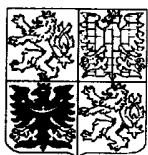


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 657

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1996 - 1718**

(22) Přihlášeno: **12.06.1996**

(40) Zveřejněno: **17.12.1997**

(Věstník č. 12/1997)

(47) Uděleno: **08.11.2000**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17.01.2001**

(Věstník č. 1/2001)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 319/16

C 07 D 311/28

A 61 K 31/35

A 61 K 31/357

A 61 P 1/16

(73) Majitel patentu:

Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha 4, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Křen Vladimír Ing. CSc., Praha 7, CZ;

Cvak Ladislav Ing., Opava, CZ;

Šimánek Vilém Prof.MUDr.RNDr.DrSc., Olomouc, CZ;

Ulrichová Jitka DrSc., Olomouc, CZ;

Sedmera Petr Ing. CSc., Praha 4, CZ;

Stuchlík Josef Ing., Hrabyně č.121, CZ;

(74) Zástupce:

Patentové a licenční služby KAV ČR, třída

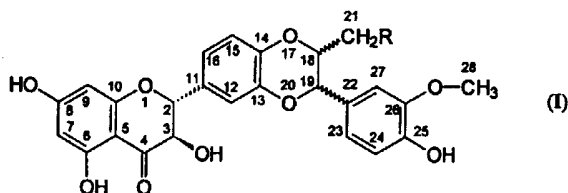
Politických vězňů 7, Praha 1, 11121;

(54) Název vynálezu:

Glykosidy silybininu a způsob jejich výroby

(57) Anotace:

Glykosidy silybininu obecného vzorce I, kde R znamená molekulu hexózy, vázanou β -glykosidickou vazbou, a obecná konfigurace na atomech uhlíku C₁₈ a C₁₉ znamená, že se jedná o směs diastereomerů tak, jako je tomu u přírodního silybininu. Připraví se tak, že se nechá reagovat silybinin s peracetylovanou hexózou v přítomnosti Lewisových kyselin a vzniklý peracetylovaný glykosid silybininu se potom deacetyluje.

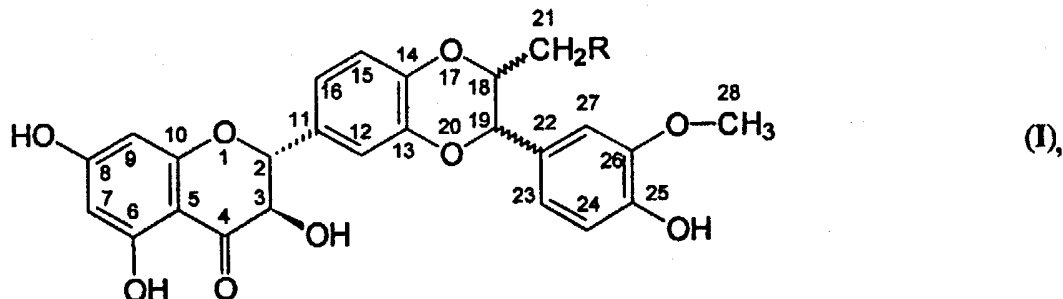


CZ 287657 B6

Glykosidy silybininu a způsob jejich výroby

Oblast techniky

Vynález se týká glykosidů silybininu obecného vzorce I,



kde R znamená molekulu hexózy, vázanou β -glykosidickou vazbou, a obecná konfigurace na atomech uhlíku C_{18} a C_{19} znamená, že se jedná o směs diastereoizomerů, tak jako je tomu u přírodního silybininu, způsobu jejich výroby a použití jako aktivních komponent hepatoprotektivních přípravků.

Dosavadní stav techniky

Látky obecného vzorce I jsou nové a nebyly dosud nikde popsány. Jsou odvozeny od přírodního flavonolignanů silybininu, který je směsí dvou diastereoizomerů – silybininu A a silybininu B, jejichž absolutní konfigurace na uhlících C_{18} a C_{19} není známá, relativní konfigurace na těchto atomech uhlíku je vždy *trans*.

