



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentsøgning nr.: 1894/91

(22) Indleveringsdag: 20 nov 1991

(24) Løbedag: 21 nov 1985

(41) Alm. tilgængelig: 20 nov 1991

(44) Fremlagt: 31 aug 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 5376/85

(30) Prioritet: 22 nov 1984 DE 3442641 23 okt 1985 DE 3537656

(51) Int.Cl.5

C 07 D 407/04
/(C 07 D 407/04,
C 07 D 311:00,
C 07 D 319:00)

(71) Ansøger: *Madaus AG; Ostmerheimer Strasse 198; D-W-5000 Koeln 91, DE

(72) Opfinder: Rolf *Madaus; DE, Klaus *Goerler; DE, Hartwig *Soicke; DE

(74) Fuldmægtig: Dansk Patent Kontor A/S

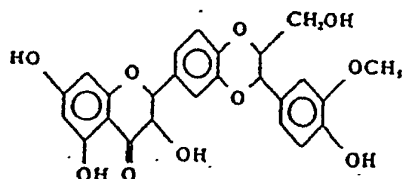
(54) Fremgangsmåde til isolering af isosilybinfrit silibinin

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1894-91

Isosilybinfrit silibinin med formlen



opnås ved at størsteparten af den fede olie fjernes fra tørrede frugter af *Silybum marianum* L. Gaertn. ved oplukning af cellerne i frugterne under anvendelse af højt mekanisk tryk, presseresten med et restolieindhold på 5-10% ekstraheres fuldstændigt med ethylacetat, ethylacetatet afdampes, den tørre remanens opløses i en mængde på 2 vægtprocent i den af methanol og vand bestående underfase af en ternær opløsningsmiddelblanding

fortsættes

af 95 vægtdele methanol, 5 vægtdele vand og 100 vægtdele petroleumsether (kogeinterval 40-60°C), fnugagtige partikler fjernes ved centrifugering, den tørre remanens underkastes multiplikativ, ensartede fordeling i modstrøm i dette opløsningsmiddelsystem, hvorved det totale strømningsvolumenforhold mellem overfase og underfase er 1:1, en 70-80% polyhydroxyphenylchromanonblanding (råsilymarin) isoleres som et brunligt pulver fra den bortstrømmende underfase ved inddampning i vakuum til tørhed, en vægtdel af det brunlige pulver suspenderes i 0,7-1,5 vægtdele vandmættet ethylacetat, den dannede suspension henstår i 1-2 dage, bundfaldet frasuges, bundfaldet vaskes med 0,07-0,15 vægtdele koldt vandmættet ethylacetat og tørres ved 30-50°C i vakuum, det fremkomne produkt opløses i 30-50 vægtdele vandfrit ethylacetat under opvarmning til kogning, der tilsættes 0,2-0,4 vægtdele aktivt kul under opvarmning til kogning med tilbagesvaling i 2 timer, blandingen filtreres, og filtratet inddampes ved 30-50°C i vakuum til 1/12 af rumfanget af det til opløsningen anvendte opløsningsmiddel, 0,5-0,8 vægtdele vandmættet ethylacetat sættes til koncentratet, og det udfældede silibinin frafiltreres efter 5-10 timer, hvorpå silibininet suspenderes en eller to gange i 0,9-1,8 vægtdele teknisk ethylacetat pr. gang, suspensionen filtreres, produktet fortørres i vakuum ved 30-50°C, og det fortørrede produkt formales og tørres på ny ved 30-50°C i vakuum, idet alle vægtdele er beregnet på vægten af det brunlige pulver.

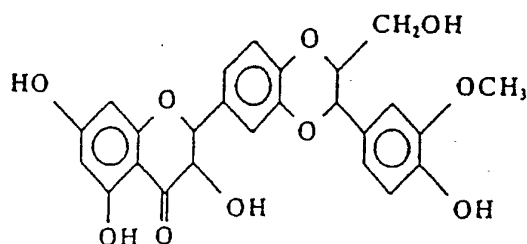
Isosilybinfrit silibinin fås i højt udbytte og med stor renhed.

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til isolering af isosilybinfrit silibinin.

