

281689



19 DIC. 1962

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

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

formulada el 19 de Octubre de 1.962, con el nº 281.689

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de ELI LILLY AND COMPANY, entidad norteamericana,  
establecida en 740 South Alabama Street, Indianapolis, --  
Indiana, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LOS ALCALOIDES LEUROSIDI-  
NA Y/O LEUROCISTINA"

-----  
Este invento se refiere a la preparación de nue--  
vos alcaloides y sus sales a partir de plantas pertene--  
cientes a la familia de las Apocináceas.

El presente invento proporciona un método para --  
5 preparar los alcaloides leurosidina y/o leurocristina en  
forma sustancialmente pura, que comprende extraer la frac-  
ción alcaloidea que contiene uno de dichos alcaloides, o  
los dos, de material vegetal derivado de plantas de la fa-  
milia de las Apocináceas, separar leurosidina y/o leuro-  
10 cristina de sus alcaloides acompañantes, y cristalizar --

luego dichas leurosidina y/o leurocristina en forma de base libre o como una sal por adición de ácido.

5 El presente invento proporciona además un método para preparar los alcaloides leurosidina y/o leurocristina, que comprende poner en contacto material vegetal procedente de plantas de la familia de las Apocináceas que contiene uno de dichos alcaloides, o ambos, con ácido y un disolvente orgánico no miscible en agua, separar la capa orgánica que contiene la fracción alcaloide leurocristina y/o leurosidina, y luego liberar leurosidina y/o leurocristina de sus alcaloides acompañantes.

10 Por supuesto, el invento proporciona también un alcaloide sustancialmente puro seleccionado del grupo compuesto por leurocristina, leurosidina, sus sales por adición de ácido y sus derivados de amonio cuaternario, cuando se preparan por el método anteriormente expuesto.

15 Está también dentro del alcance de este invento proporcionar una composición terapéutica en forma de dosificación unitaria que comprende un medio de dilución fisiológicamente compatible y un alcaloide sustancialmente puro seleccionado del grupo citado en el párrafo anterior.

20 Proporciona también el invento un procedimiento para preparar una composición terapéutica en forma de dosificación unitaria que comprende combinar un medio de dilución fisiológicamente compatible y un compuesto seleccionado del grupo constituido por leurocristina, leurosidina, sales por adición de ácido y derivados de amonio cuaternario de leurosidina y leurocristina:

25 A) teniendo dicho alcaloide leurosidina las propiedades químicas y físicas siguientes:

281689



19

(a) análisis elemental: C, 67,08; H, 7,34; N, 6,24; O, 18,81

(b) punto de fusión = 208-211° C. sin corregir

5

(c) rotación óptica,  $\alpha_D^{25} = + 55,8^\circ$  (C = 1 en cloroformo)

(d) constantes de disociación logarítmicas ( $pK_a$ ) a 5,0 y 8,8 (determinadas en dimetilformamida acuosa al 33 por ciento)

10

(e) máximos de absorción ultravioleta a 214 y 265  $m\mu$  con inflexiones a 286, 295 y 310  $m\mu$  (determinadas en etanol), y

(f) máximos de absorción infrarroja a 2,89, 3,41, 5,74, 6,17, 6,64, 6,85, 6,97, 7,50, 7,74, 8,15, 8,74, 8,84, 9,04, 9,15, 9,60, 9,89, 10,44, 10,86, 11,13, 11,99 y 12,21 micrones; y

15

B) teniendo dicho alcaloide leurocristina las propiedades químicas y físicas siguientes:

(a) análisis elemental: C, 66,73; H, 7,06; N, 6,75; O, 19,44

20

(b) punto de fusión = 218-220° C. sin corregir

(c) rotación óptica,  $\alpha_D^{25} = + 17^\circ$  (C = 1 en dicloruro de etileno)

(d) constantes de disociación logarítmicas ( $pK_a$ ) a 5,0 y 7,4 (determinadas en dimetilformamida acuosa al 33 por ciento.

