



URAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

215008

(11)

(B2)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 35/78

(22) Přihlášeno 06 07 79

(21) (PV 4777-79)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 07 07 78
(471572) Španělsko

(40) Zveřejněno 28 11 83

(45) Vydáno 15 10 84

(72)

Autor vynálezu

SALGADO FRANCISCO RAMÓN ALVARADO, RIVERA BLANCA ZOILA
NEY, TEGUCIGALPA (Honduras)

(73)

Majitel patentu

CONRAD LIMITED, NASSAU (Bahamy)

(54) Způsob získávání přirozené polární frakce s antipsoriatickou aktivitou

1

Vynález se týká způsobu získávání přirozené polární frakce s antipsoriatickou aktivitou extrakcí z listů a oddenků různých kapradin.

Navzdory vědeckému-terapeutickému pokroku, neexistuje lék schopný zlepšit stav, tím méně vyléčit pacienta trpícího psoriázou, a dermatologickými problémy způsobenými parapsoriázou.

Tyto nemoci jsou známy velmi dávno a bylo provedeno mnoho pokusů, jak je léčit, avšak pouze s nepatrnými výsledky, přičemž velkou překážkou je, že ve většině případů se používají látky nebo léky, jež mohou být pro pacienta v krátké době fatální.

Nyní se opět používá dřívějšího způsobu ošetřování, neboť tyto způsoby jsou neškodné a pacientům přinášejí určitou symptomatologickou úlevu, i když nikdy vyléčení nebo významné zlepšení.

Problém se zhoršuje, vzhledem k neustále se zvyšujícímu počtu psoriatických pacientů. Je možné, že jde o genetický přenos, přičemž k projevu u potomků dochází zjevně nebo skrytě, anebo zůstává latentní a objeví se, působí-li patologické faktory, které vyvolávají objevení nemoci.

Bývá zasažen celý povrch těla a jednou z hlavních oblastí je lebka, na které se vy-

2

tvářejí „lupy“, kterým pacient většinou nevěnuje pozornost, až pokud i po několika letech neustoupí, přestože byla používána lokální léčba a nemoc se zhoršila. Přítomnost „lupů“, jestliže psoriáza zasáhla jiné části kůže, je pozorována v 90 % případů. Nemoc zasahuje kteroukoliv část povrchu těla bez ohledu na věk. Proto mohou být postiženi novorozenci stejně jako šedesáti- nebo sedmdesátiletí lidé.

Zeměpisný rozsah je neomezený bez ohledu na rasy, ačkoliv výskyt u černé rasy je o něco nižší.

Nejčastější komplikací nemoci je arthropathie, ale mohou být také postiženy jemné tkáně jako jaterní a ledvinná tkáň.

Psoriáza a parapsoriáza jsou patologické léze jež se snadno rozpoznají, i když je nutná anatomicko-patologická diagnóza.

Touto nemocí trpí minimálně 1 % světové populace. Doposud nebyl nalezen účinný lék proti psoriáze.

Bylo zjištěno, že přirozená polární frakce, izolovaná z oddenků a listů *Dryopteris crassirhizoma*, *Polypodium vulgare*, Linn, *Polypodium leucotomos*, *Phlebodium decumanum*, *Cyathea taiwaniana* a z oddenků *Polypodium aureum* Linn a *Polypodium triseriale*, mají léčivé vlastnosti při léčbě psoriatických a parapsoriatických pacientů obou

pohlaví, kteréhokoliv věku. To se týká i jejich derivátů: esterů, amidů atd. Více než 300 pacientů trpících psoriázou bylo léčeno orálně malým množstvím, například 5 mg denně na kg tělesné váhy. Výsledkem bylo, že 80 % pacientů, léčených asi 3 měsíce bylo úplně vyléčeno. Byl prováděn dvojí slepý pokus na skupině 50 pacientů a ukázalo se, že lék je účinný ve srovnání s kontrolní skupinou, za použití stejné organoleptické velikosti, tvaru a vlastností. Tyto frakce a jejich deriváty byly použity při všech formách psoriázy a při různých stupních patologické léze.

Z toxikologického hlediska nebyl nalezen žádný účinek. Během 12 let výzkumu nebyly prokázány žádné změny při hematologických testech, v kostní dřeni ani ve funkci ledvin a jater ani při analýze moče. Postupem navrženým FDA Spojených států amerických a podle „Guidelines for reproduction studies for safety evaluation of drugs for human use“ bylo zjištěno, že tyto sloučeniny nemění plodnost krys a myši ani jiných savců, např. psů; a také nebyl u čtyř generací krys a myši a u dvou generací psů zjištěn teratogenní účinek.

