



265371

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE GLUCOSIDOS CAR-
DIOACTIVOS", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE
& CIE SOCIETE ANONYME, domiciliada en BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento para
obtener glucósidos cardioactivos de la Digitalis canarien-
sis L. var. isabelliana (Webb) Lindinger, que en lo que
sigue se designará simplemente por Digitalis isabelliana.

5. Más particularmente, se refiere a un procedimiento para
obtener extractos brutos que contienen los glucósidos prin-
cipales de esta planta y para aislar de dichos extractos
brutos dos glucósidos de uzarigenina desconocidos hasta
ahora.

10. El procedimiento a que se refiere este invento com-



265371

prende el extraer hojas de *Digitalis isabelliana* con agua y alcohol acuoso, el precipitar los materiales de lastre de la solución alcohólica acuosa, el extraer la solución alcohólica acuosa así purificada, sucesivamente, con éter, cloro-

5. formo y una mezcla de cloroformo y alcohol compuesta de una parte en volumen de alcohol y cuatro partes en volumen de cloroformo, el aislar los materiales activos que han pasado a la mezcla de cloroformo y alcohol y (si se desea) el aislar del extracto bruto así obtenido, que contiene glucósidos de uzarigenina y glucósidos de digitoxigenina, los dos nuevos glucósidos de uzarigenina en forma de cristales mixtos de los mismos.
- 10.

La *Digitalis isabelliana* (sinónimo: *Callianassa isabelliana*) empleada como material de partida es una clase de *Digitalis* de actividad excepcionalmente elevada, indígena de la isla de Gran Canaria. En efecto, determinando la toxicidad según el método de Hatcher-Magnus, se ha comprobado que un extracto frío de las hojas de *Digitalis isabelliana* es considerablemente más tóxico que los extractos correspondientes de la *Digitalis purpurea* y la *Digitalis lanata*.

15.

Ahora se ha descubierto que la actividad insólitamente elevada de la *Digitalis isabelliana* se debe, por una parte, a un contenido de glucósido superior al promedio y, de otra parte, a la presencia de glucósidos cardioactivos desconocidos anteriormente. La máxima actividad de los diversos extractos obtenidos por el procedimiento de este invento la presenta un extracto de cloroformo y alcohol 4:1 (véase antes). En dicho extracto se hallan los principales glucósidos de la planta. Después de eliminar los disolventes, el material activo se obtiene en forma de un polvo amorfo, de

20.

25.

30.



color pardo verdusco. El extracto bruto contiene, según puede demostrarse por cromatografía de papel, por lo menos cinco componentes dotados de reacción Kedde positiva (reacción de color azul violado con ácido dinitrobenzónico y álcali, característica de los compuestos del tipo cardenolida).

5.

Además se ha descubierto que en el extracto bruto predominan dos glucósidos. Estos se designan aquí como glucósidos A y glucósido B. Los dos glucósidos en cuestión pueden obtenerse del extracto bruto en forma de cristales mixtos, acuosolubles, dotados de un punto de fusión de 270-276° aproximadamente. Se ha comprobado que los glucósidos A y B contienen uzarigenina en calidad de aglicona.

10.

La dosis letal de los cristales mixtos mencionados (determinada según Hatcher-Magnus en gatos por administración intravenosa) es de 0,45 ± 0,05 mg/kg, o sea que resulta considerablemente inferior a la dosis letal de los glucósidos de uzarigenina mencionados en la literatura, por ejemplo la odorisida B, la uzarin o la quirosida A.

15.

Por acción de la enzima estrofantobiasa, disgregadora de glucosa, puede disociarse glucosa de los glucósidos A y B (obtenidos como cristales mixtos) después de lo cual se obtienen dos monósidos de uzarigenina, que a continuación se designarán como desgluco-glucósido A y desgluco-glucósido B; estos últimos pueden separarse uno de otro y obtenerse en forma cristalina.

20.

