



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75864** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
A61K 31/045
A61K 31/22 (2006.01)
A61K 31/34

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСІБ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ ПРОЛАКТИНУ

1

2

(21) 2001053311

(22) 05.11.1999

(24) 15.06.2006

(86) PCT/EP99/08507, 05.11.1999

(31) 198 53 476.0

(32) 19.11.1998

(33) DE

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Вуттке Вольфганг, DE, Джаррі Хубертус, DE,
Попп Міхаель, DE, Крістоффел Фолкер, DE, Спен-
глер Барбара, DE

(73) БІОНОРІКА АГ, DE

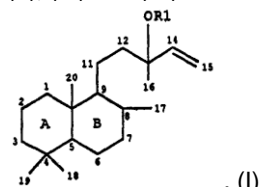
(56) WO 9624684, 15.08.1996

9963978, 16.12.1999

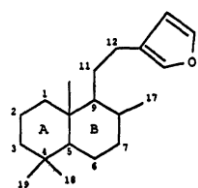
ROJAS, A. ET AL.: "Smooth muscle-relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*", PLANTA MED., vol. no. 2, 1996, pages 154-159, XP 000913597, abstract; figures 2,3; tables 1-3

MILEWICZ A.; GEJDEL E.; SMOREN H.; SIENKIEWICZ K.; JEDRZEJAK J.; TEUCHER T.; SCHMITZ H.: "Vitex agnus castus extract in the treatment of luteal phase defects due to latent hyperprolactinaemia: Results of a randomized placebo-controlled double blind study", ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG, vol. 43, 1993, pages 752-756, XP000913700, the whole document

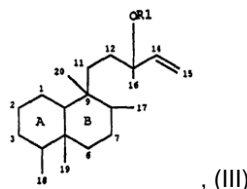
(57) 1. Лікарський засіб для зменшення рівнів пролактину, який містить принаймні один біциклічний дитерпен лабданового чи клероданового типу відповідно до принаймні однієї загальної формули (I), (II), (III) або (IV):



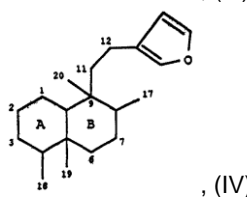
, (I)



, (II)



, (III)



, (IV)

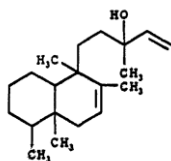
де R1 = H, C₁-C₃-алкіл або C₁-C₃-ацил;
де кільця A і/або B у випадку загальної формули (I) або (II) необов'язково заміщені в положенні 1, 2, 3, 6, 7, 8 або 9 принаймні одним радикалом OX, де X = H, C₁-C₃-алкіл або C₁-C₃-ацил;
де кільця A і/або B у випадку загальної формули (III) або (IV) необов'язково заміщені у положенні 1, 2, 3, 4, 6, 7 або 8 принаймні одним радикалом OX, де X = H, C₁-C₃-алкіл або C₁-C₃-ацил;
де, необов'язково, принаймні один атом вуглецю у положенні 17, 18, 19 і 20 заміщений радикалом OX, де X = H, C₁-C₃-алкіл або C₁-C₃-ацил;
де, необов'язково, принаймні одна група CH₃ у положенні 17, 18, 19 і 20 заміщена однією групою COOH;
де, необов'язково, принаймні одне з положень кільця 1, 2, 3, 6 або 7 є кетогрупою; і
де, необов'язково, принаймні один подвійний зв'язок присутній в положеннях кільця 1, 2, 3, 6, 7, 8, 8(17) формули (I) і (III); та
де, необов'язково, принаймні один подвійний зв'язок присутній в положеннях кільця 1, 2, 3, 6, 7, 8, 8(17) формули (II) і 1, 2, 3, 4(18), 6, 7, 8, 8(17) формули (IV);
за винятком таких сполук:
ротундифуран, склареол, лариксолацетат, 7 α -гідрокси-маноол, (+) гардвіківа кислота, кролехінова кислота, гуатривайнова кислота, ент-15,16-епокси-9 α Н-лабда-13(16)14-дієн-3 β , 8 α -діол, солідагенон і 15,16-епокси-8(17),14,16-лабдатриєн-19-оїнової кислоти метиловий ефір.

