



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **M. 160207**

(51) Int. Cl.⁴ C 07 D 407/04

(83)

(21) Patentsøknad nr. **872747**
(22) Inngivelsesdag 01.07.87
(24) Løpedag 21.11.85
(62) Avdekket/utviklet fra søknad nr. **854657**

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 23.05.86
(44) Utlegningsdag 12.12.88

(71)(73) Søker/Patenthaver **MADAUS GMBH & CO,**
Ostmerheimer Strasse 198,
D-5000 Köln 91, BRD.

(72) Oppfinner **ROLF MADAUS, Köln,**
KLAUS GÖRLER, Bergisch
Gladbach, HARTWIG SOICKE,
Köln, BRD.

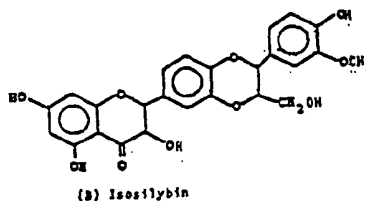
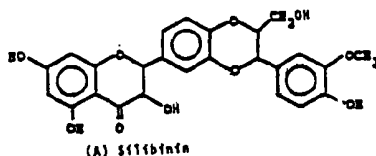
(74) Fullmektig Siv. ing. Dag Dawes,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 22.11.84, 23.10.85, DE,
nr P 34 42 641, P 35 37 656.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMANGSMÅTE VED FREMSTILLING
AV ISOSILYBININFRIIT SILIBININ.**

(57) Sammendrag Fremgangsmåte ved fremstilling av isosilybininfritt silibinin fra råsilibinin fremstilt fra tørkede frukter av *Silybum marianum* L. Gaertn. Opparbeidingen og rensingen foregår ved oppslemming i metanol og frafiltrering av det faste produkt, oppløsning av det faste produkt i eddikester, behandling med aktivt karbon, inndamping av filtratet som er befridd for aktivt karbon under redusert trykk, tilsetning av en liten mengde metanol, og frafiltrering og ettervasking av det utfelte produkt etter henstand ved romtemperatur. Det rensede produkt tørkes til slutt i vakuum.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

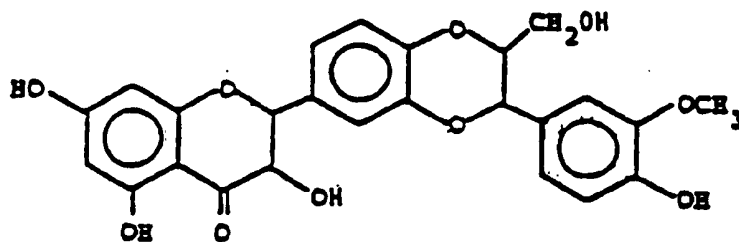


Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte ved fremstilling av silibinin,

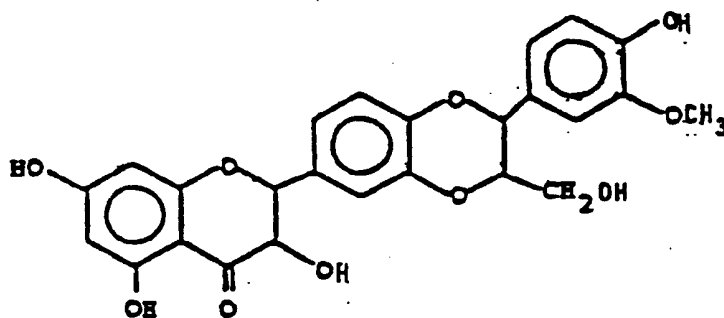
Marietistel - *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.) - er kjent som legeplante fra gamle tider. Fra flavolignanene som forekommer i fruktene til denne planten ble det isolert en komponent, silybin av R. Münster, sammenlign dissertasjon R. Münster, München, 1966. Den kjemiske strukturen til denne forbindelsen ble oppklart av A. Pelter og R. Hänsel, sammenlign *Tetrahedron Letters*, London, bind 25, side 2911-2916 (1968).

Det er kjent at silybin, tidligere også kalt silymarin I, er et verdifullt leverterapeutikum, sammenlign tysk utl.skrift 17 67 666. En teknisk fremgangsmåte ved fremstilling av silybin (silymarin I) er f.eks. beskrevet i det tyske utl.skrift 19 23 082.