25

(e) máximos de absorción ultravioleta a 220, 255 y 296  $m\mu$  con inflexión a 262 y 290  $m\mu$  (determinada en etanol), y

(f) máximos de absorción infrarroja a 2,78, 2,90, 3,41, 5,74, 5,93, 6,24, 6,67, 6,86, 6,97, 7,35, 7,53, —

30

281689



7,74, 8,15, 8,56, 8,75, 8,87, 9,07, 9,28, 9,70, 9,91, —  
10,45, 10,73, 10,86, 11,74 y 12,02 micrones, de forma que  
la composición terapéutica resultante se adapte para pro-  
porcionar el compuesto citado en una cantidad de dosis de  
5 dosis de 0,01 a 10 mg./kg., aproximadamente, del peso cor-  
poral del sujeto tratado

Se halla también dentro del alcance de este inven-  
to proporcionar el método para tratar malignidades que —  
llevan consigo la administración al paciente de una canti-  
10 dad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición  
tal como se define arriba.

Este invento proporciona dos nuevos alcaloides di-  
meros, leurosidina y leurocristina, que se pueden obtener  
de fracciones alcaloideas amorfas derivadas de plantas —  
15 apocináceas. Se hallan también dentro del alcance de este  
invento las sales por adición de ácido y los derivados de  
amonio cuaternario de leurocristina y leurosidina.

La leurocristina y la leurosidina son alcaloides -  
dímeros estrechamente relacionados, que tienen dos siste-  
20 mas de anillos indol por molécula. Las bases libres alca-  
loiloideas son sólidos cristalinos de punto de fusión al-  
to, fundiendo la base libre leurosidina a 208-211°C., —  
aproximadamente, con descomposición, y la base libre leu-  
rocristina a 218-220°C., aproximadamente, con descomposi-  
25 ción.

La tabla I que figura a continuación da el análi-  
sis elemental y el peso molecular para leurocristina, leu-  
rosidina y sus correspondientes sulfatos.

281689



TABLA I

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>O</u>	<u>PESO MOLECULAR</u>
Leurocristina. <sup>2</sup>	66,73	7,06	6,75	19,44	824
Sulfato de leuro					
5      cristina	59,81	6,67	6,02	23,66	922
Leurosidina	67,08	7,34	6,24	18,81	826
Sulfato de leuro					
sidina	59,84	6,79	6,23	24,08	924

10      <sup>2</sup> Secada durante un minuto a 180° C.

15      Además de su similitud en el punto de fusión y en el peso molecular, ambas bases libres forman sales con aniones adecuados; por ejemplo, sulfatos con ácido sulfúrico. Por otra parte, ambas bases libres forman derivados de amonio cuaternario por reacción con yoduros de alcohol tal como yoduro de metilo. Sin embargo, en otras propiedades que no sean las citadas más arriba, la leurosidina y la leurocristina muestran diferencias considerables; por ejemplo, la leurosidina es más dextrorrotatoria que -

20      la leurocristina, teniendo un  $\alpha_D^{25} = + 55,8\%$  (C= 1 en cloroformo), mientras que la leurocristina tiene un  $\alpha_D^{25} = + 17,0\%$  (C= 1 en dicloruro de etileno). Ambos alcaloides tienen dos grupos básicos valorables cuando se titulan en dimetilformamida acuosa al 33 por ciento. Las  $pK_a$  de los

25      grupos básicos en la leurosidina se hallan en 5,0 y 8,8, mientras que las de la leurocristina están a 5,0 y 7,4. Los espectros de absorción ultravioleta en etanol son -- también diferentes. El espectro de la leurosidina tiene máximos de absorción que se presentan a 214 y 265  $m\mu$  con inflexiones a 286, 295 y 310  $m\mu$ , mientras que el espectro

30

281089



de la leurocristina tiene máximos a 220, 255 y 296  $m\mu$ , -  
con inflexiones a 262 y 290  $m\mu$ .

La Tabla II muestra los máximos de absorción in-  
frarroja de los alcaloides, según se determina en solución  
clorofórmica.

5

TABLA II

	<u>Leurosidina</u>	<u>Leurocristina</u>
		2,78 micras
10	2,89 micras	2,90
	3,41	3,41
	5,74	5,74
		5,93
	6,17	6,24
15	6,64	6,67
	6,85	6,86
	6,97	6,97
	7,28	7,35
	7,50	7,53
20	7,74	7,74
	8,15	8,15
		8,56
	8,74	8,75
	8,84	8,87
25	9,04	9,07
	9,15	9,28
	9,60	9,70
	9,89	9,91
	10,44	10,45
30		10,73

281689



TABLA II (Cont.)