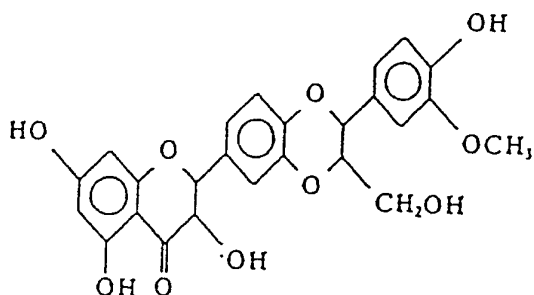
Silybum marianum (L.) Gaertn. (Carduus marianus L.) har siden oldtiden været en kendt lægeplante. Af flavolignan-
 5 naner, som forekommer i frugterne af denne plante, har R. Münster isoleret en komponent, silybin, jfr. Dissertation R. Münster, München, 1966. Denne forbindelses kemiske struktur er bestemt af A. Pelter og R. Hänsel,
 10 jfr. Tetrahedron Letters, London, bind 25, s. 2911-2916 (1968).

Det er kendt, at silybin, der tidligere også blev kaldt silymarin I, er et værdifuldt leverterapeutikum, jfr. DE-fremlæggelsesskrift nr. 1.767.666. En teknisk frem-
 15 gangsmåde til fremstilling af silybin (silymarin I) er eksempelvis beskrevet i DE-fremlæggelsesskrift nr. 1.923.082.

Allerede i 1974 blev der fremsat formodninger om, at silybin omfatter to stillingsisomerer, nemlig silybin og
 20 isosilybin, jfr. H. Wagner, P. Diesel og M. Seitz, Arzneimittelforschung, bind 24 (4), s. 466-471, 1974. Denne formodning er blevet præciseret og eksperimentelt bekræftet af A. Arnone, L. Merlini og A. Zanarotti, Journal Chemical Society Chem. comm., 1979, bind 16, s. 696-697.
 25 Ifølge dette litteratursted består det kendte silybin af to forskellige forbindelser, nemlig forbindelserne med de nedenfor anførte strukturformler A og B.



(A) Silibinin



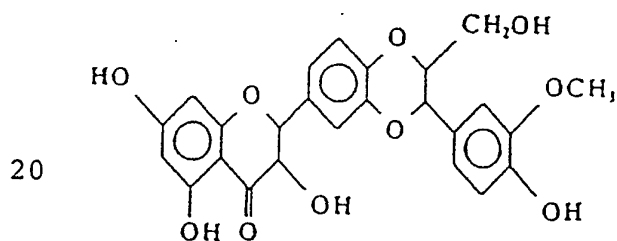
(B) Isosilybin

Det fremgår af disse strukturformler, at disse forbindelser er stillingsisomerer. Forbindelsen med formelen (A) har i dag INN-betegnelsen silibinin. Denne betegnelse anvendes også
 5 i den foreliggende beskrivelse for forbindelsen med formelen (A).

De to ovenfor anførte forbindelser A og B er hidtil kun adskilt og fremstillet i analytiske mængder, og der foreligger modstridende oplysninger om de enkelte isomerers farmakologiske virkninger, jf. V. Quercia, N. Pierini,
 10 V. Valcavi, R. Caponi, S. Innocenti og S. Tedeschi, Anal. Chem. Symp. Ser. 13, side 1-13 (1983). Først betegnes adskillelsen af de to stoffer som tvivlsom, og derpå tilskrives de adskilte stoffer samme farmakologiske virkning i phalloidin-toxikationsmodellen. Dette resultat
 15 kan ikke reproducere med de virkeligt rene stoffer.

Det er formålet med opfindelsen at tilvejebringe en fremgangsmåde til isolering af isosilibinfrit silibinin.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen til isolering af isosilybinfrit silibinin med formelen