Allerede i 1974 hadde H. Wagner, P. Diesel og M. Seitz, *Arzneimittelforschung*, bind 24(4), side 466-471, antatt to stillingsisomere med hensyn til silybin, nemlig silybin og isosilybin. Denne antagelse ble presisert og eksperimentelt bekreftet av A. Arnone, L. Merlini og A. Zanarotti, *Journal Chemical Society Chem. Comm.*, 1979, bind 16, side 696/97. Ifølge dette består det kjente silybin av to forskjellige forbindelser, nemlig forbindelsene med de etterfølgende strukturformler A og B:



(A) Silibinin



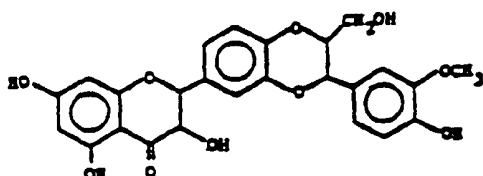
(B) Isosilybin

Fra disse strukturformler ser man at det ved disse forbindelser dreier seg om stillingsisomere. Forbindelsen med formel (A) har nylig fått INN-betegnelsen silibinin. Denne betegnelse anvendes også i foreliggende søknad for forbindelsen med formel (A).

De to ovenfor betegnede forbindelser A og B er hittil bare adskilt og fremstilt i analytiske mengder, og med hensyn til de farmakologiske virkninger av de enkelte isomere er ingenting kjent.

Oppgaven fra oppfinnelsen ligger derfor i å frembringe en fremgangsmåte ved fremstilling av isosilibininfritt silibinin,

Gjenstand for oppfinnelsen er derfor en fremgangsmåte ved fremstilling av silibinin med en formel:



hvorunder man befrir tørkede frukter av *Silybum marianum* L. Gaertn. for hovedmengden av den fete olje idet man sprenger opp fruktenes celler med høyt mekanisk trykk, deretter ekstraherer pressresten som ennå har et restoljeinnhold på 5 til 10% uttømmende med etylacetat, fordamper etylacetatet, deretter oppløser den erholdte, tørre rest i en mengde på 2 vekt% i undefasen som består av metanol og vann av en ternær løsningsmiddelblanding av 95 vektdeler metanol, 5 vektdeler vann og 100 vektdeler petroleter (kokepunkt 40 til 60°C), klarsentrifugerer for å fjerne fnokkede faststoffpartikler og underkaster den tørre rest i dette løsningsmiddelssystem multiplikativ, likeartet fordeling i motstrøm, hvorved hele det flytende volumforhold av overfase/underfase forblir 1:1, og deretter fra underfasen som strømmer ut isolerer en 70 til 80%ig polyhydroksyfenylkromanonblanding (Silymarin I-IV = Silymarin I-IV-gruppe) som brunt pulver ved inndamping i vakuum til tørrhet, som er karakterisert ved at man

- a) oppslemmer en vektdel av det erholdte brunaktige pulver som i det følgende tas som mengdereferanse, i 0,7 til 1,5 vektdeler vannholdig etylacetat og lar den erholdte suspensjon stå en til to dager og frafiltrerer fellingen,
- b) vasker den erholdte felling med 0,07 til 0,15 vektdeler kald vannmettet etylacetat og tørker ved 30 til 50°C i vakuum,
- c) oppløser dette produkt i 30 til 50 vektdeler tørt (vannfritt) etylacetat ved kokepunktet, behandler med 0,2 til 0,4 vektdeler aktivt karbon ved tilbakeløp, filtrerer og inndamper filtratet ved 30 til 50°C i vakuum til 1/12 av løsningsmiddelet som ble anvendt for oppløsning,
- d) tilsetter konsentratet 0,5 til 0,8 vektdeler vannmettet etylacetat, frafiltrerer det utfelte silibinin etter 5 til 10 timer og

e) oppslemmer silibininet i 0,9 til 1,8 vektdeler teknisk etylacetat, filtrerer på nytt, fortørker i vakuum ved 30 til 50°C, maler det fortørkede produkt og tørker på nytt ved 30 til 50°C i vakuum.

Det brunaktige pulver som anvendes som utgangsprodukt i trinn a) henholdsvis råsilymarin er en blanding av silymarinene I - IV. Ved behandling av råsilymarin med vannmettet etylacetat finner i det vesentlige separasjonen av hovedandelen av silymarinene II til IV sted (silibinin er silymarin I) og de 20 til 30%ige følgestoffer i råsilimarinet samt en del isosilybin. Man får på denne måten i trinn b) råsilibinin med et utbytte avhengig av råsilymarinkvaliteten på 80 til 85% (i forhold til silybininnholdet i råsilymarin) og med et innhold på 80 til 84%.

