

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293300 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

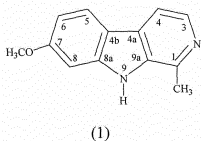
(43) Дата публикации заявки
2024.03.29(22) Дата подачи заявки
2022.09.12(51) Int. Cl. A61K 31/437 (2006.01)
A61K 36/77 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НОВОГО НЕЙРОТРОПНОГО, АНТИДЕПРЕССАНТНОГО СРЕДСТВА

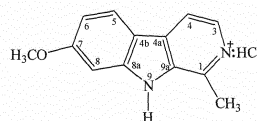
(96) KZ2022/049 (KZ) 2022.09.12

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
АДЕКЕНОВ СЕРГАЗЫ
МЫНЖАСАРОВИЧ (KZ)

(57) Изобретение относится к области биоорганической химии, фармацевтической химии, технологии лекарств и фармакологии, касается способа выделения из растительного сырья и очистки алкалоида индольного ряда гармина [7-метокси-1-метил-9Н-пиридо[3,4-б]индол] (1) и его гидрохлорида (2), который может быть использован в качестве нейротропного, антидепрессантного средства



(1)



(2)

Технический результат заявляемого изобретения достигается тем, что действующее вещество нейротропного, антидепрессантного средства - гармин получают двукратной перколяцией 96%-ным этиловым спиртом, подщелоченных 5%-ным раствором карбоната натрия корней гармалы обыкновенной при следующих условиях: соотношение сырье-экстрагент 1:10, температура 65,0°C, продолжительность 3 ч, перемешивание со скоростью 60 об/мин, перколирование со скоростью 20 л/ч, с последующей хроматографической очисткой суммы экстрактивных веществ на колонке с окисью алюминия (III степени активности), в качестве элюента используется смесь нефрас:этилацетат (1:1) и перекристаллизацией гармина из 96%-ного этилового спирта. Действующее вещество нейротропного, антидепрессантного средства - 7-метокси-1-метил-9Н-пиридо[3,4-б]индол-2N-гидрохлорид (2) получают при взаимодействии (1) с соляной кислотой в этаноле. Установлено, что в тесте по Порсолту 7-метокси-1-метил-9Н-пиридо[3,4-б]индол-2N-гидрохлорид (2) проявляет выраженный антидепрессантный эффект. В эксперименте подтвержден противопаркинсонический эффект гармина гидрохлорида (2), сопоставимый с препаратом сравнения "Леводопа" по результатам оценки выраженности ригидности, олигокинезии, моторных и координаторных нарушений. Данные молекулярного докинга 7-метокси-1-метил-9Н-пиридо[3,4-б]индола достоверно согласуются с результатами экспериментов и свидетельствуют о наличии прочных связей у молекулы (1) с моноаминооксидазами А и В (-7,510, -7,395 ккал/моль, соответственно), что подтверждает механизм антидепрессантного действия гармина (1) на уровне синоптической нейротрансмиссии.

A1

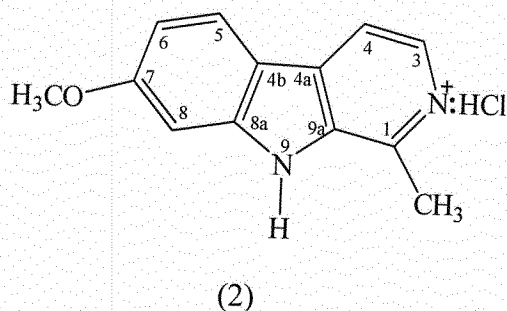
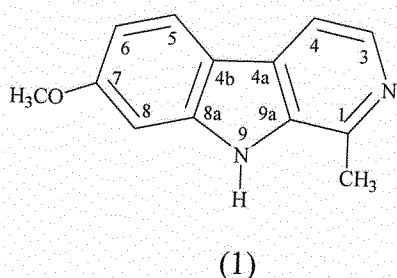
202293300

202293300

A1

Способ получения нового нейротропного, антидепрессантного средства

Изобретение относится к области биоорганической химии, фармацевтической химии, технологии лекарств и фармакологии, касается способа выделения из растительного сырья и очистки алкалоида индольного ряда гармина [7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол] (1) и его гидрохлорида (2), который может быть использован в качестве нейротропного, антидепрессантного средства.



Целью изобретения является расширение арсенала природных соединений с нейротропной и антидепрессантной активностью и разработки способа их получения.

Аналогом по назначению является препарат «Амитриптилин» - 5-(3-диметиламинопропилиден)-10,11-дигидродибензоциклогептена гидрохлорид, трициклический антидепрессант, оказывает седативное, тимолептическое действие. Является ингибитором обратного нейронального захвата медиаторных аминов, включая норадреналин, дофамин, серотонин

Другим аналогом по назначению является противопаркинсонический препарат «Леводопа» - 3-Гидрокси-L-тирозин. Устраняет гипокинезию, ригидность, тремор, усиливает действие ингибиторов моноаминоксидазы (Машковский М.Д., Лекарственные средства. - Москва: Новая волна, 2007. - С. 138-139).

Референс-препараты имеют ряд недостатков. Так, при приеме амитриптилина и леводопы могут наблюдаться сухость во рту, расширение зрачков, нарушение аккомодации, сонливость, головокружение, тремор рук, парестезия, аритмия, тахикардия, аллергические реакции.