(13) **C2**

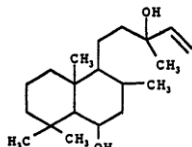
(11) **75864**

(19) **UA**

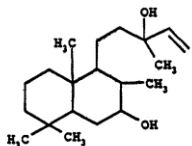
2. Лікарський засіб для зменшення рівнів пролактину за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить сполуку, яка має таку формулу:



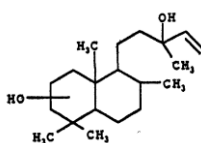
3. Лікарський засіб для зменшення рівнів пролактину за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить сполуку, яка має таку формулу:



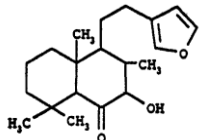
4. Лікарський засіб для зменшення рівнів пролактину за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить сполуку, яка має таку формулу:



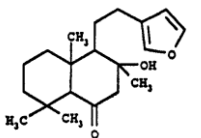
5. Лікарський засіб для зменшення рівнів пролактину за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить сполуку, яка має таку формулу:



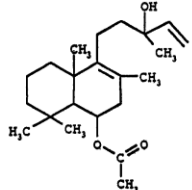
6. Лікарський засіб для зменшення рівнів пролактину за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить сполуку, яка має таку формулу:



7. Лікарський засіб для зменшення рівнів пролактину за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить сполуку, яка має таку формулу:



8. Лікарський засіб для зменшення рівнів пролактину за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить сполуку, яка має таку формулу:



9. Застосування сполуки відповідно до будь-якого

з пунктів 1-8 для приготування лікарського засобу для зменшення рівнів пролактину для лікування передменструального синдрому, мастодинії, розладів менструального циклу, зокрема від оліго- до аменореї.

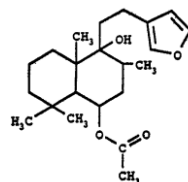
10. Клерод-У,14-дієн-13-ол, де У = положення кільця 1, 2, 3, 4(18), 6, 7 або 8(17).

11. Застосування клероду-У,14-дієн-13-олу, де У = положення кільця 1, 2, 3, 4(18), 6, 7 або 8(17), для приготування лікарського засобу для зменшення рівнів пролактину або для приготування ліків для лікування передменструального синдрому, мастодинії, розладів менструального циклу, зокрема від оліго- до аменореї.

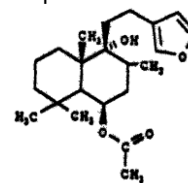
12. Клерод-У,Z,14-триєн-13-ол, де У або Z = положення кільця 1, 3 або 1, 4(18), або 1, 6, або 1, 7, або 1, 8(17), або положення кільця 2, 4(18) або 2, 6, або 2, 7, або 2, 8(17) або положення кільця 4(18), 6 або 4(18), 7, або 4(18), 8(17), або положення кільця 6, 8(17).

13. Застосування клероду-У,Z,14-триєн-13-олу, де У або Z = положення кільця 1, 3 або 1, 4(18), або 1, 6, або 1, 7, або 1, 8(17), або положення кільця 2, 4(18) або 2, 6, або 2, 7, або 2, 8(17), або положення кільця 4(18), 6 або 4(18), 7, або 4(18), 8(17), або положення кільця 6, 8(17), для приготування лікарського засобу для зменшення рівнів пролактину або для приготування ліків для лікування передменструального синдрому, мастодинії, розладів менструального циклу, зокрема від оліго- до аменореї.

