



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

89330

C (40) Patentti myönnetty
Patent meddelat 27 09 1993

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 35/78, C 07D 493/04

(21) Patentihakemus - Patentansökning	863482
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	27.08.86
(24) Alkupäivä - Löpdag	20.12.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	27.08.86
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.06.93
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/SE85/00541
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
28.12.84 SE 8406660 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Conpharm AB, Älvgatan 49, 652 30 Karlstad, Sverige, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Rosen, Börje, P.O. Box 3055, 650 03 Karlstad, Sverige, (SE)
2. Leander, Kurt, Rue du Mole 6, 2001 Neuchatel, Switzerland, (CH)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

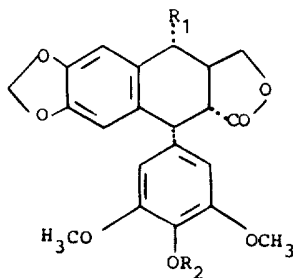
Menetelmä podofyllotoksiinin ja sen johdannaisten valmistamiseksi
Förfarande för framställning av podofyllotoxin och derivat därav

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Arzneimittelforschung, vol. 11, p. 327-328 (1961)

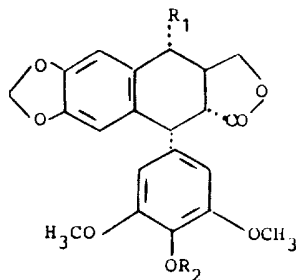
(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee yhdisteitä, jotka koostuvat podofyllotoksiinista ja sen johdannaisista, joilla on kaava



jossa R₁ on H tai OH ja R₂ on H tai CH₃, tiettyjen sairauksien hoitoon ja menetelmää niiden valmistamiseksi. Keksintö koskee lisäksi yhdisteiden käyttöä mainittujen sairauksien hoitoon, samoin kuin mainittujen yhdisteiden käyttöä mainittujen sairauksien hoitoon tarkoitettujen farmakologisten koostumusten valmistamiseen.

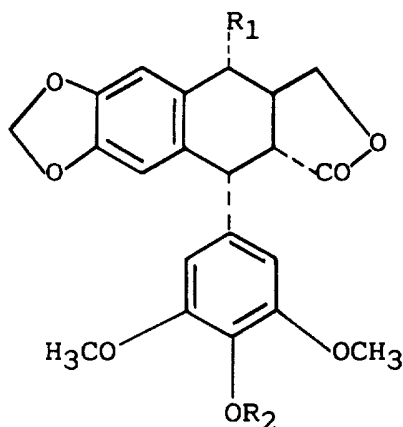
Uppfinningen avser föreningar, bestående av podofyllotoxin och dess derivat med formeln



vari R₁ är H eller OH och R₂ är H eller CH₃, till behandling av vissa sjukdomstillstånd samt ett förfarande för framställning av dessa, ävensom användning av nämnda föreningar till framställning av farmakologiska beredningar för behandling av nämnda sjukdomstillstånd.

Menetelmä podofyllotoksiinin ja sen johdannaisten valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää farmaseuttisesti aktiivisten yhdisteiden valmistamiseksi. Nämä yhdisteet muodostuvat podofyllotoksiinista ja sen johdannaisista, joilla on kaava



jossa R_1 on H tai OH ja R_2 on H tai CH_3 .

Podofyllotoksiinilla ja sen johdannaisilla on todettu olevan useita erinomaisia farmakologisia vaikutuksia. Niinpä ne vähentävät lymfaattisten T-solujen ("tappajasolujen") aktiivisuutta, joten niitä voidaan käyttää vähentämään immuuni- ja hylkimisreaktioita elinten siirrossa. Lisäksi ne inhiboivat solujen jakautumista metafaasissa, joten niitä voidaan käyttää psoriasis-sairauksien hoitoon. Yhdisteillä on myös biosidinen ja biostaattinen vaikutus sellaisia mikro-organismeja kuin plasmodiaa, sieniä ja viruksia vastaan, ja niitä voidaan tästä syystä käyttää parasiittisairauksien, kuten malarian ja virustautien hoidossa. Yhdisteet vaikuttavat lisäksi madonpoistoaineina.