Råsilibinin er som beskrevet i teknikkens stand en blanding av isosilybin og silibinin i forholdet ca. 1:4.

I trinnene c) til e) finner separasjonen av hovedandelene av isosilybin fra silibinin sted, samt resten av de andre forannevnte bestanddeler.

En spesiell fordel ved denne separasjonsmetoden er anvendelsen av bare et eneste løsningsmiddel, nemlig etylacetat, men riktignok med forskjellig vanninnhold. Derunder er det vesentlig å anvende vannfritt etylacetat i trinn c) og vannholdig etylacetat i trinn d). Man får ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen silibinin i et utbytte på 79 - 85% (i forhold til silibinin i råsilibinet) og med et innhold på 96-98% silibinin.

En spesielt foretrukket utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen består i at man

- a) oppslemmer en vektdel av det brunaktige pulver i 0,9 vektdeler vannmettet etylacetat, lar stå 48 timer ved romtemperatur og frafiltrerer den erholdte felling,
- b) vasker fellingen med 0,09 deler kalt vannmettet etylacetat og tørker 48 timer ved 40°C i vakuum,
- c) oppløser det erholdte produkt i 36 vektdeler tørt etylacetat ved kokepunktet, oppvarmer 2 timer ved tilbakeløp med 0,36 vektdeler aktivt karbon, filtrerer og inndamper ved 50°C i vakuum til 1/12 av løsningsmiddelet som ble anvendt for oppløsning,

- d) tilsetter konsentratet ved romtemperatur 0,6 vektdeler vannmettet etylacetat, lar stå 12 timer ved romtemperatur og frafiltrerer det utfelte produkt,
- e) oppslemmer og filtrerer dette produktet to ganger i hver gang 1,8 vektdeler teknisk etylacetat, fortørker 24 timer i vakuum ved 40°C, maler og ettørtørker 48 timer i vakuum ved 40°C.

Det ble funnet at isosilybinfritt silibinin er meget egnet for farmasøytiske formål. Overraskende fant man at det er vesentlige fordeler i forhold til de andre kjente bestanddeler av Silybum-marianum-ekstrakter. Det er spesielt egnet for behandling av leverzirrrose og toksisk-metaboliske leverskader. Det kan også anvendes forebyggende, slik at de beskrevne skader overhodet ikke opptrer.

Legemidler som inneholder silibinin anvendes for det meste systemisk, f.eks. i form av piller, kapsler, løsninger, i vanlige bærere og eventuelt sammen med vanlige hjelpestoffer. Dagsdosen for et voksent menneske er ca. 50 - 500 mg avhengig av pasientens tilstand og sykdomssymptomenes styrke.

Eksempel

Fremstilling av isosilybinfritt silibinin:

1 kg av en polyhydroksyfenylkromanonblanding (Silymarin I-IV = Silymarin I - IV-gruppe; innhold ca. 70%) som brunaktig pulver, her også kalt råsilymarin, som ble fremstilt ifølge spalte 8, linje 14-19 i tysk utl.skrift 19 23 082 som det her ved refereres til, oppslemmer man i

1 liter vannmettet eddikester i 30 minutter med turrax. Etter 48 timers henstand ved romtemperatur frafiltreres fellingen, vaskes med

100 ml kald, vannmettet eddikester og tørkes 48 timer ved 40°C i vakuum.

Utbyttet av dette mellomprodukt, råsilibinin, er avhengig av råsilymarinkvaliteten 80-85% - beregnet i forhold til silibinininnhold i råsilymarin - med et innhold på 80 - 84%.

Råsilibininet oppløses i

40 l tørr eddikester ved kokepunktet, kokes med

360 g aktivt karbon i 2 timer ved tilbakeløp, filtreres og

160207

6

inndampes til

3330 ml totalvolum ved 50°C i vakuum. Denne løsning tilsettes under kraftig røring ved romtemperatur

667 ml vannmettet eddikester. Etter 1 - 3 timer begynner deretter krystallisasjonen av silibinin. Etter henstand natten over skilles det utfelte silibinin fra ved filtrering, oppslemmes to ganger i hver gang

1200 ml teknisk eddikester i 5 - 10 minutter, filtreres på nytt og fortørkes 24 timer i vakuum ved 40°C. Etter maling ettørtørkes 48 timer ved 40°C i vakuum.

Silibininutbyttet - regnet i forhold til silibinin i råsilibinin - 79-85% ved et innhold på 96-98,5% silibinin avhengig av råsilibininkvaliteten.