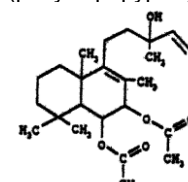
14. Застосування сполуки, вибраної з групи, яка складається з сполук, що мають таку формулу:



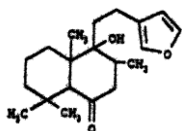
зокрема



(ротумаріфуран);



(склареол); а також



(солідагенон);

для приготування лікарського засобу для зменшення рівнів пролактину.

Даний винахід стосується лікарських засобів для зменшення рівнів пролактину.

Екстракти вербняку звичайного (*Vitex agnus-castus*) вже давно використовуються в медицині природних засобів для лікування передменструального синдрому. Незадовго перед менструацією пацієнтки часто скаржаться на відчуття напруженості в грудях, що клінічно супроводжується підвищеним рівнем пролактину.

Екстракти вербняку звичайного мають властивість зменшувати рівень пролактину, що клінічно та фармакологічно підтверджується в попередньому рівні техніки. У попередньому рівні техніки робились численні спроби охарактеризувати або навіть виділити ті речовини вербняку звичайного, які саме полегшують стан передменструального синдрому.

Так, дисертація Daniel Berger "Vitex agnus-castus: Unbedenklichkeit und Wirksamkeit beim pramenstruellen Syndrom, Wirkphnzipien and Wirkmechanismen eines neu entwickelten Extraktes" [Вербняк звичайний: Визнана безпечність та ефективність при передментруальному синдромі, діючі принципи і механізми нового розробленого екстракту], Факультет Філософії та Природничих наук Базельського університету, 13 січня 1998р., розглядає численні аспекти, пов'язані з вербняком звичайним.

У цій дисертації описано ряд різних складових, які вивчалися для пояснення фармакологічних властивостей лікарського засобу.

Так і в препаратах з листя, і в препаратах з плодів вербняку звичайного було виявлено іридоїдні глікозиди аукубін, агнузид та евростозид.

Крім того, з плодів можна виділити ліпофільні флавоноли кастицин, пендулетин, хризоспленол D і 3,6,7,4'-тетраметильовий ефір 6-гідроксикемпферолу.

У попередньому рівні техніки також описується, що в плодах вербняку звичайного можна виявити прогестерон, 17 α -гідроксипрогестерон, тестостерон і епітестостерон.

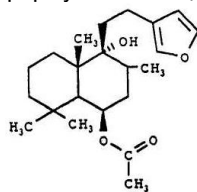
Крім цього, ще близько 73 різні сполуки було виявлено у плодах вербняку звичайного, в основному монотерпени, такі як α -пінен, сабінен, β -феландрен і 4-терпінеол, та сесквітерпени, такі як β -каріофілен, ало-аромадендрен, гермакрен B, спатуленол та τ -кадінол.

Окрім зазначених вище класів речовин, у плодах вербняку звичайного виявлені значні кількості жирних кислот: насичених, моновенасичених і поліненасичених. Так, у плодах виявлено, наприклад, α -ліноленову кислоту, олеїнову кислоту, стеаринову кислоту, пальмїтинову кислоту, лінолеву кислоту та адренову кислоту.

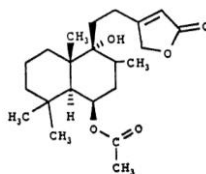
Подальше дослідження ефірної олії з плодів

вербняку звичайного також виявляє присутність дитерпенів. У зазначеній вище дисертації повідомляється, що з плодів вербняку звичайного було виділено такі дитерпени:

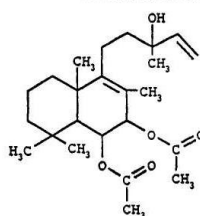
ротундифуран, вітексилактон і 6 β ,7 β -діацетокси-13-гідрокси-лабда-8,14-дієн, структурні формули яких подано нижче:



Ротундифуран



Вітексилактон



6 β ,7 β -Діацетокси-13-гідрокси-лабда-8,14-дієн

У попередньому рівні техніки застосовувались численні способи тестування з метою визначення механізмів дії екстрактів вербняку звичайного і того, чи може якась певна речовина або клас речовин пояснити фармакологічні ефекти повного екстракту.