Nebyla též zjištěna karcinogenní aktivita. Tyto studie byly prováděny u myši tak, že jim byla denně podávána orálně dávka 1 mg/kg váhy po 24 týdnů. Zvířata byla zabita o 7 týdnů později s a bez zavedení skleněných částic do močového měchýře. Metody používané při těchto studiích jsou popsány v Jull, J. W. Brit. J. Cancer, 5, 328 (1951) a statistické vyhodnocení je popsáno v Arcos a coll., Chemical Induction of Cancer, Pag. Academic Press Inc., New York (1963).

Polární frakce působí:

- zvýšení permeability buněčné membrány pro cukry, jako je glukóza, sacharóza, fruktóza, a aminokyseliny jako je valin, lyzin a jiné v menším množství.
- zvýšení pohybové kapacity nosičů buněčné membrány.
- zvýšení výměny vody na membráně.
- tyto účinky mají možná vztah k účinkům výše jmenovaným, bylo pozorováno zvýšení aktivity hepatocytů u nichž je vyvolán velký metabolický účinek.
- zvýšení aktivity růstu a dozrávání kolagenu.

Přípravek nemá steroidní aktivitu. Pokud se týká jeho účinku na jiné orgány a systémy, má bradykardiatický účinek podobný jako digitalis, který je možná způsoben působením na membrány buněk myokardu.

Způsob podle vynálezu dovoluje extrakci této polární frakce z výše zmíněných částí rostlin s průmyslovými výtěžky a v množství použitelném pro přípravu farmaceutic-

kých přípravků. K získání nejvyššího výtěžku je třeba provádět sběr listů, když se již vyvinuly výtrusnice.

Způsob podle vynálezu zahrnuje tyto kroky:

Sušení

Oddenky jsou například nařezány na pouzky 2–3 cm, listy jsou sušeny bezprostředně po sběru. Sušení se provádí tak, že se nepřetržitě vkládá materiál do běžné sušičky skládající se například z rotující kovové drátěné tkaniny o šíři asi 5 cm a délce 25 m, jež se pohybuje v horkém prostředí o teplotě nejvýše 70 °C. Rychlost rotující kovové drátěné tkaniny je upravena tak, aby mohlo být usušeno asi 500 kg vlhkého materiálu za hodinu.

Granulování

Suchý materiál o zbytkové vlhkosti nižší než 8 % se granuluje v diskovém mlýně, tak, aby vzniklé částice měly velikost 2 mm.

Extrakce—odpaření

Může být prováděno kterýmkoliv rozpouštědlem o dielektrické konstantě 1,890 až 9,08. Výhodně metanolem v objemovém poměru 1 : 4.

Po odpaření zůstane zbytek, který odpovídá 1/5 původního objemu.

Purifikace

1. Polopevný zbytek po extrakci — odpaření se rozdělí v systému nemísitelných rozpouštědel, N-hexan/voda (10 : 4) a ponechá se stát v separátorech přes noc, načež se oddělí lipidy a pryskyřice v hexanové fázi.

2. Rozdělený a zfiltrovaný vodný roztok se nechá projít jontoměničovou kolonou.

3. Proveďte se neutralizace $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

4. K výše zmíněnému roztoku se přidá po částech aktivní uhlí, až do vyčerpání roztoku.

5. Tento roztok se odpaří na 1/10 původního objemu a vysráží se vodou mísitelným anhydridem organické kapaliny, například absolutním alkoholem.

6. Precipitát se zfiltruje odsátím, čímž se získá první práškovitá hmota a po odpaření matečného louhu se získá druhá práškovitá hmota.

Tento prášek se usuší ve vakuu až do úplného zbělení.

Druhá bílá krystalická hmota, vlastní předmět tohoto vynálezu, není definovanou chemickou látkou, ale kompozicí závislou na druhu použité látky a na postupech extrakce a purifikace.

Výsledky kvalitativních testů udávají pří-

tomnost celkem 70 % D-glukózy a D-fruktózy, což je také výsledkem izolace a celkové charakterizace odpovídajících acetylovaných derivátů. Na druhé straně přítomnost kyselých sloučenin, které nemohou být snadno odděleny od cukrů se testuje chromatografií a obvyklými spektroskopickými metodami.

Farmaceutické kompozice podle tohoto vynálezu se připraví v obvyklé dávkové formě začleněním polární frakce do farmaceutického nosiče, podle přijatých farmaceutických postupů. Výsledné farmaceutické kompozice tvoří předmět tohoto vynálezu. Aktivní složka tj. polární frakce bude přítomna v kompozicích podle vynálezu v množství schopném vyvolat antipsoriázovou aktivitu.

Kompozice podle vynálezu obsahují výhodně od asi 10 do asi 100 mg na dávkovou jednotku aktivní složky. Farmaceutický nosič může být například pevný nebo kapalný. Příklady pevných nosičů jsou laktóza, magnezium stearan, alba terra, sacharóza, talek, kyselina stearová, želatina, agar, pektin, arabská guma, aerosil apod.