Silybinin je hlavní obsahová látka ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Spolu se svými izomery sumárního vzorce $C_{25}H_{12}O_{10}$ silidianinem, silychristinem a izosilybininem je součástí komplexu silymarinu, který se používá k léčbě jaterního poškození a jako hepatoprotektivum (např. Legalon, Flavobion aj.). Chemie, farmakologie, jakož i terapeutické využití silymarinu a jeho komponent je důkladně popsáno v literatuře (Morazzoni P., Bombardeli E.: *Silybum marianum* (Carduus marianus). Fitoterapia, 1995, 3–42) a odkazech v této práci uvedených.

Účinnost silymarinu je omezena jeho nízkou biologickou dostupností, která souvisí s nízkou rozpustností silymarinu ve vodě. Nízká biologická dostupnost silymarinu je ještě nižší přechodem od směsného silymarinu k chemickému individuu, například silybininu, který je jeho hlavní součástí. Přitom přechod od standardizovaného extraktu k chemickému individuu je žádoucí a odpovídá současnému trendu ve farmakoterapii. Tento problém se snaží vyřešit pracovníci firmy Madaus AG, Köln, SRN, přípravou bishemisukcinátu silybininu (DE 34 42 639), který však není příliš stabilní a proto se využívá pouze pro přípravu injekcí v lyofilizované formě. Jiný pokud jak obejít nízkou biologickou dostupnost silybininu je přípravou komplexu s fosfatidylcholinem (Malandrino S., Pifferi G.: IdB 1016. Drugs of the Future, 15, 226 (1990), který pod názvem Silipide (EP 209 038) je v současné době klinicky zkoušen. Další patent (EP 422 497) zlepšuje biologickou dostupnost silybininu přípravou komplexu s cyklodextriny.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou glykosidy silybininu obecného vzorce I, jakož i způsob jejich přípravy a využití.

Způsob podle vynálezu řeší nízkou biologickou dostupnost silybininu přípravou jeho glykosidů obecného vzorce I. Vzhledem k tomu, že přírodní silybinin je směsí diastereoizomerních látek – silybininu A a silybininu B, jsou i látky podle vynálezu směsí diastereoizomerů. Konkrétně byly

5
10 Obě připravené látky mají podstatně vyšší rozpustnost ve vodě oproti silybininu:

silybinin 430 mg/l,
β-D-galaktopyranosi silybininu 1700 mg/l,
β-D-glukopyranosid silybininu 13 000 mg/l.

15 Glykosidy silybininu podle vynálezu lze ve vysokém výtěžku připravit reakcí silybininu s 1,1 až 1,5 ekvivalenty peracetylované hexózy za katalýzy Lewisovými kyselinami.

20 Jako rozpouštědlo je možno použít středně polární nebo polární aprotická rozpouštědla, jako dichlormethan, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, acetonitril, nitromethan, tetrahydrofuran nebo jejich směsi. Po ukončení reakce, která se provádí s výhodou při teplotách –20 až +60 °C se vzniklý peracetylový derivát deacetyluje s výhodou směsí triethylamin–methanol–voda a je možné ho přecistit s výhodou sloupcovou chromatografií na silikagelu.

25 Nově připravené glykosidy podle vynálezu mají lepší hepatoprotektivní účinek nežli výchozí silybinin při stejné nebo nižší toxicitě. Příklad účinků je uveden v tabulce.

Tabulka

30 Protektivní účinky silybinin glukosidu, silybinin galaktosidu a silybininu proti intoxikaci izolovaných potkaních hepatocytů chloridem uhlíčitým (CCl₄) a *terc.*-butylhydroperoxidem (*t*-BH), určené na základě aktivity laktátdehydrogenázy (LDH).

	LDH (nkat/10 ⁶ buněk)			
	CCl ₄	Rel. zvýšení účinku [%]	<i>t</i> -BH	Rel. zvýšení účinku [%]
Kontrola	38,8 ± 3,2	–	35,2 ± 1,6	–
Toxin	145,5 ± 4,4	–	132,4 ± 4,9	–
Silybinin	131,7 ± 4,5 ^a	100	117,9 ± 5,1 ^a	100
Silybin β-glukosid	116,5 ± 5,6 ^b	113	108,2 ± 4,1 ^b	109
Silybin β-galaktosid	112,4 ± 7,2 ^b	117	105,3 ± 6,2 ^b	112

35 Koncentrace toxinů – CCl₄ 10 mmol/l, *t*-BH 0,8 mmol/l

^ap < 0,05, ^bp < 0,01; hodnoty jsou průměrem z pěti měření ± st. odchylka, nkat – znamená jednotku katalytické aktivity (nanokataly).