Fysikalske data:

a) ¹H-NMR [Pyridin-d₅; 100 MHz]

δ [ppm]		
3,79	s	3H OCH ₃
3,8 - 4,2	m	1H CH ₂ -OH
4,25 - 4,40	m	1H 2'H
5,05	d (J=11 Hz)	1H 3H
5,39	d (J= 8 Hz)	1H 3'H
5,48	d (J=11 Hz)	1H 2H
6,41	d (J= 2 Hz)	1H 6H
6,51	d (J= 2 Hz)	1H 8H
7,1 - 7,6		6H arom. H

b) ^{13}C -NMR [Pyridin- d_5 ; 25,18 MHz]

C Atom	δ [ppm]
4	198,43
7	168,85
5	165,06
9	163,75
16	149,89
17	148,82
4'	145,05
3'	144,71
1'	131,33
14	128,45
6'	123,83
19	121,83
2'	117,50
5'	117,15
18	116,62
15	112,11
10	101,61
6	97,56
8	96,27
2	84,31
12	79,97
13	77,13
3	73,36
11	61,48
20	55,99

c) Smp.: 165 - 168°C; 180°C spaltet.

d) UV: $\lambda_{\text{max}} = 288 \text{ nm}$; $\log \epsilon = 4,34$

e) IR (KBr) : 3450 cm^{-1} (OH)
1635 cm^{-1} (C=O)
1510 cm^{-1}

Kliniske forsøk

Kliniske forsøk med silibinin

Toksiske leverskader har tiltatt overordentlig sterkt i de siste årtier. Den hyppigste skadeårsak er stadig alkohol.

Ved kontrollerte studier kunne man bevise silibininets overlegenhet i forhold til en skinnterapi (placebo) eller andre sammenligningsterapier. I en dobbeltundersøkelse ble silibinin (n = 31) prøvet statistisk mot placebo (n = 35) på 66 pasienter med alkoholtoksiske leverskader.

De statistisk utregnede resultater viser at silibinin er signifikant bedre enn placeboet. Derunder var den vesentlig kortere helbredelsestiden i forhold til placebo påfallende. I en andre dobbeltblindundersøkelse med 76 pasienter, hvorav 39 fikk silibinin og 37 en kontrollterapi, var forskjellene til fordel for silibinin meget signifikante.

Ved de levertoksiske virkninger av narkose i sammenligning med operasjoner av bukorganer kunne det påvises at preoperativ administrering av silibinin senker den postoperative stigning av leverenzymmer i blodet signifikant. Også leverskadene som induseres i dag stadig oftere ved bestemte legemidler forhindres virkningsfullt ved silibinin. Dette kunne f.eks. vises med en fenyhydantoin-indusert hepatose, ved hvilken det til tross for ytterligere forordninger av det ubetinget nødvendige, krampehindrende medikament viste seg at samtlige laboratorieverdier normaliserte seg i løpet av kort tid ved samtidig administrering av silibinin.

Ytterligere undersøkelser på syke med schizofrenier og sterke leverskader ved foreskrivning av klorpromazin viste likeledes silibininets positive virkning seg. Andre forsøk vedrører forhindring av leverskadende virkninger av f.eks. klorokin eller asparaginase. Ved yrkesbetingte leverskader kunne man hos alle behandlede pasienter forbedre de patologisk forhøyde laboratorieresultater vesentlig uavhengig av de enkelte årsaker eller av mulig ytterligere sykdommer.

Dertil finner man tilstrekkelig indikasjoner på at silibinin også ved kronisk-betente leversykdommer og leverzirrrose frembringer vesentlige bedringer. F.eks. ble pasienter med leverzirrrose opptatt innenfor rammen av et langtidsstudium i

et statistisk dobbeltblindstudium, hvori silibinin ble prøvet mot en plazebo. Kriteriet for vurderingen av det terapeutiske resultat var fremfor alt overlevelsestiden. Her viste det seg tydelig at silibinin var overlegent i forhold til plazebo-behandlingen.

Virkningssammenligning mellom silibinin og isosilybin og silybin (silibinin/isosilybin blanding) i modellen falloidin- og praseodyminforgiftning hos mus etter intravenøs administrering.

Den antihepatotoksiske virkningen til silibinin, isosilybin og silybin som et N-metylglucaminsalter ble undersøkt i dosene 50 og 100 mg pr. kg i forhold til silibinin i modellen falloidin- og praseodymforgiftning hos mus etter intravenøs applikasjon. Applikasjon av prøvesubstansen fant sted 1 time før falloidin henholdsvis 1 time før og 6 timer, 24 timer og 48 timer etter praseodym. Man vurderte ved falloidinforgiftningen overlevelsesgraden og ved praseodymforgiftningen forskjellige serum- og leverparametere 72 timer etter forgiftningen.