Příkladem kapalných nosičů jsou alkoholy, jako etanol nebo propylenglykol, voda obsahující solubilizační činidlo jako je polyetylénglykol, podzemnicový olej, olivový olej apod. Nosič nebo ředidlo mohou obsahovat retardační činidlo jako glycerylmonostearan nebo glyceryldistearan, samostatně nebo spolu s voskem.

Může být použito mnoha různých farmaceutických forem. Použije-li se pevného nosiče, přípravek může mít tvar tablet, může být zaveden do tvrdých želatinových kapslí ve formě prášku nebo granulí, nebo může mít formu trochisku.

Množství pevného nosiče se může pohybovat ve velkém rozmezí ale výhodně činí od asi 25 mg do asi 300 mg. Použije-li se kapalného nosiče, přípravek může mít formu sirupu, emulze, měkké želatinové kapsle, suspenze nebo kapalného roztoku, nebo být ve sterilní injikovatelné formě pro parenterální použití například v ampulích.

Farmaceutické kompozice podle tohoto vynálezu v kapalných suspenzích nebo roztocích, nezahrnují jednoduché kapalně suspenze nebo roztoky aktivní složky v rozpouštědle obecně nevhodném pro vnitřní podávání, aby mohla být vyvolána žádaná farmakologická aktivita.

Jiným předmětem vynálezu je rozdělení dávkové jednotky ve formě tablet, kapslí, trochisků, kapalných suspenzí nebo sterilní injekční kapaliny pro vnitřní podávání, které vyvolají antipsoriatickou aktivitu, složených z farmaceutického nosiče a polární frakce v množství dostatečném k vyvolání této aktivity.

Způsob podávání může být orální nebo parenterální, výhodně orální. Aktivní složka bude s výhodou podávána v denní dávce

asi 50 mg až 900 mg, zejména 100 až 300 mg. Je výhodné podávat ekvivalentní dávky 1 až 4krát denně. Při tomto způsobu podávání, se vyvolá antipsoriatická aktivita.

Protože sporiáza je chronické onemocnění genetické etiopathogeneze, je výhodné používat formy tablet nebo kapslí, aby se udržela stálá koncentrace látky v krvi, jež dovoluje trvalé působení léku. Nepochybně při léčení vážných vypuknutí psoriázy, způsobených jinými léky, jako třeba steroidy, nebo spontánní vypuknutí nemoci samotné, je možné použít intravenózní injekce nebo kontinuálního přikapávání do séra, aby se tím zabránilo krizi.

Ze zřejmých důvodů se u dětí používá léku ve formě kapek nebo emulzí a u dospělých s potížemi horní zažívací trubice je možné použití čípků.

Farmaceutické kompozice se připravují obvyklými způsoby jako je míchání, granulace a stlačování, je-li třeba, nebo mícháním a rozpouštěním vhodných složek pro žádané kompozice.

Následující příklady osvětlují vynález:

Příklad 1

12 kg listů, granulovaných na sítu s otvory 2,5 mm bylo extrahováno jeden a půl hodiny 48 litry 95 % etanolu při 70 °C.

Zbytek byl smíšen se směsí n-hexan/voda, 15 : 10 l, a byl ponechán stát přes noc v separátoru. Hexanová fáze byla pak oddělena a vodná fáze byla zfiltrována.

Filtrát byl po průchodu přes kolonu s iontoměničem neutralizován alkálií.

Takto neutralizovaný roztok byl pročištěn a odpařován téměř do sucha za mírného vakua po 48 hodin. Výtěžek činil asi 150 gramů.

Suchá pevná látka byla opět rozpuštěna v metanolu a ponechána krystalovat přes noc při 40 °C.

Příklad 2

36 kg suchých rostlin, granulovaných v diskovém mlýnu o velikosti otvorů 2,5 mm bylo extrahováno po 16 hodin n-hexanem při teplotě místnosti. Hexanový roztok byl zakonzentrován a ponechán stát ve vodě v separátoru přes noc. Hexanová fáze byla oddělena a vodná fáze byla odpařena.

Ke zbytku hexanem extrahovaných rostlin bylo přidáno dostatečné množství horkého etanolu, a tato směs byla ponechána přes noc, aby vznikl nasycený extrakt. Roztok byl zfiltrován, přidán k vodné fázi a chromatografován na iontoměničové koloně.

Roztok byl pak neutralizován a pročištěn a odpařen téměř do sucha.

Pevná látka byla opět rozpuštěna v 70% etanolu a krystalována při teplotě místnosti, přes noc. Krystaly byly odděleny a su-

pernatant byl odpařen a usušen ve vakuu. Výtěžek činil 180 g.

Příklad 3

12 kg suchých oddenků, granulovaných v diskovém mlýnu o velikosti otvorů 2,5 mm bylo kontinuálně extrahováno chloroformem při teplotě místnosti.

