



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 21.V.1963 (P 101 642)

Pierwszeństwo: 24.V.1962 Szwajcaria

Opublikowano: 15.XII.1965

Kl. 30h, 2/03

MKP A 61 k

UKD

27/14

Współtwórcy wynalazku: dr Jany Renz, dr Albert von Wartburg, dr
Emil Angliker, dr Hans Emmenegger

Właściciel patentu: Sandoz A. G., Bazyleja (Szwajcaria)

Sposób otrzymywania nowego środka leczniczego

1

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania nowych cytostatycznych preparatów przez reakcję surowego ekstraktu z kłączy Podophyllum ze związkami karbonyłowymi.

Widomo już było, że na przykład podofilotoksyna, 4'-demetylopodofilotoksyna, α -peltatyna i β -peltatyna, związki, które znajdują się w nierozpuszczalnych w wodzie frakcjach żywicznych kłączy Podophyllum wykazują działanie antymitotyczne, jednakże ze względu na wysoką toksyczność tych związków, ich zastosowanie lecznicze jest niemożliwe. Glikozydy wyżej wymienionych związków odznaczają się wprawdzie mniejszą toksycznością i wyższą rozpuszczalnością w wodzie przy niezmiennym działaniu cytostatycznym, jednakże te glikozydy bardzo łatwo ulegają ponownemu rozszczepieniu na glikozę i odpowiedni wysokotoksyczny aglikon.

Stosowanie glikozydów jako leków doustnych nie stanowi jednak postępu ze względu na aglikony, które uwalniają się z glikozydów działaniem enzymów trawiennych. Dalej stwierdzono, że przez blokowanie części wolnych grup hydroksylowych reszty cukrowej za pomocą związków karbonylowych zapobiega się enzymatycznemu rozszczepianiu glikozydów w organizmie, dzięki czemu ich toksyczność silnie spada, bez utraty wartościowych własności antymitotycznych materiału wyjściowego.

Sposób ten posiada jednakże wielką wadę, mianowicie czyste glikozydy Podophyllum otrzymuje

2

się jedynie za pomocą trudnych i kosztownych metod oczyszczania i rozdziału, a przez to również produkty kondensacji tych glikozydów ze związkami karbonyłowymi są dostępne jedynie w małych ilościach i po stosunkowo bardzo wysokiej cenie.

Obecnie stwierdzono niespodziewanie, że produkty reakcji surowego ekstraktu z kłączy Podophyllum ze związkami karbonyłowymi wykazują znacznie silniejsze działanie cytostatyczne niż produkty kondensacji czystych glikozydów ze związkami karbonyłowymi. Jakkolwiek toksyczność nowego produktu jest praktycznie taka sama jak czystych produktów kondensacji, jednak wykazuje on znacznie szerszy wskaźnik terapeutyczny i dzięki temu jest też bardziej odpowiedni do leczenia złośliwych guzów. W niżej podanych tablicach porównano działanie cytostatyczne produktu kondensacji otrzymanego według przykładu III z surowego ekstraktu Podophyllum emodi z benzaldehydem (zwanym „SPG 827”) oraz czystego benzylideno- β -D-glikozydu podofilotoksyny.

A) Działanie cytostatyczne in vitro

Preparat	DE-50
SPG 827	0,5 g/ml
Benzylideno- β -D-glikozyd podofilotoksyny	3,5 g/ml

DE 50 = dawka, która hamuje rozmnażanie się komórek mastocytów P-815 in vitro o 50%.

W kulturze embrionalnych kurzych fibroblastów potrzeba około 7 razy więcej benzylideno- β -D-glikozydu podofilotoksyny niż SPG 827 dla osiągnięcia całkowitego zatrzymania mitozy.

B) Toksyczność (myszy, ostre doświadczenie)

Preparat	DL—50
SPG 827	220 mg/kg i. v. 680 mg/kg p. o.
Benzylideno- β -D-glikozyd-podofilotoksyny	250 mg/kg i. v. 760 mg/kg p. o.

C) Hamowanie wzrostu guza Ehrlicha (guza Ascites)

Dawkowanie: 2 razy dziennie i. p., ogółem 16 iniekcji. Następnie oznacza się całkowitą liczbę komórek guza w jamie brzusznej i porównuje się z nieleczonymi myszami kontrolnymi.