Известны способы получения алкалоидов гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.):

Способ 1. Семена гармалы обыкновенной экстрагируют 80% этиловым спиртом (гидромодуль 1:30) в течение 10 мин при температуре 80°C (нагревание микроволнами, мощность излучения 600 Вт). Полученное извлечение упаривают и разделяют с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенно-фазовом сорбенте, в качестве элюента используют градиент смеси 0,1 М буферный раствор ацетата аммония:ацетонитрил от 70:30 до 96:4. УФ-детектирование при 280 нм. Получают гармин с выходом 1,44%. (Патент Китая № CN104628731. Method for extracting *Peganum harmala* alkaloid under microwave assistance. Shang Xiaofei, Pan Hu, Miao Xiaolou, Wang Dongsheng, Wang Xuezhi, Wang Yu, Zhang Jiyu; Оpubл. 20.05.2015 г.).

Способ 2. Измельченные корни гармалы обыкновенной пятикратно экстрагируют 96 % этиловым спиртом. При этом получают сумму экстрактивных веществ с выходом 9,41 % (от веса воздушно-сухого сырья), хроматографическим разделением которой на колонке с окисью алюминия (II ст. активности), используя в качестве элюента этиловый спирт, выделяют гармин с выходом 1,23 % в пересчете на воздушно-сухое сырье (Инновационный патент РК 23473 РК. Гидрохлорид 7-метокси-1-метил-9Н-пиридо[3.4-*b*]индола, обладающий высокой цитотоксичностью и эффективным влиянием на апоптоз опухолевых клеток / Нурмаганбетов Ж.С., Мукушева Г.К., Исмагулова Н.М., Турмухамбетов А.Ж., Адекенов С.М.; опубл. 15.12.2010).

Способ 3. Семена гармалы обыкновенной трехкратно экстрагируют 95% этиловым спиртом в соотношении 1:10, экстракты объединяют и концентрируют под вакуумом. Остаток растворяют в 1% растворе соляной кислоты и подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 9,5 в течение 1 часа. Выпавший осадок отфильтровывают и сушат. Разделение суммы алкалоидов осуществляют с применением жидкость-жидкостной хроматографии в системе растворителей трет-бутиловый эфир / тетрагидрофуран / вода (2:2:3 по объему), с добавлением триэтиламина (10 мМ) в стационарную фазу и соляной кислоты (5 мМ) в подвижную фазу. Скорость элюирования 1,5 мл/мин. Время разделения 9 ч. Выделяют гармин с выходом 1,19% в пересчете на воздушно-сухое сырье. (Xiao Wang, Yanling

Geng, Daijie Wang, Xingang Shi, Jianhua Liu Separation and purification of harmine and harmaline from *Peganum harmala* using pH-zonerefining counter-current chromatography // J. Sep. Sci. 2008, 31, 3543 – 3547).

Недостатками вышеописанных способов являются:

1. Высокая температура экстракции, приводит к увеличению потери экстрагента - этанола до 20% (способ 1);

2. высокие производственные затраты при разделении методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, так как используется дорогостоящий элюент - ацетонитрил (стоимость 1 кг ацетонитрила составляет от 7100 до 10000 тенге) (способы 1 и 3);

3. длительность процесса (способы 1-3) и использование буферных растворов, что делает невозможным регенерацию растворителей, вследствие чего возрастает себестоимость целевого вещества.

Технический результат заявляемого изобретения достигается тем, что гармин (1) выделяют двукратной перколяцией 96%-ным этиловым спиртом корней гармалы обыкновенной, подщелоченных 5%-ным раствором карбоната натрия при следующих условиях: соотношение сырье - экстрагент 1:10, температура 65 °С, время экстракции 3 часа, перемешивание со скоростью 60 об/мин, скорость перколирования 20 л/ч, с дальнейшей хроматографической очисткой суммы экстрактивных веществ на колонке с окисью алюминия (III степени активности) смесью нефрас:этилацетат (1:1) и перекристаллизацией гармина (1) из 96%-ного этилового спирта.

Действующее вещество нейротропного, антидепрессантного средства 7-метокси-1-метил-9Н- пиридо [3,4-*b*] индол-2N-гидрохлорид (2) получают при взаимодействии (1) с соляной кислотой в этаноле.

Способ получения нейротропного, антидепрессантного средства включает две стадии:

1 – Выделение 7-метокси-1-метил-9Н-пиридо[3,4-*b*]индола(1) из корней гармалы обыкновенной.

2 – Синтез гармина (1) с соляной кислотой с целью получения его водорастворимой формы - гидрохлорида гармина (2).

Способ получения гармина (1) осуществляется следующим образом:

Способ 1. Измельченные корни гармалы обыкновенной (размер частиц 2-3 мм) смачивают приготовленным 5%-ным раствором карбоната натрия в течение 1 часа. После истечения положенного времени фильтрат сливают, а влажные корни высушивают при комнатной температуре на стеллаже для высушивания сырья в сухом помещении с хорошей циркуляцией воздуха и при отсутствии прямых солнечных лучей.

Воздушно-сухое сырье корней гармалы обыкновенной (степень измельчения 2-3 мм) после подщелачивания, массой 6,0 кг загружают в мешки из бязи, помещают в экстрактор, заливают экстрагентом в количестве 60,0 кг (соотношение сырье - экстрагент 1:10), нагревают до температуры 65 °С и экстрагируют в течение 3 часов, затем настаивают в течение 24 часа. Экстракт, сливают и упаривают на ротационном испарителе под вакуумом.