	<u>Leurosidina</u>	<u>Leurocristina</u>
	10,86	10,86
	11,13	11,23
5	11,99	11,74
	12,21	12,02

Se pueden preparar leurocristina y leurosidina li-  
bros de otros alcaloides de la manera siguiente: Se secan  
10 y se muelen hojas, tallos o raíces, independientemente o  
en mezcla, de plantas pertenecientes a la familia de las  
Apocináceas, cuyas plantas previamente se ha comprobado -  
que contienen uno de los nuevos alcaloides leurocristina  
y leurosidina, o ambos. El material secado, molido, se hu-  
medece con un ácido acuoso diluido, y el material humede-  
15 cido se extrae con un disolvente orgánico inmiscible en -  
agua. Los alcaloides más fuertemente básicos quedan rete-  
nidos en la fase sólida, mientras que los alcaloides dé-  
bilmente básicos que comprenden leurocristina y leurosi-  
20 na, así como leurosina y vincaleucoblastina se extraen en  
el disolvente orgánico. El extracto orgánico se separa y  
se concentra. La fracción alcaloide débilmente básica se  
extrae del concentrado orgánico pasando al ácido acuoso.  
Se separa el extracto acuoso ácido, y se extrae con un di-  
25 solvente orgánico inmiscible en agua. La capa acuosa áci-  
da se alcaliniza, y la fracción alcaloidea leurosidina-leu-  
rocristina se extrae de nuevo en un disolvente orgánico -  
inmiscible en agua. Este extracto se somete a una separa-  
ción cromatográfica. En esta operación se eluyen, preferen-  
30 temente, primero leurosina y vincaleucoblastina con un di-



19

5           solvente débilmente polar, tal como benceno o éter. La --  
fracción que contiene leurosidina y leurocristina, por es-  
tar más fuertemente ligada, se eluye luego de la columna  
se cromatografica con un disolvente algo más polar, tal --  
10           como cloroformo o metanol. Esta fracción se cromatografía  
de nuevo con el fin de proporcionar una purificación y --  
concentración adicionales de la leurosidina y la leuro--  
cristina. Los alcaloides brutos se obtienen evaporando a  
sequedad en vacío cada una de las fracciones cromatográ--  
15           ficas. El residuo amorfo resultante se disuelve en un di-  
solvente tal como metanol o etanol. La leurosidina, si se  
halla presente, cristaliza en estas condiciones y se sepa-  
ra por filtración. La concentración y enfriamiento del --  
filtrado produce leurocristina, si se halla presente, en  
20           forma de una sustancia cristalina que, asimismo, se sepa-  
ra por filtración. Alternativamente, las soluciones alco-  
hólicas preparadas disolviendo los residuos amorfos más --  
arriba citados se pueden tratar directamente con ácido sul-  
fúrico etanólico o acuoso, ocasionando así la precipita--  
ción de sulfato de leurocristina. Los filtrados de los --  
que se han separado leurosidina y leurocristina como ba-  
ses alcaloides cristalinas se pueden tratar también de ma-  
30           nera análoga para dar sulfato de leurocristina.

25           En el procedimiento anteriormente citado se pueden  
emplear otros ácidos tales como ácido acético y ácido cí-  
trico y análogos, en lugar de ácido tartárico. Los disol-  
ventes orgánicos inmiscibles en agua útiles en diversas --  
etapas del procedimiento arriba citado comprenden benceno,  
éter, acetato de etilo, cloroformo, dicloruro de etileno,  
30           metilisobutilcetona y análogos.

281689



1906

La leurocristina y la leurosidina son eficaces — para mitigar los síntomas y aliviar las molestias de que van acompañadas diversas malignidades. Entre las que pueden tratarse favorablemente de esta forma están la enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, mieloma múltiple, linfosarcoma, astrocitoma, y carcinoma de la cervix y la próstata. En muchos casos se produce una remisión del mal en la enfermedad de Hodgkin y en la leucemia, y existe una regresión en el tamaño del tumor y una cesación en el crecimiento del tumor en carcinomas y sarcomas.