Dawka (mg/kg)	% zahamowania wzrostu guza	
	SPG 827	Benzylideno- β -D-glikozyd-podofilotoksyny
2	92	0
5	100	0
10	100	0
20	100	7
40	100	47

Otrzymany zgodnie z wynalazkiem preparat nadaje się dlatego do leczenia złośliwych guzów, jak Carcinoma (rak), Sarkoma (mięsak), Condyloma acuminatum i innych. Mogą być one stosowane tak zewnętrznie jak również doustnie, same lub pod postacią odpowiednich leków do wewnętrznego i zewnętrznego stosowania. W celu otrzymania odpowiedniej postaci leku, nowe preparaty przeobraża się z odpowiednimi nieorganicznymi lub organicznymi, farmakologicznie obojętnymi substancjami pomocniczymi. Jako substancje pomocnicze można wymienić na przykład przy sporządzaniu tabletek i drażetek: cukier mleczny, skrobia, talk, kwas, stearynowy itd., a przy sporządzaniu czopków: naturalne lub utwardzone oleje i woski i inne.

Prócz tego, leki mogą zawierać odpowiednie środki konserwujące, zwilżające, ułatwiające rozpuszczanie, substancje słodzące i barwiące, substancje zapachowe itd.

Bardzo skuteczne okazuje się stosowanie SPG 827 w leczeniu doustnym w postaci kapsułek 10—50 mg-owych, przy czym dawka dzienna powinna wynosić 150—500 mg SPG 827. Dla pacjentów, którzy nie mogą przełykać kapsułek lub do lokalnych aplikacji w przypadku guzów, które są dostępne na zewnątrz, bardziej wskazane jest stosowanie roztworu, który zawiera 100 mg SPG 827 w ml.

Sposób według wynalazku wykazuje tę zaletę w porównaniu do dotychczasowych, że jest znacznie łatwiejszy i tańszy. Wystarczy wysuszyć, zmielony materiał wyekstrahować niższym alkoholem, ten wyciąg rozcieńczyć wodą, następnie wytrącić ewentualnie obecną taninę za pomocą octanu ołowiu i przez przemywanie chlorowanym węglowodorem

uwolnić od niepożądanych ciał towarzyszących, między innymi od aglikonów, żywic i substancji tłuszczowych. Zawarte w wodnoalkoholowym roztworze substancje przeprowadza się następnie bez dalszego oczyszczania do fazy organicznej przez wytrącanie z odpowiednim rozpuszczalnikiem lub mieszaniną rozpuszczalników i bezpośrednio poddaje kondensacji ze związkami karbonyłowymi.

Przy tym sposobie postępowania odpada zarówno ekstrakcja materiału roślinnego węglowodorem chlorowanym jak i uciążliwe uzyskiwanie i wydzielanie poszczególnych czystych glikozydów. Do wyimywania niepożądanych substancji towarzyszących stosuje się najlepiej dwuchloroetan a jako rozpuszczalnik, dla przeprowadzania glikozydów Podophyllum do fazy organicznej, np. mieszaninę chloroformu i butanolu. Stosowany do kondensacji surowy ekstrakt może być otrzymywany z dowolnego rodzaju kłączy Podophyllum np. z Podophyllum peltatum lub Podophyllum emodi, a jako związek karbonylowy można stosować dowolne alifatyczne, aromatyczne lub heterocykliczne ketony lub aldehydy. Jak okazało się szczególnie odpowiedni jest benzaldehyd.

Następujące przykłady wyjaśniają sposób według wynalazku nie ograniczając go jednak.

Przykład I. Wysuszone kłącza Podophyllum emodi o zawartości glikozydu 2% miele się drobno i w zwykłej temperaturze ekstrahuje wyczerpująco metanolem. Połączone ekstrakty zagęszcza się do około $\frac{1}{3}$ objętości, dodaje połowę ilości wody i wytrząsa z dwuchloroetanem. Ten roztwór dwuchloroetanowy, który korzystnie przemywa się jeszcze raz wodą zawiera glikony, żywice, substancje tłuszczowe i substancje towarzyszące. Roztwór wodnoetanolowy łączy się z wodą z przepłukiwaniem frakcji dwuchloroetanowej i wytrząsa z mieszaniną chloroformu i butanolu w stosunku 4:1.

Połączone wyciągi chloroformobutanolowe odparowuje się, pozostałość rozpuszcza w 3 częściach benzaldehydu i roztwór miesza w ciągu 2 godzin w temperaturze pokojowej z 2 częściami chlorku cynku. Następnie całość rozcieńcza się z równą ilością wody i produkt kondensacji wytrząsa z chloroformem. Przez wtryskiwanie stężonego roztworu chloroformowego do benzyny i wymycie otrzymanego osadu benzyną, otrzymuje się produkt kondensacji wolny od benzaldehydu i kwasu benzoowego. W celu osiągnięcia szczególnie małej zawartości aglikonu powtarza się to wytrącanie kilkakrotnie.