Так, проводились, наприклад, вимірювання на різних опіоїдних рецепторах, на рецепторі бензодіазепіну, на сайті репоглинання серотоніну, на рецепторі гістаміну- H_1 та рецепторі допаміну- D_2 .

З метою перевірки результатів досліджень зв'язування рецепторів, проведених на рецепторі допаміну- D_2 з фракціями, одержаними з вербняку звичайного, і, отже, визначення дійсних діючих речовин у зазначеному попередньому рівні техніки проводились експерименти з відомими складовими вербняку звичайного (чистими речовинами). Такими чистими складовими були аукубін, кастицин, гоморієнтин, лінолева кислота, лутеолін-7-глікозид, орієнтин і дитерпени вітексин, ротундифуран, 6 β ,7 β -діацетокси-13-гідрокси-лабда-8,14-дієн.

Проте, у зазначеній дисертації [сторінка 154,

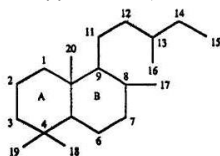
Глава 2.3.4.5] ясно вказується, що жодна з випробовуваних сполук не мала достатньо низьку величину IC_{50} , щоб можна було пояснити (лише цією єдиною сполукою) дію і, отже, фармакологічні ефекти повного екстракту або ліпофільної гексанової фракції вербняку звичайного.

Виходячи з зазначеного попереднього рівня техніки, мета цього винаходу полягає у забезпеченні чистих речовин з плодів вербняку звичайного, що зробить можливим виробництво лікарського засобу для лікування передменструального синдрому у вигляді фармацевтичної композиції.

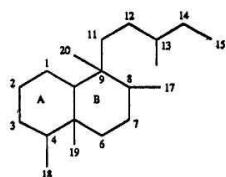
Зазначена мета досягається лікарським засобом за пунктом 1 та новими речовинами за пунктом 12 і пунктом 14.

У рамках даного винаходу було несподівано виявлено, що сполуки з класу біциклічних дитерпенів справляє вплив, що полягає у зменшенні рівнів пролактину, на культивовані гіпофізарні клітини щурів. Дуже ймовірно, що цей механізм може бути перенесено на людей.

Діючі дитерпени можуть мати скелетну структуру, як лабданового, так і клероданового типу:

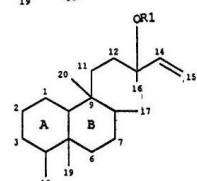
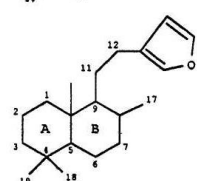
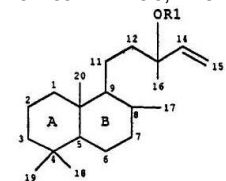


Лабданова структура



Клероданова структура

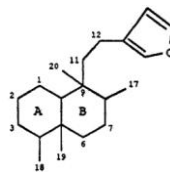
Зокрема, було виявлено, що ефект зменшення рівнів пролактину на культивовані гіпофізарні клітини може досягатись з використанням сполук відповідно до загальних формул I-IV, які мають, у той самий час, низьку цитотоксичність:



(I)

(II)

(III)



(IV)

де $R^1 = H$, C_1-C_3 алкіл або C_1-C_3 ацил;

де кільця A і/або B у випадку загальної формули (I) або (II) необов'язково заміщені в положенні 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 або 9, принаймні, одним радикалом OX , де $X = H$, C_1-C_3 алкіл або C_1-C_3 ацил;

де кільця A і/або B у випадку загальної формули (III) або (IV) необов'язково заміщені в положенні 1, 2, 3, 4, 6, 7 або 8, принаймні, одним радикалом OX , де $X = H$, C_1-C_3 алкіл або C_1-C_3 ацил;

де, необов'язково, принаймні один атом вуглецю у положеннях 17, 18, 19 і 20 заміщений радикалом OX , де $X = H$, C_1-C_3 алкіл або C_1-C_3 ацил;