Cuando se emplean terapéuticamente, la leurocristina, la leurosidina, sus sales por adición de ácido y sus derivados de amonio cuaternario, generalmente se administran a un sujeto adecuado en dosificaciones que varían desde 0,01, aproximadamente, hasta 10 mg./kg., aproximadamente, de peso corporal. En particular, la leurocristina, — preferentemente en forma de su sulfato, ocasiona una respuesta terapéutica en diversas malignidades, que incluyen tumores sólidos, cuando se administra en cantidades de dosis que varían desde 0,01 hasta 0,2 mg./kg. El medicamento se administra corrientemente por vía intravenosa, aunque se pueden usar otras vías de administración, incluso la oral.

Este invento se explica además mediante los ejemplos específicos siguientes:

EJEMPLO I

Preparación de Leurocristina y Leurosidina a partir de 90% de hoja. 800 kg. de plantas de Vinca rosea compuestas de —

281689



90%, aproximadamente, de hojas y 10%, aproximadamente, de tallos se humedecieron con 540 litros de ácido tartárico acuoso al 2%. Las hojas humedecidas se extrajeron por agitación con cinco porciones de 4000 litros de benceno. Los extractos bencénicos se combinaron y se concentraron en vacío hasta un volumen de 500 litros, aproximadamente. Se añadieron 1.070 litros de ácido tartárico acuoso al 2% al concentrado bencénico, y el resto del benceno se eliminó por destilación con vapor en vacío. El concentrado acuoso ácido se filtró para retirar material insoluble, y su acidez se ajustó luego a un pH de 3, aproximadamente, mediante la adición de amoníaco acuoso al 28%. La solución ácida se extrajo con dos porciones de 540 litros de benceno. Los extractos bencénicos se separaron y se tiraron. La acidez de la solución acuosa se ajustó de nuevo a un pH de 8,5 a 9,0, aproximadamente, añadiendo amoníaco acuoso al 28%. La solución básica se extrajo con dos porciones de 540 litros de benceno, y los extractos bencénicos se separaron y se reunieron. Los extractos reunidos se secaron y se concentraron en vacío hasta un volumen de 15 litros, aproximadamente. El concentrado bencénico se dividió en tres porciones iguales, cada una de las cuales se cromatógrafió independientemente sobre lotes de 40 kilos de alúmina desactivada. Cada lote de 40 kilos de alúmina se había desactivado con 7,5 litros de agua y 347 ml. de ácido acético glacial.

La Tabla II que figura a continuación explica los resultados de esta separación cromatográfica preliminar. En la Tabla, la columna 1 da el número de la fracción; la columna 2, el disolvente eluyente o mezcla de disolvente; y la columna 3, el alcaloide principal obtenido de dicha fracción.

281689

TABLA III

<u>Fracción</u>	<u>Disolvente eluyente</u>	<u>Alcaloide</u>
1	Benceno	Catarantina
2	Benceno	Vindolinina (obtenida como dihidrocloruro)
3-19	Benceno	Ajmalicina
20-21	Benceno	Vindolina
34-42	Benceno--Cloroformo(1:1)	Leurosina
43-45	Benceno--Cloroformo(1:1)	Vincalencoblastina (obtenida como sulfato)
46	Cloroformo	Virosina
47-52	Cloroformo--Metanol	Residuos amorfos

I H I

281689





90

La leurocristina y la leurosídina figuraban entre los alcaloides presentes en las fracciones 47-52.

5 La Vincaleucoblastina se obtuvo de la fracción --  
 43-45, en forma de un sulfato cristalino. Los licores ma-  
 dre resultantes se combinaron con las fracciones 47-52.  
 Las fracciones combinadas se secaron y se vertieron luego  
 lentamente, con agitación, en una solución de 336 gramos  
 de ácido cítrico y 16 litros de agua. La acidez de la so-  
 10 lución se ajustó a un pH de 4,4, aproximadamente, con am-  
 níaco acuoso al 28% y luego se extrajo la solución con --  
 dos porciones de 16 litros de benceno. Los extractos ben-  
 cénicos se reunieron; los extractos reunidos se secaron --  
 con sulfato sódico anhidro y se concentraron a sequedad --  
 en vacío. La acidez de la capa acuosa se ajustó luego a --  
 15 pH 7,0, aproximadamente, con amoníaco acuoso al 28%, y la  
 solución resultante se extrajo de nuevo con dos porciones  
 de 16 litros de benceno. Se reunieron los extractos bencé-  
 nicos; los extractos reunidos se secaron con sulfato sód-  
 20 co anhidro, y los disolventes se retiraron por evapora-  
 ción en vacío, dejando como residuo una mezcla de alcaloi-  
 des.