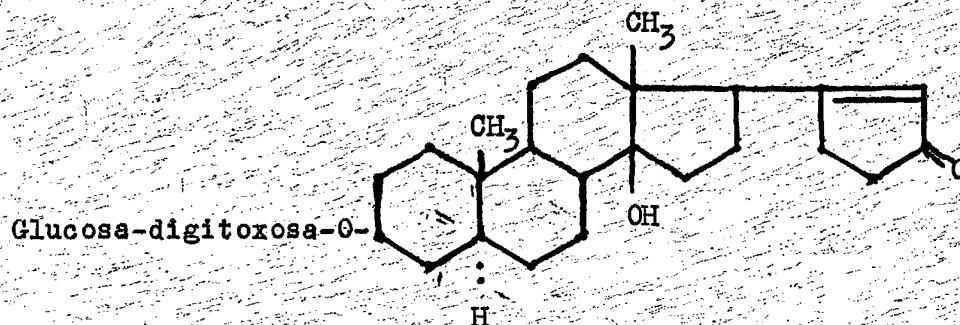
25.

<u>Desgluco-glucósido A</u>	<u>Desgluco-glucósido B</u>
Punto de fusión: 241-244°	241-244°
$[\alpha]_D^{20}$ -29,2 ± 2°	-17,2 ± 2°
(c=1,12 en metanol)	(c=1,09 en metanol)
Valor R _f : 0,55 (en sistema cloroformo/formamida)	0,74 (en sistema cloroformo/formamida)

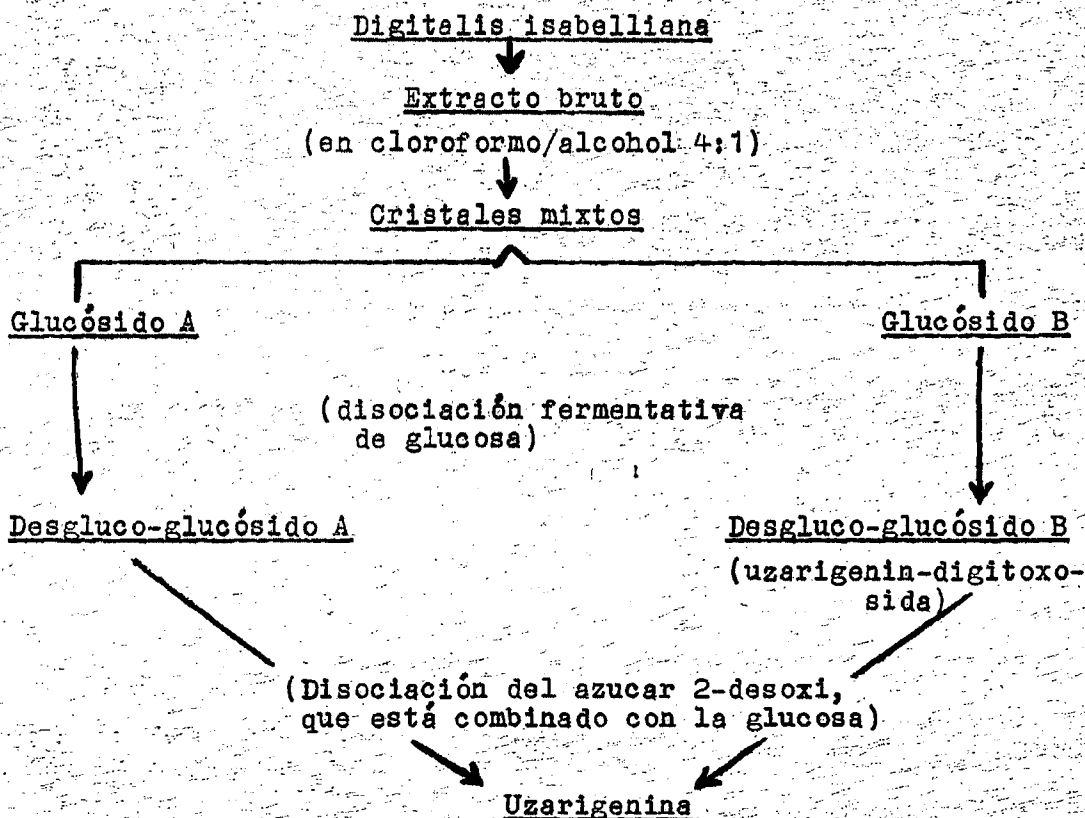


Después de hidrólisis, estos dos monósidos pueden disociarse en la aglucona uzarigenina y el azúcar 2-desoxi, que todavía permanece unido a la aglucona después de la fermentación precedente. Este azúcar desoxi es D-(+)-digitoxosa en el caso del desgluco-glucósido B.