- fjerner man hovedparten af den fede olie fra tørrede frugter af *Silybum marianum* L. Gaertn. ved oplukning af cellerne i frugterne under anvendelse af højt mekanisk tryk, hvorpå presseresten med et restolieindhold på 5-10% ekstraheres fuldstændigt med ethylacetat, ethylacetatet afdampes, den fremkomne tørre remanens opløses i en mængde på 2 vægtprocent i den af methanol og vand bestående underfase af en ternær opløsningsmiddelblanding af 95 vægtdele methanol, 5 vægtdele vand og 100 vægtdele petroleumsether (kogeinterval 40-60°), hvorpå fnugagtige partikler af fast stof fjernes ved klarcentrifugering, og den tørre remanens underkastes den multiplikative, ensartede fordeling i modstrøm i dette opløsningsmiddel-system, hvorved det totale strømningsvolumenforhold mellem overfase og underfase er 1:1, hvorpå en 70-80%'s polyhydroxyphenylchromanonblanding (råsilymarin) isoleres som et brunligt pulver fra den bortstrømmende underfase ved inddampning i vakuum til tørhed.
- 20 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at
- a) en vægtdel af det dannede brunlige pulver suspenderes i 0,7-1,5 vægtdele vandmættet ethylacetat, den dannede suspension henstår i 1-2 dage, hvorpå bundfaldet frasuges,
 - 25 b) det dannede bundfald vaskes med 0,07-0,15 vægtdele koldt vandmættet ethylacetat og tørres ved 30-50°C i vakuum,
 - c) det fremkomne produkt opløses i 30-50 vægtdele vandfrit ethylacetat under opvarmning til kogning, hvorpå der behandles med 0,2-0,4 vægtdele aktivt kul under opvarmning til kogning med tilbagesvaling i 2 timer, blandingen filtreres, og filtratet inddampes ved 30-50°C i vakuum til 1/12 af rumfanget af det til opløsningen anvendte opløsningsmiddel,
 - 30 d) 0,5-0,8 vægtdele vandmættet ethylacetat sættes til koncentratet, og det udfældede silibinin frafiltreres efter 5-10 timer, hvorpå
 - 35

- e) silibininet suspenderes en eller to gange i 0,9-1,8 vægtdele teknisk ethylacetat pr. gang, og suspensionen filtreres, produktet fortørres i vakuum ved 30-50°C, det fortørrede produkt formales og tørres på ny ved 30-50°C i vakuum, idet alle vægtdele er beregnet på vægten af det brunlige pulver.

- Det i trin a) som udgangsmateriale anvendte brunlige pulver eller råsilymarin er en blanding af silymarinerne I-IV. Ved behandlingen af råsilymarinet med vandmættet ethylacetat opnås i det væsentlige fraskillelsen af hovedmængderne af silymarin II-IV (silibinin er silymarin I) og 20-30% af ledesagestofferne i råsilymarin samt en del isosilybin. På denne måde får man i trin b) råsilibinin med et udbytte på 80-85% (beregnet på silibininindholdet i råsilymarin) og en renhed på 80-84%, afhængigt af kvaliteten af råsilymarinet.

Råsilibininet er ifølge den kendte teknik en blanding af isosilybin og silibinin i forholdet ca. 1:4.

- I trinene c) til e) sker fraskillelsen af hovedandelen af isosilybin fra silibinin samt rester af andre ovenfor omtalte bestanddele.

- En særlig fordel ved denne adskillellesmetode er anvendelsen af kun et enkelt opløsningsmiddel, nemlig ethylacetat, dog med forskelligt vandindhold. Det er vigtigt, at der i trin c) anvendes vandfrit ethylacetat og i trin d) anvendes vandmættet ethylacetat. Ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnås silibinin i et udbytte på 79-85% (beregnet på silibinin i råsilibinin) og med et silibininindhold på 96-98%.

En særlig foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at

- a) en vægtdel af det brunlige pulver suspenderes i 0,9 vægtdele vandmättet ethylacetat, suspensionen henstår i 48 timer ved stuetemperatur, og det dannede bundfald frasuges,
- b) bundfaldet vaskes med 0,09 vægtdele koldt vandmättet ethylacetat og tørres i 48 timer ved 40°C i vakuum,
- c) det dannede produkt opløses i 36 vægtdele vandfrit ethylacetat under opvarmning til kogning, der tilsættes 0,36 vægtdele aktivt kul og opvarmes i 2 timer til kogning med tilbagesvaling, blandingen filtreres, og filtratet inddampes ved 50°C i vakuum til 1/12 af rumfanget af det til opløsningen anvendte opløsningsmiddel,
- d) til koncentratet sættes ved stuetemperatur 0,6 vægtdele vandmättet ethylacetat, blandingen henstår i 10 timer ved stuetemperatur, og det udfældede produkt frafiltreres, hvorpå
- e) produktet suspenderes to gange i 1,8 vægtdele teknisk ethylacetat pr. gang og filtreres, produktet fortørres i 24 timer ved 40°C i vakuum, hvorpå det formales og eftertørres i 48 timer ved 40°C i vakuum.

Det har vist sig, at isosilybinfrit silibinin er særdeles velegnet til farmaceutiske formål. Det har overraskende vist sig, at det har væsentlige fordele i forhold til de andre kendte bestanddele i silybum-marianum-ekstrakter.