Yhdiste podofyllotoksiini on ennestään tunnettu ja se on uutettu kasveista, jotka pääasiassa ovat Podophyllum-sukua. Yhdistettä ei kuitenkaan ole aikaisemmin käytetty keksinnön mukaisessa erittäin puhtaassa muodossa, joka on mahdollista-

nut sen käytön uusilla indikaatioaloilla. Aikaisemmin on useimmiten käytetty Podophyllum-lajeista saatua epäpuhdasta uutetta, nk. "podofylliiniä", joka on sisältänyt vain 20-40 % podofyllotoksiinia. Lisäksi uutteen sisältävät koko joukon muita komponentteja, kuten desoksidopodofyllotoksiinia, dehydropodofyllotoksiinia, α - ja β -peltatiinia jne., riippuen siitä, mistä lajista uute on saatu. Useiden näistä muista komponenteista on todettu olevan huomattavan mutageenisia.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle puhtaan podofyllotoksiinin ja sen johdannaisten valmistamiseksi on tunnusomaista, että Podophyllum-lajien kasvinosia uutetaan etyyliasetaatilla ja uute väkevöitetään ja suodatetaan piigeelin läpi, minkä jälkeen se kromatografoidaan happamalla alumiinioksidilla ja pääjäte kromatografoidaan piigeelillä, ja haluttu tuote ki-
teytetään tämän jälkeen uudelleen.

Yhdisteellä podofyllotoksiini on puhtaana seuraavat fysikaaliset ominaisuudet:

Sulamispiste: 183-184°C (yhdiste vapaa liuottimesta)

Optinen kierto: $[\alpha]_D^{20}$: - 132,5 (C 0,2 CHCl₃)

Liukoisuus veteen: 120 mg/l.

Podofyllotoksiinia ja sen johdannaisia voidaan uuttaa kasvien osista, etenkin juurista tai juurakoista, Podophyllum-suvun eri lajeista, kuten P. emodi Wall'ista ja P. peltatum L:sta. Yhdiste esiintyy myös muissa kasvilajeissa, esimerkiksi Juniperus-suvussa, kuten J. virginiana L:ssa.

Valmistettaessa keksinnön mukaan erittäin puhdasta podofyllotoksiinia tai sen johdannaisia uutetaan esimerkiksi Podophyllum emodin tai Podophyllum peltatumin kuivattuja ja hienoksi jauhettuja juurakkoja etyyliasetaatilla ja uute väkevöitetään ja suodatetaan piigeelin läpi. Podofyllotoksiinin ja sen johdannaisten haluttu fraktio kromatografoidaan tämän jälkeen happamalla alumiinioksidilla, jol-

loin saadaan fraktio, joka sisältää pääasiassa viittä lignaania desoksipodofyllotoksiinia, podofyllotoksonia, isopikropodofylliiniä, podofyllotoksiinia ja 4'-demetyylipodofyllotoksiinia. Podofyllotoksiini tai muu haluttu johdannainen eristetään tästä seoksesta huolellisella kromatografialla piigeelillä, minkä jälkeen haluttu fraktio kiteytetään uudelleen.

Keksinnön mukaisesti valmistetulla erittäin puhtaalla podofyllotoksiinilla ja sen johdannaisilla on todettu olevan useita erinomaisia farmakologisia vaikutuksia ja niitä voidaan käyttää useiden sairauksien hoitoon. Voidaan muodostaa farmakologisia koostumuksia, jotka sisältävät podofyllotoksiinia ja/tai sen johdannaisia yhdessä yhden tai useamman farmakologisesti hyväksyttävän kantaja-aineen kanssa.