En consecuencia, se atribuye al glucósido B la fórmula siguiente



El procedimiento para obtener extractos brutos y cristales mixtos que enseña el invento aquí expuesto, así como las reacciones de degradación que aquí se revelan, pueden ilustrarse esquemáticamente de la manera siguiente;





235571

En las aguas madres que quedan después de aislar del extracto bruto los cristales mixtos, pueden hallarse, además de cantidades residuales de los dos glucósidos A y B, glucósidos de digitoxigenina adicionales. Así, por acción de estrofantobiasa, se hallan los siguientes monósidos adicionales:

5.

	Punto de fusión	$[\alpha]_D^{20}$
Digitoxigenin-digitoxosida (Ervatromonósido)	210-213°	-15,0° (metanol)
Digitoxigenin-gulometilosida	225-230°	-5,2° (cloroformo)
Digitoxigenin-alometilosida	152-156°	-16,0° (metanol)
Digitoxigenin-glucometilosida	222-224°	-11,4° (metanol)

Los extractos brutos obtenidos según los procedimientos de este invento, los cristales mixtos aislados de ellos y los glucósidos constituyentes de los mismos, son útiles como agentes medicinales, más particularmente como agentes cardio-activos y diuréticos.

10.

Los compuestos de este invento pueden emplearse como medicamentos en forma de preparaciones farmacéuticas que contienen los compuestos en mezcla con un vehículo farmacéutico orgánico o inorgánico, sólido o líquido, para administración entérica, por ejemplo oral o parentérica. Para confeccionar la preparación pueden emplearse substancias que no reaccionen con los compuestos, tales como agua, gelatina, lactosa, almidones, estearato magnésico, talco, aceites vegetales, gomas polialkilenglicoles, ja leas de petróleo o cualquier otro vehículo conocido que se emplee para la preparación de medicamentos. Las preparaciones farmacéuticas pueden tener forma sólida, por ejemplo de tabletas, grageas, supositorios o cápsulas, o forma líquida, por ejemplo de soluciones,

15.

20.



253371

emulsiones o suspensiones. Si se desea, pueden estar esterilizados y/o contener sustancias auxiliares, tales como agentes conservadores, agentes estabilizantes, agentes humectantes o emulsionantes, sales para variar la presión osmótica o amortiguadores. También pueden contener, en combinación, otras sustancias útiles en sentido terapéutico.

5.

Este invento se describe ulteriormente en el ejemplo que sigue, el cual tiene por objeto ilustrarlo pero sin limitarlo. Las temperaturas están registradas en grados centígrados.

10.

E J E M P L O 1.

Se calienta a 60° una mezcla de 500 g de hojas pulverizadas de Digitalis isabelliana y 800 cc de agua y se la agita a esta temperatura durante 90 minutos. Luego se añaden 800 cc de etanol, se agita la mezcla durante un período adicional de 90 minutos a 60° y se filtra. El residuo se extrae primeramente con 1000 cc de etanol al 60%, luego con 1000 cc de etanol al 70% y por último se extrae por dos veces con 1000 cc cada vez de etanol al 90%. Se combinan los varios extractos y se les concentra en vacío hasta un volumen de 700 cc. El

15.

concentrado obtenido se diluye con 700 cc de etanol y los materiales de lastre se precipitan por adición de hidróxido de plomo (II). Después de separar el precipitado, se trata la solución alcohólica acuosa con la cantidad de sulfuro de hidrógeno necesaria para precipitar el plomo y se separa por

20.

filtración el sulfuro de plomo. El extracto así purificado se concentra en vacío hasta 500 cc y se extrae sucesivamente con éter (en total, 1,5 litros), cloroformo (en total 2,5 litros) y una mezcla de cuatro partes en volumen de cloroformo y una

25.

parte en volumen de etanol (en total 2,5 litros). Luego se

30.



205371

concentra la fase acuosa hasta 400 cc y se la extrae con una mezcla de dos partes en volumen de cloroformo y una parte en volumen de etanol (en total, 4 litros).

5. En la tabla que sigue se muestran las cantidades de sustancias obtenidas de los diversos extractos, así como sus respectivas toxicidades según Hatcher-Magnus.