Ved falloidinforgiftningen var overlevelsesgraden etter silibinin i begge doser 100%, med de øvrige substanser ble overlevelsesgraden på 40% hos de ubehandlede, skadede kontroller ikke overskredet.

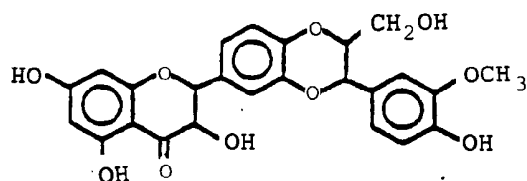
Isosilybin viste seg i sammenheng med praseodymforgiftningen som ufordragelig, slik at dosen på 100 ml/kg⁻¹ måtte oppspaltes i to delapplikasjoner.

160207

10

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte ved fremstilling av isosilybininfritt silibinin med formel:



hvorunder man befrir tørkede frukter av *Silybum marianum* L. Gaertn. for hovedmengden av den fete olje, idet man sprenger opp fruktenes celler med høyt mekanisk trykk, så ekstraherer pressresten som ennå har et restoljeinnhold på 5 til 10 % uttømmende med etylacetat, fordamper etylacetat, deretter oppløser den erholdte tørre rest i en mengde på 2 vekt% i underfasen bestående av metanol og vann fra en ternær løsningsmiddelblanding av 95 vektdeler metanol, 5 vektdeler vann og 100 vektdeler petroleter (kokepunkt 40 til 60°C), for å fjerne fnokkede faststoffpartikler klarsentrifugerer og underkaster den tørre rest i dette løsningsmiddelsystem multiplikativ, likeartet fordeling i motstrøm, hvorunder det totale volumforhold av overfase/underfase forblir lik 1:1, og deretter isolerer en 70 til 80 %ig polyhydroksyfenylkromanonblanding (Silymarin I-IV = Silymarin I-IV-gruppe) som brunaktig pulver fra underfasen som flyter ut ved inndamping i vakuum,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t m a n

- a) oppslemmer en vektdel av det erholdte brunlige pulver som i det følgende tas som mengdereferanse i 0,7 til 1,5 vektdeler vannmettet etylacetat, og lar den erholdte suspensjonen stå igjen til to dager og frafiltrere fellingen,
- b) vasker den erholdte felling med 0,07 til 0,15 vektdeler kald, vannmettet etylacetat og tørker ved 30 til 50°C i vakuum,
- c) oppløser dette produkt i 30 til 50 vektdeler tørt (vannfritt) etylacetat ved kokepunktet, behandler med 0,2 til 0,4 vektdeler aktivt karbon i to timer ved tilbakeløp, filtrerer og

160207

11

inndamper filtratet ved 30 til 50°C i vakuum til 1/12 av løsningsmidlet som ble anvendt for oppløsning,

d) tilsetter konsentratet 0,5 til 0,8 vektdeler vannmettet etylacetat, frafiltrerer det utfelte silibinin etter 5 til 10 timer og

e) oppslemmer silibininet i 0,9 til 1,8 vektdeler teknisk etylacetat, filtrerer på nytt, fortørker i vakuum ved 30 til 50°C, maler det fortørkede produkt og tørker på nytt ved 30 til 50°C i vakuum.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t m a n

a) oppslemmer en vektdel av det brunaktige pulver i 0,9 vektdeler vannmettet etylacetat, lar stå 48 timer ved romtemperatur og frafiltrerer den erholdte felling,

b) vasker fellingen med 0,09 deler kald, vannmettet etylacetat og tørker 48 timer ved 40°C i vakuum,

c) oppløser det erholdte produkt i 36 vektdeler tørt etylacetat ved kokepunktet, oppvarmer to timer ved tilbakeløp med 0,36 vektdeler aktivt karbon, filtrerer og inndamper ved 50°C i vakuum til 1/12 av løsningsmidlet som ble anvendt for oppløsning,

d) tilsetter konsentratet 0,6 vektdeler vannmettet etylacetat ved romtemperatur, lar stå 12 timer ved romtemperatur og frafiltrerer det utfelte produkt,

e) oppslemmer dette produkt to ganger i hver gang 1,8 vektdeler teknisk etylacetat og filtrerer, fortørker 24 timer i vakuum ved 40°C, maler og etttertørker 48 timer i vakuum ved 40°C.