Kantaja-aineina voidaan käyttää kaikkia niitä aineita, joiden tiedetään olevan käyttökelpoisia farmakologisissa koostumuksissa, edellyttäen, että ne eivät reagoi epäedullisesti aktiivisen yhdisteen kanssa eivätkä aiheuta jotakin haitallista vaikutusta yhdessä sen kanssa. Farmakologisia koostumuksia voidaan valmistaa enteraalista, parenteraalista tai iholle antamista varten ja ne voivat esimerkiksi olla kiinteinä koostumuksina, kuten tabletteina, jauheina, kapseleina, peräpuikkoina tai emätinpuikkoina, enemmän tai vähemmän puolinestemäisinä koostumuksina, kuten voiteina, geeleinä tai salvoina, tai nestemäisinä koostumuksina, kuten liuoksina, suspensioina tai emulsioina. Ne voivat myös sisältää lisäksi tavanomaisia lisäaineita ja myös muita terapeuttisesti aktiivisia aineita. Lankeaa ammatillisen taitamisen puitteisiin valmistaa sopiva koostumus kun tiedetään antotapa jaannon muut edellytykset.

Käytettävän annoksen voi ammattimies määrätä lähtien tavanomaisista kriteerioista, kuten sairauden vakavuudesta, antotavasta, potilaan iästä ja kunnosta jne.

Keksinnön mukaisesti valmistettuna podofyllotoksiinia ja sen johdannaisia voidaan käyttää useiden erilaisten sairauksien hoitoon, jotka voidaan tiivistää seuraaviksi ryhmiksi.

1. Trooppiset sairaudet, kuten malaria ja skitsotomiasis.
2. Ihosairaudet, kuten psoriasis, sienitartunnat ja alopecia areata.
3. Hylkimisreaktiot elinten siirrossa.
4. Kollagenoosit (sidekudossairaudet), kuten reumaattinen niveltulehdus, systeeminen lupus erythematosus disseminatur, sklerodermia, polyarthemitis nodosa ja sarkoidoosi.
5. Mielisairaus (viruksen aiheuttama), kuten demens ja psykoosit.
6. Neurologiset sairaudet, kuten multippeli sklerosis ja myasthenia gravis.

Terapeuttiset vaikutukset edellä mainittuihin sairauksiin perustuvat podofyllotoksiinin ja sen johdannaisten useihin vaikutusmekanismeihin. Ensiksi yhdiste inhiboi lymfaattisten T-solujen (nk. "tappajasolujen") aktiivisuutta, mikä on tärkeätä torjuttaessa hylkimisreaktioita elinten siirroissa. Lisäksi yhdisteet vaikuttavat solujen jakautumista vastaan metafaasissa, mikä on erittäin merkityksellistä tietyissä ihosairauksissa, kuten psoriasis-tapauksissa. Yhdisteillä on myös biosidinen tai biostaattinen vaikutus sellaisia mikro-organismeja, kuten plasmodiaa, sieniä ja viruksia vastaan, jolloin voidaan hoitaa useita sairauksia, jotka aiheutuvat mikro-organismeista samoin kuin malariaa voidaan hoitaa. Lopuksi yhdisteillä on myös matoja torjuvia ominaisuuksia ja näin ollen niitä voidaan käyttää sisälmysmatoja ja muita parasiitteja vastaan.

Keksinnön mukaisesti valmistetulla podofyllotoksiinilla ja sen johdannaisilla on suoritettu useita farmakologisia, toksikologisia ja kliinisiä tutkimuksia niiden terapeuttisten ominaisuuksien toteamiseksi. Seuraavassa esitetään näiden tutkimusten tulokset.

Akuuttinen myrkyllisyys

Podofyllotoksiinin akuuttinen myrkyllisyys on määritetty erilaisilla koe-eläimillä ja erilaisin antotavoin. Tulokset ilmenevät seuraavasta taulukosta 1.