Det er især velegnet til behandling af leverzirrrose og toksisk-metaboliske leverbeskadigelser. Det kan også anvendes til præventiv behandling, således at de beskrevne beskadigelser slet ikke optræder.

Isosilybinfrit silibinin kan formuleres i form af farmaceutiske præparater, som eventuelt indeholder et farmaceutisk bærestof og/eller et hjælpestof. Det anvendes for det meste systemisk, f.eks. i form af piller, kapsler og opløsninger, i gængse bærestoffer og eventuelt sammen med almindelige hjælpestoffer. Dagsdosis for et voksent menneske udgør ca. 50-500 mg, afhængigt af patientens tilstand og sygdomssymptomernes sværhedsgrad.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere i det efterfølgende eksempel.

Eksempel

Fremstilling af isosilybinfrit silibinin.

1 kg polyhydroxyphenylchromanonblanding (silymarin I-IV =
silymarin I-IV-gruppe, renhed ca. 70%) i form af et brun-
5 ligt pulver, der her også betegnes råsilymarin, og som
er fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden beskrevet
i DE-fremlæggeskrift nr. 1.923.082, spalte 8,
linie 14-19, suspenderes i 1 liter vandmættet ethylacetat
i 30 minutter ved hjælp af et Turrax-apparat. Efter 48 ti-
10 mers henstand ved stuetemperatur frasuges bundfaldet, som
vaskes med 100 ml kold vandmættet ethylacetat og tørres i
48 timer i vakuum ved 40°C. Udbyttet af dette mellemprodukt,
råsilibinin, er 80-85%, beregnet på silibininindholdet i råsilymarin,
med en renhed på 80-84%, afhængigt af
15 kvaliteten af det anvendte råsilymarin.

Råsilibinet opløses i 40 liter tør ethylacetat under op-
varmning til kogning, hvorpå der koges med 360 g aktivt
kul i 2 timer med tilbagesvaling, blandingen filtreres, og
filtratet inddampes i vakuum ved 50°C til et samlet rumfang
på 3330 ml. Til denne opløsning sættes under intensiv omrø-
20 ring ved stuetemperatur 667 ml vandmættet ethylacetat. Efter
1-3 timers forløb indtræder krystallisationen af silibininet.
Efter henstand natten over isoleres det udfældede silibinin
ved filtrering, suspenderes to gange med 1200 ml teknisk
ethylacetat i 5-10 minutter pr. gang, hvorpå der på ny
25 foretages filtrering, hvorefter produktet fortørres i
24 timer i vakuum ved 40°C. Efter formaling foretages
eftertørring i vakuum i 48 timer ved 40°C. Silibininudbyttet
er 79-85%, beregnet på silibininindholdet i råsilibinin,
med en renhed på 96-98,5%, afhængigt af kvaliteten af rå-
30 silibininet.

Silibininet fremstillet ifølge ovenstående eksempel har følgende fysisk-kemiske data:

<u>$^1\text{H-NMR}$[pyridin-d_5; 100 MHz]</u>			
5	δ [ppm]		
	3,79	s	3H OCH_3
	3,8-4,2	m	1H $\text{CH}_2\text{-OH}$
	4,25-4,40	m	1H $2'\text{H}$
	5,05	$d(J = 11 \text{ Hz})$	1H 3H
10	5,39	$d(J = 8 \text{ Hz})$	1H $3'\text{H}$
	5,48	$d(J = 11 \text{ Hz})$	1H 2H
	6,41	$d(J = 2 \text{ Hz})$	1H 6H
	6,51	$d(J = 2 \text{ Hz})$	1H 8H
	7,1-7,6		6H arom. H
15	<u>$^{13}\text{C-NMR}$[pyridin-d_5; 25,18 MHz]</u>		
	C-Atom		δ [ppm]
	4		198,43
	7		168,85
	5		165,06
20	9		163,75
	16		149,89
	17		148,82
	4'		145,05
	3'		144,71
25	1'		131,33
	14		128,45
	6'		123,83
	19		121,83
	2'		117,50
30	5'		117,15
	18		116,62
	15		112,11
	10		101,61
	6		97,56
35	8		96,27
	2		84,31
	12		79,97
	13		77,13
	3		73,36
40	11		61,48
	20		55,99

Smp.: 165-168°C i 180°C (sønderdeling)

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

IR (KBr): $3450 \text{ cm}^{-1}(\text{OH})$, $1635 \text{ cm}^{-1}(\text{C=O})$, 1510 cm^{-1} .