W ten sposób otrzymuje się produkt o następującym składzie:

Frakcja aglikonowa	0,5 %
frakcja żywiczna	3,5 %
podofilotoksynobenzylideno- β -D-glikozyd	57 %
4'-demetylopodofilotoksynobenzylideno- β -D-glikozyd	2 %
nie przereagowane glikozydy	3 %
nieznane substancje towarzyszące	34 %

Przykład II. W analogiczny sposób jak w przykładzie I otrzymuje się z wysuszonych kłączy Podophyllum peltatum o zawartości glikozydu 0,5% produkt o następującym składzie:

Fracja aglikonowa	0,5 %
frakcja żywiczna	6,5 %
podofilotoksynobenzylideno- β-D-glikozyd	18 %
β-peltatynobenzylideno-β-D-glikozyd	13 %
α-peltatynobenzylideno-β-D-glikozyd	8 %
4'-demetylopodofilotoksyno- benzylideno-β-D-glikozyd	10 %
nie przereagowane glikozydy	5 %
nieznane substancje towarzyszące	30 %
Przykład III. Ekstrakcję wysuszonych kłączy Podophyllum emodi o zawartości glikozydu 2% i kondensację z benzaldehydem przeprowadza się analogicznie jak w przykładzie I, jednakże wodny roztwór ekstraktu metanolowego przed przemyciem dwuchloroetanem uwalnia się od taniny za pomocą roztworu octanu ołowiu. W ten sposób otrzymuje się produkt kondensacji o następującym składzie:	
Fracja aglikonowa	0,5 %
frakcja żywiczna	3,5 %
podofilotoksynobenzylideno- β-D-glikozyd	75 %
4'-demetylopodofilotoksyno- benzylideno-β-D-glikozyd	7 %
nie przereagowane glikozydy	3 %
nieznane substancje	11 %
Przykład IV. W sposób analogiczny jak w przykładzie III otrzymuje się z wysuszonych kłączy Podophyllum peltatum o zawartości glikozydu 0,5% produkt o następującym składzie:	
Fracja aglikonowa	0,5 %
frakcja żywiczna	6,5 %
podofilotoksynobenzylideno- β-D-glikozyd	50 %
β-peltatynobenzylideno-β-D-glikozyd	15 %
4'-demetylopodofilotoksyno- benzylideno-β-D-glikozyd	15 %
α-peltatynobenzylideno-β-D-glikozyd	6 %
nie przereagowane glikozydy	3 %
nieznane substancje towarzyszące	7 %
Przytoczone w wyżej podanych przykładach za-	

wartości procentowe mogą wahać się w dość znacznych granicach w zależności od pochodzenia materiału roślinnego.

5 Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nowego środka leczniczego z roślin Podophyllum, **znamienny tym**, że cytostatycznie aktywny surowy ekstrakt z kłączy Podophyllum zawierający mieszaninę glikozydów, uwolniony od niepożądanych substancji towarzyszących poddaje się reakcji ze związkami karbonyłowymi.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że kłącza Podophyllum ekstrahuje się mieszając się z wodą alkoholem, następnie ekstrakt rozcieńcza się wodą i ewentualnie zadaje octanem ołowiu w celu wytrącenia taniny, po czym niepożądane substancje towarzyszące oddziela przez przemycanie wodnoalkoholowego roztworu chlorowanym węglowodorem a pozostałe w roztworze wodnoalkoholowym substancje cytostatycznie aktywne ekstrahuje odpowiednim rozpuszczalnikiem na przykład mieszaniną chloroformu i butanolu i kondensuje ze związkiem karbonylowym.
3. Sposób otrzymywania nowego środka leczniczego z rośliny Podophyllum, **znamienny tym**, że kłącza Podophyllum ekstrahuje się mieszając się z wodą alkoholem, ekstrakt rozcieńcza się wodą, obecną taninę oddziela przez wytrącenie octanem ołowiu a inne niepożądane substancje towarzyszące oddziela się przez przemycanie wodnoalkoholowego roztworu chlorowanym węglowodorem a pozostałe w roztworze wodnoalkoholowym, cytostatycznie aktywne substancje Podophyllum ekstrahuje i następnie kondensuje ze związkiem karbonylowym.
4. Sposób według zastrz. 1 i 3, **znamienny tym**, że jako związek karbonylowy stosuje się benzaldehyd.