Экстракцию по данному способу проводят повторно. Извлекают сумму экстрактивных веществ с выходом 11,8% (в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Способ 2. Воздушно-сухое сырье корней гармалы обыкновенной (степень измельчения 2-3 мм) после подщелачивания по способу 1, массой 6,0 кг загружают в корзину перколятора, заливают экстрагентом в количестве 60,0 кг (соотношение сырье - экстрагент 1:10), нагревают до температуры 65 °С и экстрагируют в течение 3 часов при постоянном перемешивании и перколировании со скоростью 20 л/ч. Экстракт охлаждают, сливают и упаривают на ротационном испарителе под вакуумом, получают сумму экстрактивных веществ с выходом 10,3% (в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Способ 3. Воздушно-сухое сырье корней гармалы обыкновенной (степень измельчения 2-3 мм) после подщелачивания по способу 1, массой 4,0 кг загружают в корзину перколятора, заливают экстрагентом в количестве 60,0 кг (соотношение сырье - экстрагент 1:15), нагревают до температуры 65 °С и экстрагируют в течение 4 часов при постоянном перемешивании и перколировании со скоростью 20 л/ч. Экстракт охлаждают, сливают и упаривают на ротационном испарителе под вакуумом, получают сумму экстрактивных веществ с выходом 10,1% (в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Способ 4. Воздушно-сухое сырье корней гармалы обыкновенной (степень измельчения 2-3 мм) после подщелачивания по способу 1, массой 6,0 кг загружают в корзину перколятора, заливают экстрагентом в количестве 120,0 кг (соотношение сырье - экстрагент 1:20), нагревают до температуры 65 °С и экстрагируют в течение 3 часов при постоянном перемешивании и перколировании со скоростью 20 л/ч. Экстракт охлаждают, сливают и упаривают на ротационном испарителе под вакуумом, получают сумму экстрактивных веществ с выходом 12,9% (в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Способ 5. Воздушно-сухое сырье корней гармалы обыкновенной (степень измельчения 2-3 мм) после подщелачивания по способу 1, массой 6,0 кг загружают в корзину перколятора, заливают экстрагентом в количестве 60,0 кг (соотношение сырье - экстрагент 1:10), нагревают до температуры 65 °С и экстрагируют в течение 3 часов при постоянном перемешивании и перколировании со скоростью 20 л/ч. Экстракт охлаждают, сливают и упаривают на ротационном испарителе под вакуумом. Экстракцию вышеприведенным способом проводят повторно. Получают сумму экстрактивных веществ с выходом 12,9% (в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Выделение и очистка гармина (1).

Способ 6. Сумму экстрактивных веществ массой 0,3 кг, полученную по способу 5, хроматографируют на колонке с окисью алюминия (III степени

активности, соотношение сумма экстрактивных веществ - сорбент 1:20), в качестве элюента используют этилацетат. Фракции, содержащие гармин (1), объединяют и упаривают. Полученный технический гармин (1) перекристаллизовывают из этилового спирта и сушат. Получают гармин (1) массой 25,3 г. Выход гармина (1) в расчете на сумму экстрактивных веществ составляет 8,43% (1,09 % в расчете на воздушно-сухое сырье).

Способ 7. Сумму экстрактивных веществ массой 0,774 кг, полученную по способу 5, хроматографируют на колонке с окисью алюминия (III степени активности), соотношение сумма экстрактивных веществ – сорбент = 1:20, в качестве элюента используют смесь нефрас:этилацетат (7:3). Фракции, содержащие гармин (1), объединяют и упаривают. Полученный технический гармин (1) перекристаллизовывают из этилового спирта и сушат. Получают гармин (1) массой 63,78 г. Выход гармина (1) в расчете на экстракт составляет 5,5% (0,71 % в пересчете на воздушно-сухое сырье).

Способ 8. Сумму экстрактивных веществ массой 0,774 кг, полученную по способу 5, хроматографируют на колонке с окисью алюминия (III степени активности), соотношение сумма экстрактивных веществ - сорбент = 1:20 в качестве элюента используют смесь нефрас:этилацетат (1:1). Фракции, содержащие гармин (1), объединяют и упаривают. Технический гармин (1) перекристаллизовывают из этилового спирта и сушат. Получают гармин массой 78,0 г. Выход гармина (1) в пересчете на экстракт составляет 1,14% (1,3 % в расчете на воздушно-сухое сырье).

Гармин - 7-Метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорид

(1). Брутто-формула: $C_{13}H_{12}N_2O$. М.м. 212.

Температура плавления 262-264 °С.

Элементный анализ: Найдено, %: С 73.57; Н 5.69; N 13.19.

Вычислено, %: С 73.32; Н 5.81; N 13.16.

ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 3145, 3075 (NH), 2965 (OCH₃ фенильного фрагмента), 2885, 2833, 2763 (C-H), 1627, 1619 (C=N), 1564, 1511, 1483, 1453 (C=C), 1388, 1325 (C-C).

УФ-спектр (λ_{max} , нм): 241, 301.

Спектр ЯМР ¹H (600 МГц, CDCl₃, δ , м.д.): 2.74 (3H, с, CH₃ при C-1); 3.88 (3H, с, OCH₃ при C-7); 6.83 (1H, дд, J=8.73, 2.29, H-6); 7.00 (1H, д, J=2.29, H-8); 7.74 (1H, д, J=5.44, H-4); 7.93 (1H, д, J=8.73, H-5); 8.06 (1H, д, J=5.44, H-3).

Спектр ЯМР ¹³C (125,76 МГц, CDCl₃, δ , м.д.): 18.27 (к, CH₃ при C-1); 54.69 (к, C-7, OCH₃ при C-7); 94.15 (д, C-8); 109.57 (д, C-6); 111.98 (д, C-4); 115.09 (с, C-4b); 122.16 (д, C-5); 128.81 (с, C-4a); 134.98 (с, C-9a); 136.68 (д, C-3); 140.77 (с, C-1); 142.84 (с, C-8a); 161.19 (с, C-7).