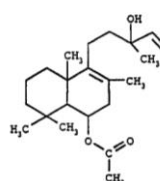
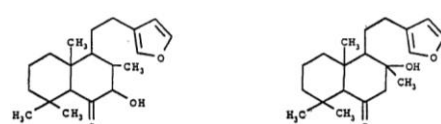
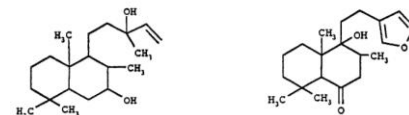
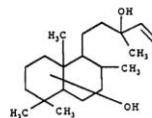
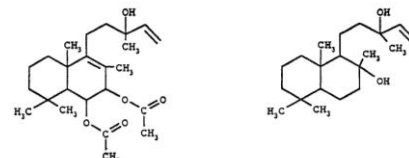
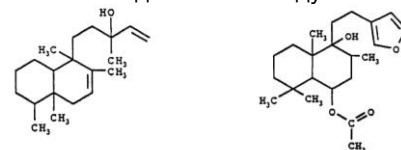
де, необов'язково, принаймні, одна група CH_3 у положеннях 17, 18, 19 і 20 заміщена групою $CO-OH$;

де, необов'язково, принаймні, одне з положень кільця 1, 2, 3, 6 або 7 є кетогрупою; і

де, необов'язково, принаймні, один подвійний зв'язок присутній в положеннях кільця 1, 2, 3, 6, 7, 8, 8(17) формули (I) і (III); та

де, необов'язково, принаймні, один подвійний зв'язок присутній в положеннях кільця 1, 2, 3, 4(18), 6, 7, 8, 8(17) формули (II) і (IV).

Наведені нижче сполуки є більш прийнятними втіленнями даного винаходу:



а також

клерода-У,14-дієн-13-ол, де У= положення кільця 1, 2, 3, 4 (18), 6, 7 або 8 (17); та

клерода-У,З,14-триєн-13-ол, де У або З= положення кільця 1, 3 або 1, 4(18) або 1, 6 або 1, 7 або 1, 8(17) або положення кільця 2, 4(18) або 2, 6 або 2, 7 або 2, 8(17) або положення кільця 4(18), 6 або 4(18), 7 або 4(18), 8(17) або положення кільця 6, 8(17).

Вдалося збагатити та охарактеризувати подібні сполуки з етанольно-водного екстракту плодів вербняку звичайного, одержаного фракціонованою ліпофільною екстракцією, та визначити їх структуру.

Зокрема, екстракція високоліпофільними розчинниками, такими як вуглеводні C_5 - C_{10} з середньою довжиною ланцюга, зокрема, н-гексан, давала збільшення ефекту зменшення рівнів пролактину. Більше того, екстракція з плодів вербняку звичайного надкритичною вуглекислою давала посилення діючого принципу, що можна звести до сполук загальних формул I-IV.

Усі сполуки відповідно до цього винаходу, структурні формули яких наведені вище, демонструють інгібування виділеного пролактину на лактотропних клітинах гіпофізу щурів.

В окремих тестах на цитотоксичність було виявлено, що всі виділені та охарактеризовані відповідно до цього винаходу сполуки мали низьку цитотоксичність, що робить їх особливо привабливими для створення фармацевтичних композицій.

Крім того, було виявлено, що названі речовини також зв'язуються з рецептором рекомбінантного допаміну- D_2 людини.

Подальші вигоди і ознаки даного винаходу випливають з опису втілень та креслень, де:

Фіг.1 ілюструє вплив біциклічних дитерпенів на вивільнення пролактину з культивованих гіпофізарних клітин щурів.

Етанольний екстракт з плодів вербняку звичайного готують у відомий по суті спосіб шляхом мацерації або перколяції органічними розчинниками або сумішами органічних розчинників з водою або надкритичною вуглекислою.