Taulukko 1

Koe-eläin	Antotapa	Akuuttinen myrkyllisyys
		LD ₅₀ mg/kg
Rotta	i.v.	10
Hiiri	i.v.	20
Hiiri	p.o.	100
Rotta	iholle	500
Kani	iholle	200

Vaikutus malariaa vastaan

Vaikutus malariaa vastaan määritettiin kliinisesti useilla potilailla, jotka olivat saaneet tartunnan malariaparasitiista *Plasmodium falciparum*. Podofyllotoksiinia annettiin kahtena erilaisena annoksena ja parasiittien lukumäärä potilaissa todettiin päivittäin ja merkittiin sukupuolettomien parasiittien lukumääränä veren millilitraa kohti. Tulokset ilmenevät seuraavasta taulukosta 2.

Taulukko 2

Annos	Poti- las no.	Päivä							Huomautukset
		0	1	2	3	4	5	6	7
1,5 mg päivässä (t.i.d.)	1	660	180	0	0	180	270	270	270
	2	13710	3000	120	0	0	0	0	0
	4	1410	360	0	0	60	60	60	60
	5	960	90	0	0	0	0	0	0
	6	13080	510	0	0	0	0	0	0
	7	4380	1560	180	660	1400	-	-	-
3,0 mg päivässä (t.i.d.)	3	2880	2520	60	540	600	600	0	0
	8	2060	1600	60	0	0	0	0	0
	9	6080	2000	0	0	0	0	0	0
	10	320	60	0	0	0	0	0	0

89330

Vaikutus immuuni- ja hylkimisreaktioita vastaan

Lampaiden ja hiirien erytrosyyttien suspensiolla annettu ruiske aiheuttaa spesifisten vasta-aineiden kehittymistä tätä antigeenia vastaan. Tämä reaktio, joka tavallisesti on hyvin voimakas, edellyttää eri solutyyppien, pääasiassa makrofaagien, T- ja B-lymfosyyttien välistä yhteistoimintaa ja se on helposti todettavissa koe-eläinten pernassa. Tämä reaktio on inhiboivissa annoksesta riippuvalla tavalla podofyllotoksiinin päivittäisillä ruiskeilla erytrosyyttien antamisen jälkeen.

Ihonsiirto geneettisesti erilaisiin hiiriin aiheuttaa normaalisti hylkimisen 10 päivän kuluessa. On useissa tapauksissa todettu, että voidaan saavuttaa huomattavasti pidentynyt hengissä pysymisaika, joka on 15 päivää tai pitempi, eläimillä, joita on hoidettu keksinnön mukaisella yhdisteellä verrattuna ilman hoitoa olevaan vertailuryhmään.

In vitro-tutkimuksissa on myös todettu, että podofyllotoksiini inhiboi lisääntymistä tai ei-sukua olevan yksilön mitogeenisten lektiinien tai solujen aiheuttamaa solujen lisääntymistä ja myös inhiboi sytotoksisten solujen kehittymistä. Merkittävästi pienemmillä annoksilla nämä vaikutukset kasvavat kuitenkin. Toiset tutkimukset osoittavat, että podofyllotoksiinilla käsiteltyt solut voivat saada takaisin täydellisen reaktiokyvyn näihin ärsykkeisiin 24 tunnin kuluessa.