Масс-спектр m/z ($J_{отн.}$, %): 212 (100) [M]⁺, 211 (7.56), 198 (4.24), 197 (24.89), 182 (2.19), 170 (6.05), 169 (64.3), 168 (7.49), 149 (9.83), 141 (3.33), 140 (4.77), 128 (2.19), 115 (4.84), 101 (2.95), 85 (9.91), 83 (15.66), 75 (4.24), 74 (2.8), 63 (4.77), 50 (2.27), 48 (2.04), 46 (3.63), 43 (1.74), 41 (2.8).

Таким образом, оптимальным способом для выделения алкалоида гармина (1) является способ 8, включающий экстракцию 96% этиловым спиртом корней гармалы обыкновенной, предварительно подщелоченных 5%-ным раствором карбоната натрия, двукратной перколяцией и хроматографическую очистку суммы экстрактивных веществ с применением в качестве элюента смеси нефрас:этилацетат (1:1) (таблица 1, 2).

Таблица 1 – Сравнительная таблица основных показателей получения гармина (1)

| Показатели | Патент № 23473 | Предлагаемый способ | Эффективность |
|---|---|--|--|
| Экстракция | | | |
| Масса сырья корней гармалы обыкновенной | 81,3 кг | 76,9 кг | Снижен расход растительного сырья |
| Продолжительность экстракции | 65 рабочих дней | 33 рабочих дней | Увеличена производительность труда в 2 раза. |
| Выход суммы экстрактивных веществ | 9,41 % | 12,9 % | Увеличен выход суммы экстрактивных веществ |
| Хроматографическое разделение суммы экстрактивных веществ корней гармалы обыкновенной | | | |
| Выход гармина (в пересчете на воздушно-сухое сырье) | 1,23 % | 1,3 % | Увеличен на 0,7% |
| Расход растворителей | Этилацетат – 220,0 кг (стоимость 770000 тенге) | Нефрас – 123,2 кг Этилацетат – 138,6 кг (стоимость 583660 тенге) | Заменена часть дорогостоящего этилацетата на доступный нефрас. Сокращены затраты на 24,2%. |

Таблица 2 - Способы выделения гармина (1) из гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L).

| Автор способа | Способ извлечения | Преимущества | Недостатки |
|---|---|--|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| <p>Пат. № CN104628731 Shang Xiaofei, Pan Hu, Miao Xiaolou, Wang Dongsheng, Wang Xuezhi, Wang Yu, Zhang Jiyu</p> | <p>Семена гармалы обыкновенной экстрагируют 80% этиловым спиртом (гидромодуль 1:30) в течение 10 мин при температуре 80 °С (нагревание микроволнами, мощность излучения 600 Вт). Полученное извлечение упаривают и разделяют с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенно-фазовом сорбенте, в качестве элюента используют градиент смеси 0,1 М аммоний-ацетатный буфер:ацетонитрил от 70:30 до 96:4. УФ-детектирование при 280 нм. Получают гармин с выходом 1,44%.</p> | <p>Отсутствие токсичных растворителей. Возобновляемое сырье.</p> | <p>Высокая температура экстракции приводит к увеличению потери экстрагента - этанола При разделении методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. используется дорогостоящий элюент – ацетонитрил (стоимость 1 кг ацетонитрила составляет от 7100 до 10000 тенге). Низкий выход гармина (содержание гармина в семенах 3-4%).</p> |
| <p>Xiao Wang, Yanling Geng, Daijie Wang, Xingang Shi, Jianhua Liu</p> | <p>Семена гармалы обыкновенной трехкратно экстрагируют 95% этиловым спиртом (гидромодуль 1:10), экстракты объединяют и концентрируют под вакуумом. Остаток растворяют в 1% растворе соляной кислоты и подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 9,5. Выпавший осадок отфильтровывают и сушат. Разделение суммы алкалоидов осуществляют с применением жидкость-жидкостной хроматографии в системе растворителей трет-бутиловый эфир / ТГФ / вода (2:2:3 по объему), с добавлением триэтиламин (10 мМ) в стационарную фазу и соляной кислоты (5 мМ) в подвижную фазу. Скорость элюирования 1,5 мл/мин. Время разделения 9 ч. Получают гармин с выходом 1,19% в пересчете на воздушно-сухое сырье.</p> | <p>Отсутствие твердых сорбентов. Возобновляемое сырье.</p> | <p>Длительность процесса выделения и очистки гармина. Низкий выход гармина (содержание гармина в семенах 3-4%). Низкая производительность. Использование буферных растворов, что делает невозможным регенерацию растворителей, вследствие чего возрастает себестоимость целевого вещества</p> |