З цією метою застосовують, більш прийнятно, суміші етанолу з водою у співвідношенні від 50:50 до 90:10 при температурі від 20 до 60°C.

Одержаний таким чином екстракт розподіляють між двома незмішуваними фазами, що мають різну полярність. Для цього в якості ліпофільної фази використовують алкани, галогеновані вуглеводні, кетони, складні ефіри, а в якості гідрофільної фази - спирти і воду. Більш прийнятно, використовують ідентичні об'єми C_5 - C_7 алканів та сумішей етанолу/води у співвідношенні 1:2-1:10.

Ліпофільна фаза має активність зменшення рівню пролактину. Вона може бути далі очищена у відомі способи, такі як, наприклад, рідинна хроматографія високого тиску та препаративна тонкошарова хроматографія відомим, по суті, методом.

З 1кг розмелених плодів вербняку звичайного готують екстракт шляхом перколяції 10л етанолу/води 6/4(об./об.). Одержаний з цього концентрований екстракт, що має сухий залишок 1,75г, розподіляють між 375 мл 15% EtOH та 375мл н-

гексану у ділительній лійці, фазу н-гексану вилучають, а водну фазу екстрагують знову струшуванням з н-гексаном.

Подальша концентрація за пониженого тиску об'єднаних гексанових фаз дає 300мг залишку.

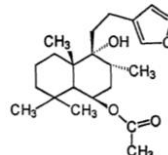
Одержаний таким чином залишок далі відділяють за допомогою рідинної хроматографії високого тиску. Для цього використовують колонку 21,4×300мм з C-18 матеріалом, що має розмір частинок 8мкм, в якості нерухомого середовища. Хроматографію проводять у потоку 10мх/хвил. суміші ацетонітрилу/води 60/40 в якості розчинника. Після завантаження зразку вміст ацетонітрилу лінійно збільшується до 100% протягом 60 хвилин.

Усі дитерпени елюють в об'ємі між 350 та 450мл. З 300мг гексанової фази одержують приблизно 38мг суміші дитерпенів. Ці дитерпени у підходящий спосіб збирають у вигляді фракцій.

Подальше очищення одержаної таким чином суміші дитерпенів проводять за допомогою препаративної тонкошарової хроматографії на силікагельних шарах завтовшки 1 мм з різними агентами потоку відповідно до опису, наведеного нижче для окремих речовин. Виявлення здійснюють реагентом анісового альдегіду (DAB 10, 1997). Зони чистих дитерпенів на тонкошаровій пластині елюють, використовуючи хлороформ/метанол, та аналізують за допомогою поєднаної газової хроматографії та мас-спектрометрії.

Приготування 98-146 (позначений «146» на Фіг.1):

6β-Ацетокси-9α-гідрокси-15,16-епокси-13(16),14-лабдадієн (ротундифуран)



Агент потоку: хлороформ/метанол 95/5

Величина Rf: 0,75

Характеристичні фрагменти недериватованої речовини у ГХ-МС:

$m/z=362$ [M]⁺, 344, 302, 287, 284, 207, 150, 135, 95, 81.

Приготування 98-119 (позначений «119» на Фіг.1.):

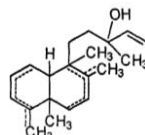
Клерода-у,14,-дієн-13-ол

Агент потоку: хлороформ / метанол 95/5

Величина Rf: 0,63

Характеристичні фрагменти недериватованої речовини у ГХ-МС:

$m/z=290$ [M]⁺, 272, 257, 243, 229, 191, 189,



Приготування 98-153 (не зображено на Фіг.1):

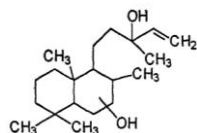
х,13-Дигідрокси-14-лабден

Агент потоку: хлороформ/метанол 95/5

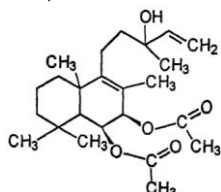
Величина Rf: 0,37

Характеристичні фрагменти недериватованої речовини у ГХ-МС:

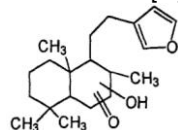
$m/z=290$ [M-H₂O]⁺, 275, 272, 257, 191, 177



Приготування 98-152 (не зображено на Фіг.1):
6β,7β-Діацетокси-13-гідрокси-лабда-8,14-дієн
Агент потоку: хлороформ/метанол 99/1
Відстань потоку 16см, розвинутий 3х
Величина Rf: 0,5
Характеристичні фрагменти недериватованої речовини у ГХ-МС:
 $m/z=346 [M-60]^+$, 307, 304, 286, 247, 205, 187, 177, 135



Приготування 98-166 (позначений «166» на Фіг.1):
х-Гідрокси-у-кето-15,16-епокси-13(16),14-лабдадієн
Агент потоку: хлороформ/н-гексан 90/10
Розвинутий 3х, відстань потоку 16см
Величина Rf: 0,74
Характеристичні фрагменти недериватованої речовини у ГХ-МС:
 $m/z=318 [M]^+$, 300, 285, 193, 166, 95, 81



Приготування 98-167 (позначений «167» на Фіг.1):

х-Ацетокси-13-гідрокси-лабда-у,14-дієн

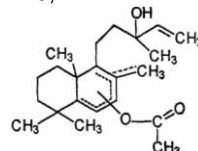
Агент потоку: хлороформ/н-гексан 90/10

Розвинутий 3х, відстань потоку 16см

Величина Rf: 0,55

Характеристичні фрагменти недериватованої речовини у ГХ-МС:

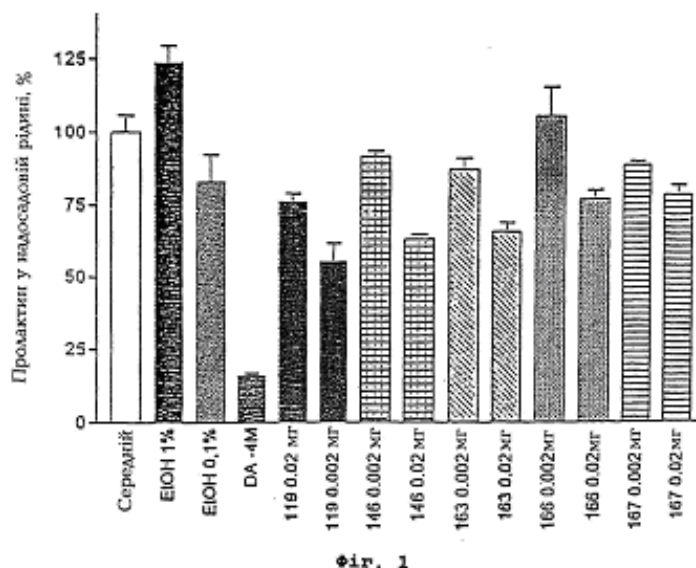
$m/z=330 [M-H_2O]^+$ 288, 270, 255, 249, 189, 132, 119, 71



Вплив на вивільнення пролактину:

Визначення вивільнення пролактину з культивованих гіпофізарних клітин самців щурів проводили, [як описано в Jarry et. al., Experimental and Clinical Endocrinology, Vol.102, (1994) 448-454]. Дитерпени додавали до культур клітин в етанольному розчині. Відповідні етанольні концентрації та допамін використовували в якості контролю.

Середнє значення виміряної концентрації пролактину у надосадовій рідині клітин, інкубованих у недоповненому середовищі, прийняте за 100%. Дитерпени значно зменшують вивільнення пролактину. Результати подані на Фіг.1, яка ілюструє зменшення вивільнення пролактину з культивованих гіпофізарних клітин щурів, спричинене біциклічними дитерпенами. В якості контролю використовувались середовище, середовище плюс етанол і 10^{-4} молярний допамін (=DA-4M). Концентрації наведені у мг дитерпену на мл середовища.



Фіг. 1