Se disolvieron 40 gramos de los alcaloides resi-  
 duales en 300 ml. de benceno, y la solución resultante se  
 25 cromatografió sobre 1335 gramos de alúmina desactivada --  
 parcialmente por tratamiento con 80 ml. de agua y 4 ml. --  
 de ácido acético.

El cromatograma se desarrolló usando el mismo di-  
 solvente eluyente o mezclas de disolvente que se emplea-  
 ron en la Tabla III. La Tabla IV presenta el resultado de  
 30 esta cromatografía.

281689



TABLA IV

	<u>Fracción</u>	<u>Disolvente eluyente</u>
	1	Benceno
	2,3	Benceno-cloroformo (3:1)
	4,5	"
5	6-8	"
	9-14	"
	15	"
	16	Benceno-cloroformo (1:1)
	17-29	"
10	30-32	Benceno-cloroformo (1:3)
	33	"
	34	"
	35	"
	36	"
15	37	"
	38	"
	39	"
	40	"
	41	"
20	42	"
	43	"
	44	Cloroformo
	45-57	"
	58-67	Cloroformo-metanol (19:1)

25 Las fracciones eluidas mediante benceno-cloroformo (1:1) benceno-cloroformo (1:3) se encontró que contenían leurosídina y leurocristina.

30 Todas las fracciones cromatográficas que contenían leurosídina y/o leurocristina se evaporaron a sequedad en vacío, y el material alcaloideo residual se crist

281689



lizó de metanol. La leurosidina, cuando estaba presente, precipitó en forma de una primera fracción cristalina, y se obtuvo leurocristina por concentración y enfriamiento de los licores madre procedentes de la cristalización de leurosidina. Se obtuvo también sulfato de leurocristina de los licores madre procedentes de la cristalización directa de la base libre leurocristina por el método del ejemplo III, que figura más adelante.

Se repitió la separación antes citada, excepto que el 90% de hojas de Vinca rosea se humedeció con 32 litros de amoníaco acuoso y 560 litros de agua. Después de que la solución acuosa ácida inicial se había extraído a un pH de 3, se ajustó su acidez a pH 5, y la extracción con benceno para retirar los alcaloides deseados se hizo a este pH, en lugar de a pH 8,5, como en el ejemplo anterior. Los alcaloides extraídos a pH 5 se cromatografiaron como se ha indicado anteriormente para producir leurocristina y leurosidina.

Como podría esperarse, usando un gran exceso de alúmina, se puede utilizar solamente el procedimiento de separación cromatográfica, en lugar de los dos que se emplearon para fines prácticos en el ejemplo dicho anteriormente. Así, pues, la expresión "procedimiento de separación cromatográfica", según se usa aquí, indica separación de bases alcaloideas por elución selectiva, tanto si son 1, 2, o incluso 10, los procedimientos cromatográficos de separación usados para retirar impurezas asociadas con antioridad a la elución de los alcaloides deseados.

En el procedimiento de separación cromatográfica anteriormente citado se emplearon sistemas de disolvente

281689

benceno-cloroformo para eluir selectivamente la fracción alcaloidea leurosídina-leurocristina. Previamente se había determinado que el uso de este sistema disolvente proporcionaba una buena separación entre los alcaloides deseados y los alcaloides acompañantes en un período de tiempo razonable. Al determinar el sistema disolvente de elución óptimo se realizó una separación cromatográfica experimental en pequeña escala en la que la mezcla alcaloidea se colocó sobre una columna preparada a partir de alúmina desactivada, y se pasó sobre la columna un grupo de disolventes eluyentes con el fin de incrementar la fuerza de elución. En un trabajo de Jacques y Mathieu Bull. Soc. Chem. Francia, (1946), 94-98, se puede ver una lista útil de dichos disolventes eluyentes basada en la constante dieléctrica creciente.

Como es corriente en la mayoría de las separaciones cromatográficas, el disolvente eluyente real empleado no es crítico. Por ejemplo, de acuerdo con la Tabla IV citada, los alcaloides deseados, leurocristina y leurosídina, se eluyeron mediante un sistema disolvente de benceno-cloroformo (1:3). Un sistema disolvente de benceno puro, o de benceno-cloroformo (3:1), probablemente habría dado una separación similar, pero el tiempo necesario para alcanzar el mismo grado de separación se habría incrementado grandemente. En general, un disolvente con una constante dieléctrica menor eluye más lentamente, pero da un grado mejor de separación, mientras que un disolvente con una constante dieléctrica alta da una elución rápida, pero menos selectiva.