Продолжение таблицы 2

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|--|--|---|
| <p>Инновационный патент РК № 23473</p> | <p>Измельченные корни гармалы обыкновенной (<i>Peganum harmala</i> L.) пятикратно экстрагируют 96% этиловым спиртом. При этом получают сумму экстрактивных веществ с выходом 9,41 % (от веса воздушно-сухого сырья), хроматографическим разделением которой на колонке с окисью алюминия (II ст. активности), используя в качестве элюента этиловый спирт, выделяют гармин с выходом 1,23 % в расчете на воздушно-сухое сырье.</p> | <p>Отсутствие токсичных растворителей.</p> | <p>Длительность процесса экстрагирования методом мацерации, низкая производительность</p> |
| <p>Предлагаемый способ</p> | <p>Измельченные корни гармалы обыкновенной (степень измельчения 2-3 мм) смачивают, приготовленным 5%-ным раствором карбоната натрия в течение 1 часа. После трех часов фильтрат сливают, а влажные корни высушивают при комнатной температуре на стеллаже для высушивания сырья в сухом помещении с хорошей циркуляцией воздуха и при отсутствии прямых солнечных лучей.</p> <p>Воздушно-сухое сырье корней гармалы обыкновенной, после подщелачивания, загружают в корзину перколятора, заливают экстрагентом (соотношение сырье - экстрагент 1:10), нагревают до температуры 65,0 °С и экстрагируют в течение 3 часов при постоянном перемешивании и перколировании со скоростью 20 л/ч. Экстракт охлаждают, сливают и упаривают на ротационном испарителе под вакуумом. Экстракцию вышеприведенным способом проводят повторно. Получают сумму экстрактивных веществ с выходом 12,9% (в пересчете на воздушно-сухое сырье).</p> <p>Сумму экстрактивных веществ хроматографируют на колонке с окисью алюминия (III степени активности), соотношение сумма экстрактивных веществ - сорбент 1:20), используя в качестве элюента смесь нефрас:этилацетат (1:1). Фракции, содержащие гармин объединяют и упаривают. Технический гармин перекристаллизовывают из этилового спирта и сушат. Получают гармин с выходом в расчете на экстракт 11,14% (1,3 % в расчете на воздушно-сухое сырье).</p> | <p>Высокая скорость экстракции, низкие производственные издержки, доступные не токсичные растворители. Количественный выход гармина.</p> | |

Целевое вещество - 7- метокси-1- метил- 9Н- пиридо /3,4-*b*/ индол - 2N - гидрохлорид (2) получают следующим образом.

0.1 г (0.47 ммоль) гармина растворяют в 12 мл этанола и добавляют при перемешивании 10 мл (40.5 ммоль) концентрированной соляной кислоты. Реакция протекает при комнатной температуре. Контроль за ходом реакции ведут с помощью тонкослойной хроматографии в системе растворителей хлороформ - этиловый спирт в соотношении = 6:1. Проявитель - пары йода. Раствор охлаждают до комнатной температуры, и оставляют на ночь. Выпавший белый осадок отфильтровывают и высушивают. Получают кристаллическую водорастворимую соль - 7- метокси-1-метил-9Н-пиридо[3,4-*b*]индол-2N-гидрохлорид (2), с формулой $C_{13}H_{13}N_2OCl$. с т. пл. 272-275°C . Выход 99%.

Элементный анализ: найдено, %: С 62.53; Н 5.24; N 10.13; Вычислено, %: С 62.90; Н 5.81; N 10.29.

ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 3500 (^+NH), 3432 (NH), 2964, 2832 (OCH₃ фенильного фрагмента), 1636 (-C=N), 676 (Cl⁻), 637, 580 .

УФ-спектр (λ_{max} , нм): 248, 327.

Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, CD₃OD, δ , м.д., J/Гц): 2.92 (3H, с, CH₃ при C-1), 3.92 (3H, с, OCH₃ при C-7), 6.92 (1H, дд, J=8.0, 2.0, H-6), 7.00 (1H, д, J=2.0, H-8), 8.03 (1H, дд, J=8.0, 0.5, H-5), 8.13 (1H, д, J=6.37, H-3), 8.18 (1H, д, J=6.37, H-4).

Спектр ЯМР ¹³C (125,76 МГц, CD₃OD): 14.63 (к, CH₃ при C-1), 55.04 (к, OCH₃ при C-7), 93.62 (д, C-8), 113.01 (д, C-6), 113.58 (д, C-4), 113.68 (с, C-4a),

123.64 (д, С-5), 128.16 (с, С-4b), 132.96 (с, С-9a), 133.67 (д, С-3), 136,38 (с, С-1), 145.91 (с, С-8a), 163.69 (с, С-7).

Масс-спектр m/z ($J_{\text{отн.}}$, %): 214 (22.46 %), 213 (93.58%), 212 (100 %) $[M]^+$, 197 (52 %), 183 (11.86 %), 170 (64.45 %), 169 (70,68), 115 (8.45 %), 106 (10.39 %), 28 (67.22 %).

Антидепрессантную активность 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индола- *N*-гидрохлорида (2) изучали в условиях *in vivo* в тесте «Порсолт» (поведенческое отчаяние) [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-е издание, перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005 – 832 с.]

Стрессовое состояние вызывали у мышей форсированным плаванием. Животных помещали в цилиндр: диаметром - 10 см, высотой 25 см. Цилиндр наполняют на 1/3 водой (27 °С). После неудачных попыток выбраться из воды животные принимают характерную неподвижную позу, которую расценивают, как появление подавленности (отчаяние). Фиксируют все активные попытки животных выбраться из воды в течение первых 6 минут после погружения в воду. Поведенческими показателями являлись: продолжительность первого акта двигательной активности, время активного плавания, время иммобилизации. Исследуемые объекты в дозе 10 мг/кг, вводят внутрь в виде суспензии в 1% крахмальной слизи внутривентрикулярно за 1 час до исследования. Контрольные животные получают эквивалентное количество крахмальной слизи.

Препарат сравнения «Амитриптилин» в дозе 10 мг/кг, вводят внутрь в виде суспензии в 1% крахмальной слизи внутрижелудочно за 1 час до исследования.