	<u>Cantidad:</u>	<u>Dosis letal:</u>
Extracto etéreo	2,2 g	-----
Extracto cloroformico	1,7 g	3,50 ± 0,55 mg/kg
Extracto cloroformo/alcohol (4:1)	20,2 g	0,76 ± 0,05 mg/kg
Extracto cloroformo/alcohol (2:1)	4,3 g	4,34 ± 0,05 mg/kg
Solución acuosa residual	400 cc	Más de 0,06 cc/kg o sea más de 112 mg/kg.

10. El extracto bruto (20,2 g) aislado de la mezcla cloroformo/alcohol (4:1) es un polvo amorfo, de color pardo verdusco, que contiene glucósidos de uzarigenina y glucósidos de digitoxigenina. Como se ve en la tabla, este extracto bruto, presenta mayor actividad que todas las demás fracciones. Por desarrollo cromatográfico en papel (sistema cloroformo/tetrahidrofurano/formamida 50:50:6,5 partes en volumen, en descenso, papel de filtro No. 1 Whatman impregnado con formamida), se comprueba que por lo menos cinco compuestos dotados de reacción Kedde positiva están contenidos en el extracto bruto y que los dos glucósidos de uzarigenina A y B predominan en cantidad.

15. Estos dos glucósidos pueden obtenerse del extracto bruto antes mencionado, en forma de cristales mixtos, de la manera siguiente:

20. Se disuelven en 150 cc de acetona 20,2 g de extracto bruto, se concentra la solución en vacío hasta que aparece



265371

5. turbidez y luego se la enfría en baño de hielo durante 3 horas. Se separan 4,3 g de un polvo verde grisáceo que tiene un punto de fusión de 282-284°. Después de recristalización en metanol acuoso, se obtienen agujas fijas, incoloras, de punto de fusión 270-276°. Este producto es una mezcla cristalina de glucósidos A y B. Es soluble en agua. La dosis letal, determinada según Hatcher-Magnus, es de $0,45 \pm 0,05$ mg/kg i.v.

10. Por medio de estrofantobiasa, puede disociarse glucosa de los cristales mixtos de glucósidos A y B aislados en forma de cristales mixtos, con lo que se obtienen dos monósidos (desgluco-glucósido A y desgluco-glucósido B).

15. Por hidrólisis con ácido sulfúrico 0,05-n en metanol al 50%, estos dos monósidos pueden disociarse en la aglucona-uzarigenina y el azúcar 2-desoxi, enlazado directamente a la aglucona. En el caso del desgluco-glucósido B, se obtiene así D(+)-digitoxosa.

E J E M P L O 2.

20. Se prepara una solución inyectable disolviendo en 200 cc de etanol puro 250 mg de los cristales mixtos obtenidos en el Ejemplo 1 y luego se añade agua redestilada para llevar el volumen de la solución hasta 1000 cc. La solución alcohólicoacuosa así obtenida se llena en ampollas convencionales de 2 y 5 cc y se esteriliza como de ordinario.

25. E J E M P L O 3.

Se prepara una solución para uso oral disolviendo en 200 cc de etanol puro 1,25 g de los cristales mixtos obtenidos en el Ejemplo 1 y después se añade agua para llevar el volumen de la solución hasta 1000 cc.



NOTA 265371

Descrito el objeto de la invención se declara nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad suiza nº 2511/60 del 4 de Marzo de 1960:

5. 1. Procedimiento para la preparación de glucósidos cardioactivos, que comprende los pasos de extraer hojas de *Digitalis canariensis* L. var. *isabelliana* (Webb) Lindinger con agua y alcohol acuoso, participar de la solución alcohólica acuosa los materiales de lastre, extraer la solución alcohólica acuosa así purificada sucesivamente con éter, cloroformo y una mezcla de cloroformo y alcohol compuesta de una parte en volumen de alcohol y cuatro partes en volumen de cloroformo y aislar los materiales activos que pasan a la mezcla de cloroformo y alcohol.
10. 2. Procedimiento en conformidad con lo definido en la reivindicación 1, que comprende el paso adicional de aislar los cristales mixtos de glucósidos de uzarigenina contenidos en el extracto bruto de glucósidos de uzarigenina y glucósidos de digitoxigenina obtenido en conformidad con lo definido en la reivindicación 1.
15. 3. Procedimiento para la preparación de glucósidos cardioactivos.
- 20.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de 9 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 3 de Marzo de 1961.

p. a.

JAIMESERN MIFALLES

P.P.

tr: sb
rm.