Otro factor que controla la elección del disolven

28389



te eluyente en una separación cromatográfica es el grado de actividad de la alúmina. Por ejemplo, en la cromatografía anteriormente citada se empleó una alúmina desactivada con ácido acético y agua. El uso de una alúmina más activa hubiera requerido un tiempo de elución mayor para el mismo sistema disolvente, o el uso de un sistema disolvente con una constante dieléctrica más alta. Recíprocamente, el uso de una alúmina menos activa habría significado la necesidad de un sistema disolvente con una constante dieléctrica más baja para eluir leurosidina y leurocristina en el mismo período de tiempo con igual grado de pureza.

#### Ejemplo 2

##### Preparación de sulfatos

Se disolvió un gramo de leurosidina en 30 ml. de acetona. Se añadió a la solución acetónica del alcaloide una solución conteniendo 5 ml. de ácido sulfúrico acuoso al 1% y 42 ml. de agua. La mezcla resultante se evaporó a sequedad en vacío. El residuo que comprendía sulfato de leurosidina se disolvió en etanol anhidro calentado. El enfriamiento de la solución etanólica produjo sulfato de leurosidina cristalino que fundía a 237-245°C., aproximadamente. Hubo una pérdida de disolvente entre 201-212°C.

Se preparó sulfato de leurocristina en forma totalmente análoga, partiendo de la base libre leurocristina. El compuesto fundía a 273-281°C., aproximadamente, después de recrystalizar de etanol. Se produjo una pérdida de disolvente entre 210-232°C.

En la mezcla con ácido sulfúrico acuoso al 1% del método de preparación arriba citado, el etanol puede sus-



tituirse por agua.

5 Se pueden preparar otras sales de leurocristina y leurosidina tales como fosfato, nitrato, hidrocloreuro, hidrobromuro, benzoato, succinato, tartrato, y análogos, -- sustituyendo el ácido sulfúrico por el ácido apropiado en el ejemplo anterior.

Ejemplo 3

10 Preparación de metoyoduros de Leurosidina y Leurocristina

15 Se disolvieron 0,001 moles de leurocristina en 10 ml., aproximadamente, de benceno. Se añadieron a la solución de benceno 0,002 equivalentes de yoduro de metilo, y la mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 horas, aproximadamente, en cuyo plazo precipitó metoyoduro de leurocristina cristalino. La mezcla se dejó enfriar durante 2 horas, aproximadamente, para originar la precipitación adicional de metoyoduro de leurocristina. El precipitado se separó por filtración y se recristalizó de etanol. El metoyoduro de leurocristina así preparado fundió a 226-232° C., aproximadamente.

20 Análisis: Encontrado: I, 13,08.

25 Se preparó metoyoduro de leurosidina sustituyendo la leurocristina por la leurosidina en el procedimiento -- antes citado. El metoyoduro de leurosidina fundió con descomposición a 198-216° C., aproximadamente, después de recristalizar de etanol. Hubo una pérdida de disolvente a 173-178° C., aproximadamente.

Análisis: Encontrado: I, 13,05.

30 Se preparan otras sales cuaternarias de leurosidina

284689



na y leurocristina sustituyendo el yoduro de metilo en --  
los procedimientos anteriores por otros haluros de alcohi  
lo y aralcohilo, sulfato, etc. Entre los compuestos que --  
pueden emplearse como sustitutivos están, por tanto, los  
5 siguientes: cloruro de bencilo, bromuro de p-nitrobencilo,  
yoduro de etilo, sulfato de dimetilo, bromuro de propilo,  
yoduro de butilo, yoduro de m-clorofenetilo, cloruro de --  
o-etoxibencilo y análogos.

La presente solicitud que corresponde a la presen  
10 tada en Estados Unidos de América, el 26 de Octubre de --  
1.961, bajo el número 147.911, se acoge a los beneficios  
del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad In--  
dustrial.