Таблица 3 - Антидепрессантная активность 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорида (2)

| Наименование вещества, доза | | Продолжительность первого акта двигательной активности (сек.) | Время активного плавания (сек.) | Время иммобилизации (сек.) |
|---|----------|---|---------------------------------|----------------------------|
| Контроль | | 53,0±20,7 | 269,6±26,3 | 90,4±26,3 |
| Препарат сравнения «Амитриптилин» | 10 мг/кг | 64,4±24,9 | 328,2±14,1* | 31,8±14,1* |
| 7-метокси-1-метил-9 <i>H</i> -пиридо[3,4- <i>b</i>]индол | 10 мг/кг | 78,4±13,9 | 320,8±36,3* | 43,2±37,5 |

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями у контрольных животных

В результате исследования установлено, что в тесте по Порсолту 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорид (2) проявляет выраженный антидепрессантный эффект (таблица 3). Антипаркинсоническую активность 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорид (2) изучают в моделях галоперидоловой каталепсии и МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей проведено сравнительно с леводопой – эталонным противопаркинсоническим препаратом и плацебо-контролем. В модели галоперидоловой каталепсии соединение (2) в дозе 2,5 мг/кг показывает эффективность сопоставимую с леводопой в дозе 50 мг/кг и трехкратное снижение уровня каталепсии в тестах Stride Length Test, «Вертикальный стержень» и «Вращающийся стержень». В модели МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома оценка ригидности по изменению длины шага

7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорид (2) в дозе 2,5 мг/кг и леводопы 50 мг/кг вещество (2) показывает результаты, сопоставимые с интактной группой и превосходящие группу контроля без терапии. Оценка олигокинезии в тесте открытого поля в группах, получавших 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорид (2) и леводопу показывает сопоставимые результаты. Моторный дефицит в тесте «Вертикальный стержень» в ранние сроки регрессирует в группе, получавшей вещество (2) в дозе 5 мг/кг и сопоставим с группой, получавшей леводопу в дозе 100 мг/кг. Оценка координации движений в тесте «Вращающийся стержень» в группах, получавшей вещество (2) и леводопы показала результат превосходящий группу контроля в 2,1 раза при предварительном введении вещества (2) в дозе 5 мг/кг и леводопы 50 мг/кг, сопоставимые между собой. По результатам проведенных экспериментов подтвержден противопаркинсонический эффект гармина гидрохлорида, сопоставимый с леводопой по результатам оценки выраженности ригидности, олигокинезии, моторных и координаторных нарушений.

Сравнительный анализ данных, полученных в эксперименте на мышцах C57Bl/6 в трех дозах (2.5, 5.0 и 10.0 мг/кг), находящихся в пределах от 0,1-0,001 мг/кг ЛД50 по эффектам острого и субхронического системного введения вещества (2), позволил подтвердить, что у 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорида (2) присутствует психотропное воздействие активирующего типа.

Изучен механизм действия 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорида (1) с применением молекулярного докинга на биологических мишенях: серотониновый рецептор 5-НТ_{2C}, дофаминовый рецептор D₂ и моноаминооксидазы А и В.

Молекулярный докинг проводили с использованием графического интерфейса Maestro пакета программ Schrödinger Suite (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017). Режим докинга SP (standart precision). В качестве итоговых результатов используют значение оценочной функции GScore, показывающее энергию и силу связывания лиганда с молекулой-мишенью.

Результаты проведенного молекулярного докинга 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорида показывают лучшие значения энергии связывания с моноаминооксидазами А и В (-7,503 и -7,145 ккал/моль, соответственно).

Относительно прочную связь 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорид показал с серотониновым рецептором 5-НТ_{2C} и дофаминовым рецептором D₂ (-6,199 и -5,366 ккал/моль, соответственно).

Таблица 4 – Значения энергии связывания 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорида с серотониновым рецептором 5-НТ_{2C}, дофаминовым рецептором D₂ и с моноаминооксидазами А и В

| Соединение | Серотониновый рецептор 5-НТ _{2C} | Дофаминовый рецептор D ₂ | Моноаминооксидаза А (МАО-А) | Моноаминооксидаза В (МАО-В) |
|---|---|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 7-метокси-1-метил-9 <i>H</i> -пиридо[3,4- <i>b</i>]индол-2 <i>N</i> -гидрохлорид | -6,199 | -5,366 | -7,503 | -7,145 |

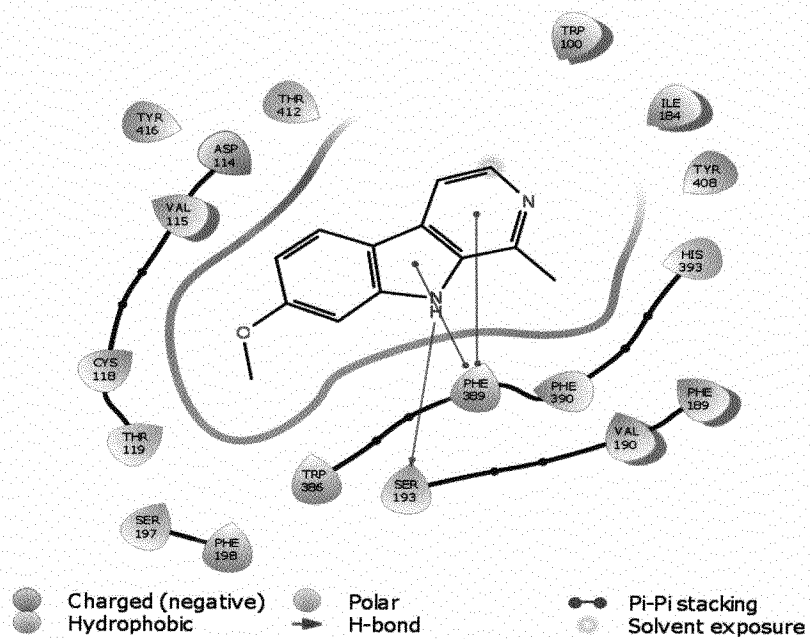


Рис. 1. Взаимодействие дофаминового рецептора D₂ (DRD2) с 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлоридом

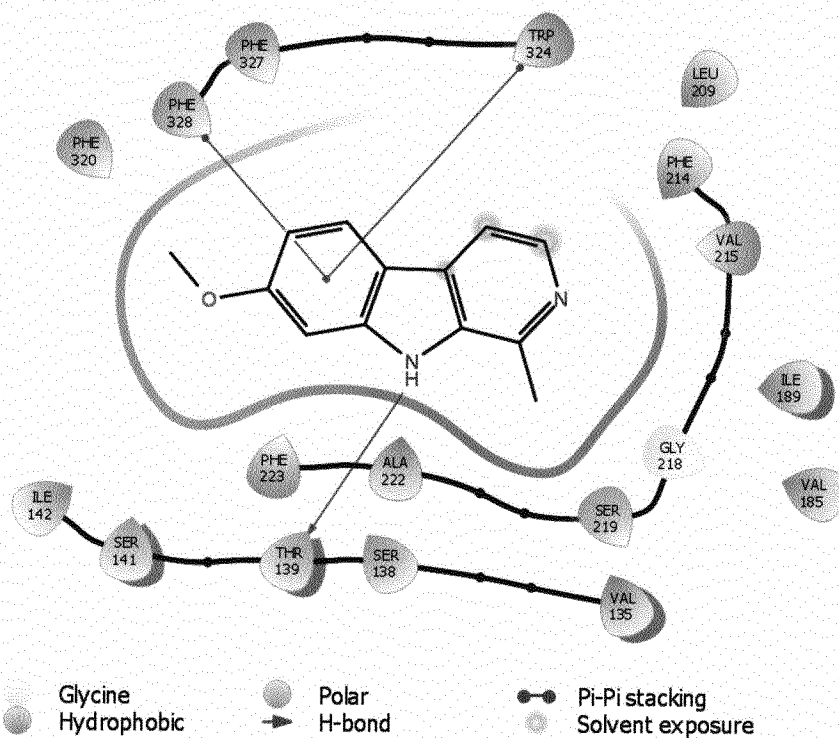


Рис. 2. Взаимодействие серотонинового рецептора 5-НТ_{2C} с 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлоридом

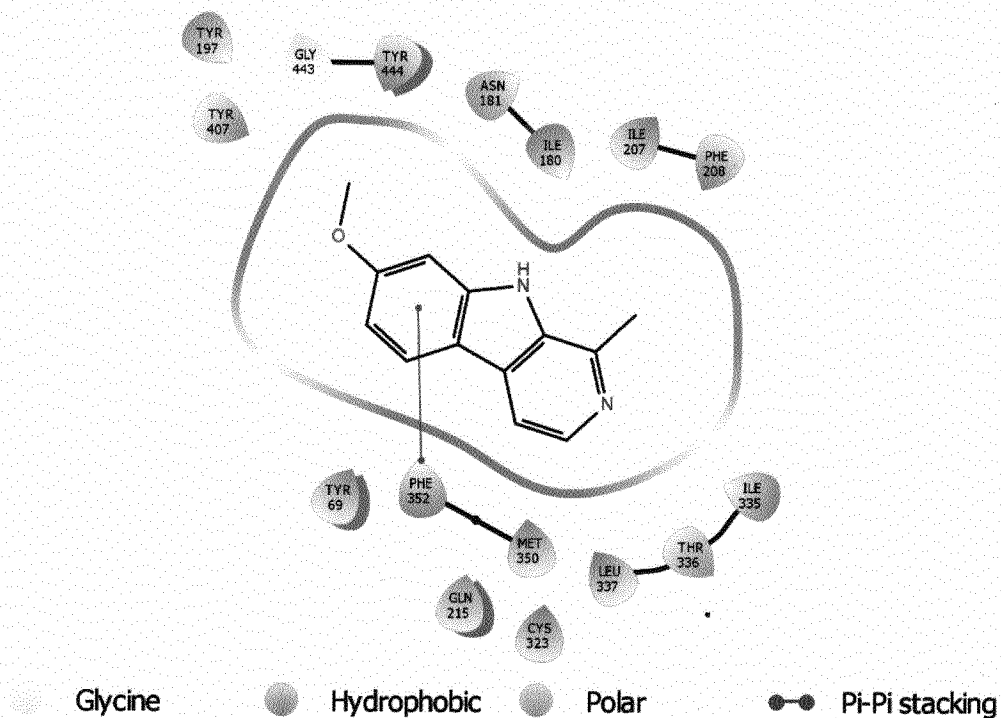


Рис. 3. Взаимодействие моноаминоксидазы А (МАО-А) с 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлоридом

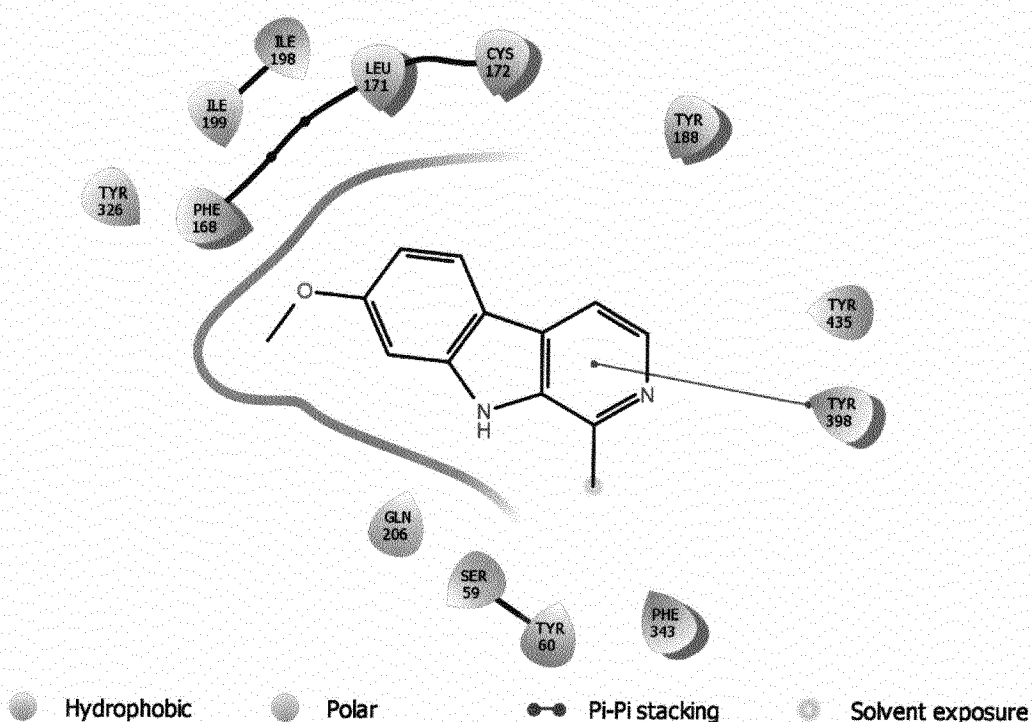


Рис. 4. Взаимодействие моноаминоксидазы В (МАО-В) с 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлоридом

Результаты молекулярного докинга свидетельствуют о наличии прочных связей у 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорида (1) с моноаминооксидазами А и В (-7,510, -7,395 ккал/моль, соответственно), что свидетельствует о реализации механизма антидепрессантного действия алкалоида гармина (1) на уровне синоптической нейротрансмиссии. Данные молекулярного докинга 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорида достоверно согласуются с результатами экспериментов в условиях *in vivo* с использованием теста «Порсолт» (поведенческое отчаяние) (таблица 3).

Установлено, что в тесте по Порсолту 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорид проявляет выраженный антидепрессантный эффект. Так, под действием 7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол-2*N*-гидрохлорида в дозе 10 мг/кг наблюдается достоверное увеличение продолжительности активного плавания в 1,2 раза, а также отмечается сокращение времени иммобилизации в 2,1 раза, по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, предлагаемый способ получения нейротропного, антидепрессантного средства, имеет следующие преимущества:

1. низкая температура экстракции, позволяющая в щадящем режиме извлекать из сырья гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.) целевое вещество - гармин (1);

2. простота технологии выделения, не требующая применения дорогостоящего оборудования, как высокоэффективный жидкостной хроматограф с использованием дорогих растворителей (ацетонитрил);

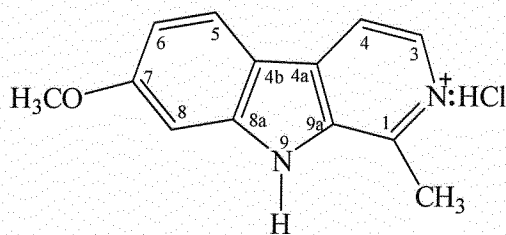
3. применение доступных, нетоксичных органических растворителей (этиловый спирт, нефрас, этилацетат);

4. применение менее затратной технологии разделения суммы экстрактивных веществ гармалы обыкновенной;

5. применение 7-метокси-1-метил-9Н-пиридо[3,4-*b*]индол-2N-гидрохлорида (2) в качестве антидепрессантного средства, превосходящего препарат сравнения «Амитриптилин» в 2,1 раза.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения нового нейротропного, антидепрессантного средства на основе алкалоида гармина (7-метокси-1-метил-9*H*-пиридо[3,4-*b*]индол), включающий подщелачивание корней гармалы обыкновенной 5%-ным раствором карбоната натрия в течение 1 часа, экстракцию 96% этиловым спиртом, хроматографическую очистку суммы экстрактивных веществ на колонке с окисью алюминия, отличающимся тем, что экстракция растительного сырья проводится методом перколяции дважды при следующих условиях: сырье:экстрагент = 1:10, температура 65,0 °С, продолжительность 3 часа, перемешивание со скоростью 60 об/мин, перколирование со скоростью 20 л/ч, при хроматографической очистке используется смесь нефрас:этилацетат (1:1); перекристаллизацией гармина из 96% этилового спирта и при последующем взаимодействии гармина с соляной кислотой в этаноле получают целевое вещество 7-метокси-1-метил-9*H*- пиридо [3,4-*b*] индол- 2*N*- гидрохлорид (2)



(2)

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202293300**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:****A61K 31/437 (2006.01)****A61K 36/77 (2006.01)****A61P 25/24 (2006.01)****A61P 25/00 (2006.01)**

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 31/00, A61K 31/437, A61K 36/00, A61K 36/77, A61P 25/00, A61P 25/24Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Espacenet, Embase, elibrary.ru, Google**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей | Относится к пункту № |
|------------|---|----------------------|
| Y | С.М. АДЕКЕНОВ и др. Оптимизация технологии экстракции корней <i>Peganum Harmala L.</i> ХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, №3, 2020, С. 279–284 Стр.280-282 | 1 |
| Y | С.М. АДЕКЕНОВ и др. Флавоноиды почек тополя бальзамического <i>Populus Balsamifera L.</i> и способы их выделения. ХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, №2, 2020, С. 181–188. Стр.186 | 1 |
| Y | KZ 2646 U 2018-02-26 Стр.2 Пример | 1 |
| Y, D | KZ 23473 A4 2010-12-15 Стр.2, Пример 1 | 1 |
| A | EA 201400601 A1 2015-12-30 | 1 |
| A | CN 102600215 A-2012-07-25 | 1 |

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **28/03/2023**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины



 А.В. Чебан