Extrakt byl zkoncentrován a opět rozpuštěn ve směsi n-hexan/voda.

Hexanová fáze byla oddělena a vodná fáze byla odpařena.

Zbytek extrahovaných oddenků byl přidán k horkému metanolu a ponechán stát 16 hodin. Pak byl zfiltrován a filtrát byl chromatografován na iontoměničové koloně.

Extrakt byl neutralizován a pročištěn a odpařen a byl vložen do krystalizátoru v 95% etanolu, přes noc. Krystaly byly odděleny a supernatant byl odpařen a pak usušen ve vakuu. Výtěžek činil 84 g.

Příklad 4

Refluxováním 1 1/2 hodiny 12 kg granulovaných sušených rostlin o velikosti částic 2,5 mm, bylo extrahováno 90% metanolem při 70 °C.

Extrakt byl zfiltrován, odpařen, a přidán ke směsi hexan/voda 3 : 2, ponechán stát a hexan byl pak oddělen, a vodná fáze byla zfiltrována a odpařena.

Zbytek byl rozpuštěn v 90% horkém etanolu a chromatografován na iontoměničové koloně.

Extrakt byl neutralizován a odpařen na 1/10 původního objemu a ponechán v chladu krystalovat.

Pak byl zfiltrován, krystaly byly odděleny a supernatant byl usušen ve vakuu. Výtěžek činil 240–250 g.

Dále uvedené farmaceutické přípravky ověřují avšak neomezují tento vynález:

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob získávání přirozené polární frakce a antipsoriatickou aktivitou, extrakcí z oddenků a listů různých druhů osladičů **Dryopteris crassirhizoma**, **Polypodium vulgare** Linn., **Polypodium leucotomos**, **Phlebodium decumanum** J. Smith, **Polypodium decumanum**, **Cyathea taiwaniana** a oddenků **Polypodium aureum** Linn., a **Polypodium triseriale** vyznačený tím, že se oddenky nastříhají na 2–3 cm proužky a proužky oddenků a listy se usuší v kontinuální sušičce při teplotě nejvýše 70 °C; pak se suchý materiál o zbytkové vlhkosti nižší než 8 % granuluje na částice až do 2 mm v průměru a hustotě asi 0,1 až 0,8; extrakce probíhá v rozpouštědle o dialektické konstantě 1,890 až 9,08, rozpouštědlo se odpaří a zbytek se vyčistí; polopevný zbytek po extrakci se při-

Příklad 1

Složky	množství
Polární frakce	40 mg
Laktóza	60 mg

Složky se smíchají, prosijí a vloží do tvrdých želatinových kapslí. Kapsle takto připravené se podávají třikrát denně.

Příklad 2

Složky	množství
Polární frakce	60 mg
Škrob	60 mg
Talek	5 mg
Kaolin	5 mg
Polyvinylpyrolidon	5 mg

Frakce a škrob se smíchají a granulují s roztokem 10% želatiny včetně polyvinylpyrolidonu. Granule se prosijí, usuší a pak smíchají s kaolinem a talkem. Poté se prosijí a vytvoří se z nich tablety.

Chromatografie na iontoměničové koloně se provádí tak, že se zfiltrovaný roztok, produkt po extrakci rostliny, 12 kg suché váhy, nanese na skleněnou kolonu o průměru 20 cm, obsahující 500 g pryskyřice. Pryskyřice je porézní polystyren, tj. kopolymery styrenu a di-vinylbenzenu, takového smíšeného typu, že vyměňuje silně kyselé kationty a silně bazické anionty. Částice mají průměr 20 až 50 mm. Průtoková rychlost je 30 kapek za sekundu. Pak se eluát neutralizuje přidáním hydroxidu vápenatého.

V příkladech 1 až 4 byl eluát neutralizován přidáváním hydroxidu vápenatého, což umožňuje nejúčinnější odstranění pigmentů z roztoku, neboť převedené na soli jsou lépe absorbovány aktivním uhlím.

dá ke směsi n-hexan/voda 10 : 4, ponechá se stát přes noc v separátoru, vodná fáze se oddělí a vodný roztok se nechá projít kolonou o průměru 20 cm obsahující 500 g porézní polystyrenové pryskyřice, kopolymery styrenu a di-vinylbenzenu, jež vyměňuje silně kyselé kationty i silně bazické anionty, rychlostí 30 kapek za vteřinu, zneutralizuje se přidáním hydroxidu vápenatého $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a po částech se k němu přidává aktivní uhlí až do vyčištění roztoku a pak se odpaří na 1/10 původního objemu a precipituje se absolutním alkoholem, precipitát se zfiltruje odsátím a matečný louh se odpaří, čímž se získá druhá práškovitá hmota, která se suší ve vakuu, až se získá velmi bílá pevná látka.