Kliniske forsøg med silibinin.

Toksiske leverskader har i de sidste årtier taget et over-
ordentligt stort omfang. De hyppigste årsager til disse
5 skader er nu som før alkohol.

Ved kontrollerede undersøgelser har man påvist silibinins
overlegne virkning i forhold til placebobehandling eller
behandling med sammenligningsforbindelser. Ved dobbeltfor-
søg med 66 patienter med alkoholtoksiske leverskader fore-
10 tages randomiseret afprøvning af silibinin (n = 31) mod
placebopræparat (n = 35).

Ved statistisk behandling af forsøgsresultaterne viser det
sig, at silibinin har en signifikant bedre virkning i for-
hold til placebopræparatet. Især skal fremhæves den væsent-
15 lige kortere helbredelsestid i forhold til helbredelsesti-
den opnået med placebopræparatet. Ved et andet dobbeltblind-
forsøg med 76 patienter, hvoraf 39 behandles med silibinin
og 37 med et kontrolpræparat, er resultaterne opnået med
silibinin signifikant bedre end resultaterne opnået med
20 kontrolpræparaterne.

Ved de levertoksiske indvirkninger af narkose i forbindelse
med operationer af maveorganerne er det påvist, at den præ-
operative indgivelse af silibinin signifikant sænker den
postoperative forøgelse af leverenzymerne i blodet. Også de
25 i dag stadig oftere af visse lægemidler inducerede lever-
skader forhindres effektivt ved hjælp af silibinin. Dette
kan påvises ved hjælp af en phenylhydantoin-induceret
hepatose, hvor der til trods for den fortsatte ordinerings
af det ubetinget nødvendige, krampeforhindrende medikament
30 ved samtidig indgift af silibinin opnås normalisering af
samtlige laboratorieværdier i løbet af kort tid.

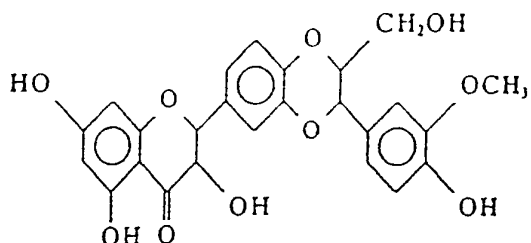
- Andre undersøgelser af patienter med skizofreni og svære leverskader som følge af ordinering af chlorpromazin viser ligeledes den positive virkning af silibinin. Andre forsøg omhandler forebyggelsen af leverbeskadigelser fremkaldt af f.eks. chloroquin eller asparaginase. Ved erhvervsbetingede leverskader har man hos alle patienterne kunnet forbedre de patologisk forøgede laboratorieresultater uafhængigt af den pågældende årsag eller af eventuelle sygdomme.
- 10 Desuden er der tilstrækkelig indikation af, at silibinin også ved kronisk-inflamatoriske leversygdomme og leverzirrrose fremkalder væsentlige forbedringer. Man har eksempelvis behandlet patienter med leverzirrrose ved et langtidsforsøg med et randomiseret dobbeltblindforsøg, ved hvilket silibinin afprøves mod et placebopræparat. 15 Kriteriet for bedømmelsen af det terapeutiske resultat var først og fremmest overlevelsestiden. Her viste silibinin en tydelig overlegenhed i forhold til behandlingen med placebopræparatet.
- 20 Virkningssammenligning mellem silibinin og isosilybin og silybin (silibinin/isosilybinblanding) ved forsøget med phalloidin- og praseodymintoksikation hos mus efter intravenøs indgift.
- Den antihepatotoksiske virkning af silibinin, isosilybin og silybin som N-methylglucaminsalte undersøges i doser på 50 og 100 mg/kg, beregnet på silibinin, ved forsøgsmodellen med phalloidin- og praseodymforgiftning af mus efter intravenøs indgift. Indgivelsen af forsøgsforbindelsen foretages 1 time inden indgivelsen af phalloidin 25 eller 1 time før og 6 timer, 24 timer og 48 timer efter indgivelsen af praseodym. Ved phalloidinforgiftningen bedømmes overlevelsesraten, og ved praseodymforgiftningen bedømmes forskellige serum- og leverparametre 72 timer 30 efter intoksikationen.

