získávané frakcionizací vodně-alkoholických, alkoholických nebo acetonových rostlinných extraktů s vodo-nemísitelnými estery C<sub>1</sub> až C<sub>5</sub> alkoholů, vykazují vysokou stabilitu a výhodné farmakologické charakteristiky a jsou využitelné pro přípravu farmaceutických přípravků pro použití jako antidepresiva.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy extraktů *Hypericum perforatum*, vyznačující se tím, že zahrnuje:
  - a) extrakci květních vrcholků *Hypericum perforatum* s alkoholem nebo acetonem;
  - b) filtraci extraktů a jejich zakoncentrování;
  - c) naředění koncentráту z kroku b) s vodou nebo směsí voda/alkohol;
  - d) extrakci vodné směsi z kroku c) s alifatickými estery;
  - e) filtraci a odpaření do sucha esterového extraktu z kroku d) a případně,
  - f) rozpuštění v roztoku organické kyseliny ve vodném ethanolu a odpaření rozpouštědla při teplotách pod 40 °C.
  
2. Způsob přípravy extraktů *Hypericum perforatum* podle nároku 1, vyznačující se tím, že extrakce v kroku a) se provádí v methanolu nebo ethanolu.
  
3. Způsob přípravy extraktů *Hypericum perforatum* podle nároku 1, vyznačující se tím, že extrakce v kroku a) se provádí v acetonu.
  
4. Způsob přípravy extraktů *Hypericum perforatum* podle nároku 1, vyznačující se tím, že ředění v kroku c) se provádí v methanolu nebo ethanolu.
  
5. Způsob přípravy extraktů *Hypericum perforatum* podle nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že alifatické estery použité v kroku d) jsou vybrány ze skupiny obsahující ethylacetát, methylacetát, butylacetát.
  
6. Způsob přípravy extraktů *Hypericum perforatum* podle nároku 5, vyznačující se tím, že se používá ethylacetát.
  
7. Způsob přípravy extraktů *Hypericum perforatum* podle nároku 1, vyznačující se tím, že rozpouštění v kroku f) se provádí v organických kyselinách vybraných ze skupiny obsahující kyselinu citronovou, kyselinu jablečnou, kyselinu acetylaspartamovou nebo kyselinu fosforečnou v 95% ethanolu.

8. Extrakty *Hypericum perforatum*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je lze získat způsobem přípravy podle nároků 1 až 7.

9. Extrakty *Hypericum perforatum* podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že mají obsah hyperforinu v rozsahu od 10 do 50 % hmotnosti, celkový obsah hypericinů je vyšší než 0,5 % hmotn. a obsah dimerních flavonů je od 1 do 2 % hmotn.

10. Farmaceutické přípravky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahují jako aktivní složku extrakty podle nároků 8 nebo 9.

11. Použití extraktů podle nároků 8 nebo 9 pro přípravu antidepresiv.