40 Zvýšený účinek lze připsat buď lepší biologické dostupnosti nebo vyšší vazebné afinitě k receptorovým glykoproteinům hepatocytů. Připravené glykosidy jsou využitelné jako aktivní komponenty v hepatoprotektivních přípravcích s indikací pro léčbu alkoholické cirhózy, chronické hepatitidy, dietních steatóz jater a dalších.

Příklady provedení vynálezu

Příklad

5

1 ekvivalent silybininu a 1,3 ekvivalent peracetylovaného cukru (D-glukóza, D-galaktóza) se přelije nejméně 10 násobným váhovým množstvím toluenu a tento se destiluje, až neodchází zakalený destilát. Zbytek toluenu se odpaří na rotační odparce. Tato operace je klíčová pro odstranění vlhkosti, vázané (pravděpodobně krystalově) v silybininu. Pak se přidá směs dichlormethanu a acetonitrilu s výhodou v poměru 1:1 a zahřeje se pod zpět. chladičem, až se vše rozpustí. Směs se ochladí na teplotu cca 20 °C a přidají se za míchání 3 ekvivalenty BF₃.etherátu. Po 15 až 20 min, kdy reakce proběhne téměř kvantitativně, se zastaví vlitím do ledové vody, vytřepe se 3x chloroformem nebo dichlormethanem a spojené organické fáze se dále vytřepou nasyceným roztokem hydrouhličitany sodného, vodou a vysuší s výhodou, např. síranem sodným, a organická rozpouštědla se odpaří.

Reakční směs (peracetylované glykosidy silymarinu) se deacetyluje s výhodou směsí triethylamin : voda : methanol = 1 : 1 : 8, (24 hod., 24 °C). Deacetylační směs se po proběhlé reakci beze zbytku odpaří a výsledné glykosidy je možno ještě dále přechistit chromatografií. Dle HPLC se výtěžky monoglykosidu pohybují mezi 85 až 95 % na vnesený silybin a nevznikají téměř žádné vedlejší produkty.

Struktura připravených glykosidů silybininu byla potvrzena pomocí nukleární magnetické rezonance (¹H a ¹³C NMR) a dále pomocí hmotové spektrometrie (FAB MS, EI MS). Fyzikální hodnoty připraveného glykosidu uvádějí tabulky 1 až 3.

Tato metoda je rychlá, bezpečná, poskytuje čisté produkty v dobrém výtěžku a používá levné reaktanty. Je vhodná i pro průmyslovou výrobu.

30

Průmyslová využitelnost

Glykosidy silybinu podle vynálezu se uplatní ve farmacii zejména jako hepatoprotektiva, při léčení poškození jater různé etiologie, intoxikací průmyslovými jedy, otravami mykotoxinu a při léčbě popálenin.

40

Tabulka 1 ¹H NMR Data (399,95 MHz, 25 °C, CD₃OD), chemické posuny [ppm], multiplicita, coupling konstanty [Hz] (kurzívou)

Atom	Silybin-β-glukosid	Silybin-β-galaktosid
2	4,996 d 11,5	4,994 d 11,4
3	4,525 d 11,5	4,482 d 11,4
6	5,908 d 2,1	5,819 d 2,1
8	5,941 d 2,1	5,848 d 2,1
10	4,290 ddd 7,8; 4,7; 2,6	4,225 m
11	5,066 d 7,8	5,156 d 8,0

Tabulka 1 - pokračování

Atom	Silybin- β -glukosid	Silybin- β -galaktosid
13	7,120 d 2,0	7,141 d 2,0
15	7,060 dd 8,3; 2,0	7,060 dd 8,3; 2,0
16	6,991 d 8,3	6,958 d 8,3
18	7,071 d 2,0	7,117 d 2,0
21	6,848 d 8,1	6,856 d 8,2
22	6,968 dd 8,1; 2,0	6,994 dd 8,2; 2,0
23u	3,908 dd 11,7; 4,7	3,897 dd <i>n.d.</i> ^c
23d	3,506 dd 11,7; 2,6	3,716 dd <i>n.d.</i>
19-OMe	3,889 s	3,889 s