Ved phalloidin-intoksikationen udgør overlevelsesraten efter silibinin i begge doser 100%, med de øvrige stoffer opnås der ikke en overlevelsesrate på over 40% i forhold til
5 de ubehandlede, beskadigede kontroldyr.

Isosilybin viste sig i sammenhæng med praseodym-intoksikationen som uforenelig, således at dosen på 100 mg/kg måtte opdeles i to deldoser.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til isolering af isosilybinfrit silibinin med formlen



- 5 fra den råsilymarin, der opnås ved at størsteparten af den fede olie fjernes fra tørrede frugter af *Silybum marianum* L. Gaertn. ved oplukning af cellerne i frugterne under anvendelse af højt mekanisk tryk, hvorpå presseresten med et restolieindhold på 5-10% ekstraheres fuldstændigt med ethylacetat, ethyl-
- 10 acetatet afdampes, den fremkomne tørre remanens opløses i en mængde på 2 vægtprocent i den af methanol og vand bestående underfase af en ternær opløsningsmiddelblanding af 95 vægtdele methanol, 5 vægtdele vand og 100 vægtdele petroleumsether (kogeinterval 40-60°), hvorpå fnugagtige
- 15 partikler af fast stof fjernes ved klarcentrifugering og den tørre remanens underkastes den multiplikative, ensartede fordeling i modstrøm i dette opløsningsmiddel-system, hvorved det totale strømningsvolumenforhold mellem overfase og underfase er 1:1, hvorpå en 70-80%'s
- 20 polyhydroxyphenylchromanonblanding (råsilymarin) isoleres som et brunligt pulver fra den bortstrømmende underfase ved inddampning i vakuum til tørhed, kendetegnet ved, at
- a) en vægtdel af det dannede brunlige pulver suspenderes i 0,7-1,5 vægtdele vandmættet ethylacetat,
- 25 den dannede suspension henstår i 1-2 dage, hvorpå bundfaldet frasuges,
- b) det dannede bundfald vaskes med 0,07-0,15 vægtdele koldt vandmættet ethylacetat og tørres ved 30-50°C i vakuum,

- c) det fremkomne produkt opløses i 30-50 vægtdele vandfrit ethylacetat under opvarmning til kogning, hvorpå der behandles med 0,2-0,4 vægtdele aktivt kul under opvarmning til kogning med tilbagesvaling i
5 2 timer, blandingen filtreres, og filtratet indampes ved 30-50°C i vakuum til 1/12 af rumfanget af det til opløsningen anvendte opløsningsmiddel,
- d) 0,5-0,8 vægtdele vandmættet ethylacetat sættes til koncentratet, og det udfældede silibinin frafiltreres efter 5-10 timer, hvorpå
10
- e) silibininet suspenderes en eller to gange i 0,9-1,8 vægtdele teknisk ethylacetat pr. gang, og suspensionen filtreres, produktet fortørres i vakuum ved 30-50°C, det fortørrede produkt formales og tørres på
15 ny ved 30-50°C i vakuum,
idet alle vægtdele er beregnet på vægten af det brunlige pulver.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at
- a) en vægt del af det brunlige pulver suspenderes
20 i 0,9 vægtdele vandmættet ethylacetat, suspensionen henstår i 48 timer ved stuetemperatur, og det dannede bundfald frasuges,
- b) bundfaldet vaskes med 0,09 vægtdele koldt vandmættet ethylacetat og tørres i 48 timer ved 40°C i vakuum,
- 25 c) det dannede produkt opløses i 36 vægtdele vandfrit ethylacetat under opvarmning til kogning, der tilsættes 0,36 vægtdele aktivt kul og opvarmes i 2 timer til kogning med tilbagesvaling, blandingen filtreres, og filtratet indampes ved 50°C i vakuum til 1/12 af rumfanget af det til opløsningen anvendte opløsningsmiddel,
30
- d) til koncentratet sættes ved stuetemperatur 0,6 vægtdele vandmættet ethylacetat, blandingen henstår i 10 timer ved stuetemperatur, og det udfældede produkt frafiltreres, hvorpå
- 35 e) produktet suspenderes to gange i 1,8 vægtdele teknisk ethylacetat pr. gang og filtreres, produktet fortørres i 24 timer ved 40°C i vakuum, hvorpå det formales og eftertørres i 48 timer ved 40°C i vakuum.