Vaikutus psoriasista vastaan

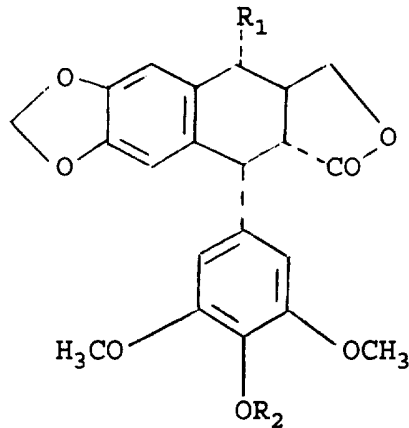
Suoritettiin kliininen tutkimus kaiken kaikkiaan 152 potilaalle, joiden ikä oli 19 ja 71 vuoden välillä (keskiarvo 46,1 vuotta), jotka kärsivät psoriasis vulgariksesta. Potilaat jettiin kolmeen 50, 51 ja 51 henkilön ryhmään, joita hoidettiin ulkonaisesti voiteella, joka sisälsi 0,1, 0,25 ja 0,5 % podofyllotoksiinia. Jokaista potilasta käsiteltiin vain kehon erityisellä sairastuneella alueella, toisten sairastuneiden saaneiden alueiden toimiessa vertailuna. Sairauden vakavuus arvioitiin hoidon alussa sekä 2, 4, 6, 8, 12 ja 16 viikon kulluttua siitä, jolloin mitään hoitoa ei annettu viimeisenä

4 viikon jaksena. Tutkimus suoritettiin käyttäen kaksinkertaista sokkotecniikkaa ja tuloksia käsiteltiin statistisesti.

Kaikilla kolmella annostasolla saatiin statistisesti merkitävät parannukset ($p < 0,001$) hoidettujen vammojen vakavuuteen ja siitä johtuviin oireisiin nähden. Niin aikaisin kuin kahden viikon hoitoajan jälkeen ilmeni statistisesti merkittävä ero ($p < 0,001$) hoidettujen ja hoitamattomien vammojen välillä, ja tämä ero kasvoi hoidon kuluessa. Viidentenä tarkkailuna 70-75 % potilaista olivat oireettomia tai esiintyi vain lieviä oireita, kun taas vain kahdessa potilaassa ilmeni vastaava edistys hoitamattomissa vammoissa. Seuranta-aikana, viikkoina 13-16, ei ilmennyt huonontumista hoidettujen vammojen oireiden vakavuuteen nähden. Vain 11 potilasta ilmoitti sivuvaikutuksista, kuten ihottumasta. Nämä sivuvaikutukset hävisivät kun hoito keskeytettiin. Kolmen hoidetun ryhmän väliset erot sivuvaikutustapausten lukumäärään nähden eivät ole statistisesti merkittäviä (p noin 0,50).

Patenttivaatimus

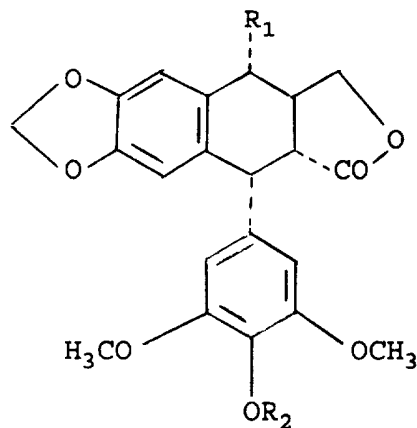
Menetelmä podofyllotoksiinin tai sen johdannaisen valmistamiseksi, jolla on kaava



jossa R_1 on H tai OH ja R_2 on H tai CH_3 , **tunnettu** siitä, että Podophyllum-lajien kasvinosia uutetaan etyyliasetaatilla ja uute väkevöitetään ja suodatetaan piigeeelin läpi, minkä jälkeen se kromatografoidaan happamalla alumiinioksidilla ja pääjäte kromatografoidaan piigeeelillä, ja haluttu tuote kiteytetään tämän jälkeen uudelleen.

Patentkrav

Förfarande för framställning av podofyllotoxin eller ett derivat därav med formeln



vari R_1 betecknar H eller OH, och R_2 betecknar H eller CH_3 , **kännetecknat** av att växtdelar från Podophyllumarter extraheras med etylacetat och extraktet koncentreras och filtre-

ras genom kiselgel, varefter det kromatograferas på sur aluminiumoxid och huvudfraktionen kromatograferas på kiselgel, och den önskade produkten sedan omkristalliseras.