- 5 Tabulka 2 ¹H NMR (viz tabulka 1) Chemické posuny [ppm], coupling konstanty [Hz] (kurzívou) cukerných zbytků glykosidů silybinu

látko	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'u	H-6'd
Silybin- β -glukosid	4,311 d 7,7	3,245 dd 9,1; 7,7	3,300 dd 9,1; 8,6	3,362 dd 8,6; 8,5	3,260 m	3,662 dd 11,9; 5,6	3,858 dd 11,9; 2,3
Silybin- β -galaktosid	4,144 d 7,7	3,613 dd 9,8; 7,7	3,477 dd 9,8; 3,3	3,838 dd 3,3; 1,0	3,415 dt 1,0; 6,5	3,719 d 6,5	3,719 d 6,5

- 10 Tabulka 3 ¹³C NMR data (CD₃OD): chemické posuny [ppm]

Atom	Silybin- β -glukosid	Silybin- β -galaktosid
2	84,91	84,85
3	73,96	73,86
4	198,47	197,27
4a	102,04	101,05
5	164,66	164,56
6	97,77	97,86
7	169,31	165,65
8	96,72	97,86
8a	165,61	165,60
10	79,15	79,22
11	78,28	77,50
12a	145,33	145,40
13	117,99	117,82
14	131,99	132,07
15	122,39	122,53
16	118,14	117,05
16a	145,43	145,61

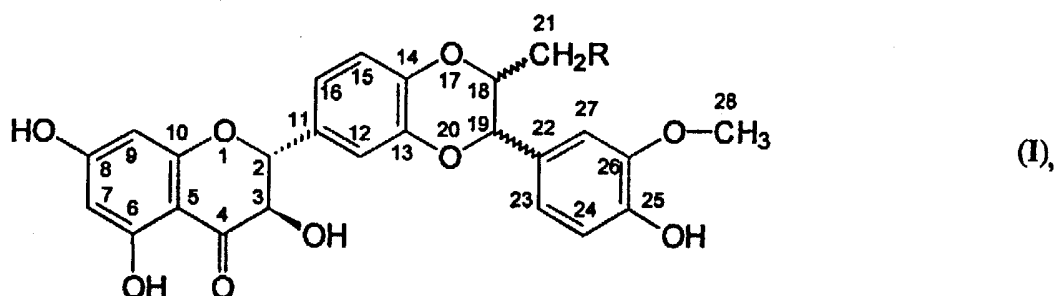
Tabulka 3 - pokračování

Atom	Silybin- β -glukosid	Silybin- β -galaktosid
23	69,49	69,58
17	129,63	129,81
18	112,64	112,84
19	149,38	149,40
20	148,56	148,51
21	116,50	116,62
22	122,11	121,91
19-OMe	56,85	57,00
1'	104,95	105,83
2'	75,52	72,85
3'	77,70	75,22
4'	71,95	70,57
5'	78,31	76,91
6'	63,06	62,67

5

PATENTOVÉ NÁROKY

- 10 1. Glykosidy silybininu obecného vzorce I



kde R znamená molekulu hexózy, vázanou β -glykosidickou vazbou.

15

2. Glykosid silybininu obecného vzorce I podle nároku 1, kterým je silybinin 21- β -D-glukopyranosid.
3. Glykosid silybininu obecného vzorce I podle nároku 1, kterým je silybinin 21- β -D-galaktopyranosid.
4. Glykosidy silybininu podle nároků 1 až 3 k použití jako hepatoprotektivní přípravky.
5. Způsob přípravy glykosidů silybininu obecného vzorce I podle nároku 1, vyznačující se tím, že se nechá reagovat silybinin s peracetylovanou hexózou v přítomnosti Lewisových kyselin a vzniklý peracetylovaný glykosid silybininu se potom deacetyluje.

25

Konec dokumentu

30