15

#### N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se pre  
sentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente  
20 de Invención en España, por VEINTE años, son los siguien--  
tes:

1.- Un procedimiento para preparar los alcaloides  
leurosidina y/o leurocristina en forma sustancialmente pu  
ra, que comprende extraer la fracción alcaloide que con--  
25 tiene uno o los dos alcaloides citados de material vege--  
tal derivado de plantas de la familia Apocynaceae, sepa--  
rar leurosidina y/o leurocristina de sus alcaloides compa  
ñeros y luego cristalizar dicha leurosidina y/o leurocris  
tina ya sea en forma de la base libre o ya como sal por --  
30 adición de ácido.

281689



2.- Un procedimiento para preparar los alcaloides leurosidina y/o leurocristina, que comprende poner en contacto material vegetal de plantas de la familia Apocynaceae, que contienen uno o los dos alcaloides citados con ácido acuoso y/o un disolvente orgánico inmiscible con agua, separar la capa orgánica que contiene la fracción alcaloide de leurosidina y/o leurocristina y libertar luego la leurosidina y/o la leurocristina de sus alcaloides con comitantes.

3.- El procedimiento del punto 2, en el cual los alcaloides débilmente básicos que pasan a la fase o capa orgánica son extraídos de la capa orgánica separada con ácido acuoso, el extracto se alcaliniza y los alcaloides débilmente básicos son extraídos de él con un disolvente orgánico inmiscible con agua, dichos alcaloides débilmente básicos son sometidos a un proceso de separación por cromatografía, y la leurosidina y/o la leurocristina sustancialmente libres de alcaloides concomitantes se obtienen por elución preferente durante dicho proceso de separación cromatográfica, las fracciones que contienen leurosidina y/o leurocristina se evaporan a sequedad y la leurocristina y/o la leurosidina se recuperan de dichas fracciones de alcaloide secas por cristalización.

4.- Un procedimiento según los puntos 1, 2 ó 3, que comprende convertir leurosidina y/o leurocristina obtenida en la forma de base libre en una sal por adición de ácido o en un derivado de amonio cuaternario por reacción con un ácido o un haluro o sulfato de alcohol o aralcoholo apropiados, respectivamente.

5.- Un procedimiento para preparar una composición

281689



5 terapéutica en forma dosificada unitaria, que comprende -  
 combinar un medio extendedor fisiológicamente compatible  
 y un compuesto elegido del grupo consistente en leurocristina,  
 leurosidina, sales por adición de ácido y derivados  
 de amonio cuaternario de leurosidina y leurocristina, te-  
 niendo (A) dicho alcaloide de leurosidina las siguientes  
 propiedades físicas y químicas: Análisis elemental: C, --  
 67,08; H, 7,34; N, 6,24; O, 18,81; punto de fusión, 208 --  
 211°C sin corregir; rotación óptica, alfa  $^{\text{D}}_{25}$ , + 55,82 --  
 10 (C= 1% en cloroformo); constantes logarítmicas de disocia-  
 ción ( $\text{pK}_a$ ) a 5,0 y 8,8 (determinadas en dimetil formamida  
 acuosa al 33%); máximos de absorción en el ultravioleta a  
 214 y 265 m/ $\mu$  con inflexiones a 286, 295 y 310 m/ $\mu$  (deter-  
 minados en etanol), y máximos de absorción en el infrarro-  
 15 jo a 2,89, 3,41, 5,74, 6,17, 6,64, 6,85, 6,97, 7,28, 7,50,  
 7,74, 8,15, 8,74, 8,84, 9,04, 9,15, 9,60, 9,89, 10,44, --  
 10,86, 11,13, 11,99, y 12,21 micras; teniendo (B dicho al-  
 caloide de leurocristina las siguientes propiedades quími-  
 cas y físicas: Análisis elemental: C, 66,73, H, 7,06, --  
 20 N, 6,75, O, 19,44; punto de fusión 218-220°C, sin corre-  
 gir; rotación óptica, alfa  $^{\text{D}}_{25}$ , + 172 (C= 1% en dicloruro  
 de etileno); constantes logarítmicas de disociación ( $\text{pK}_a$ )  
 a 5,0 y 7,4 (determinadas en dimetil formamida acuosa al  
 33%); máximos de absorción en el ultravioleta a 220, 255  
 25 y 296 m/ $\mu$  con inflexiones a 262 y 290 m/ $\mu$  (determinados --  
 en etanol); y máximos de absorción en el infrarrojo a 2,78,  
 2,90, 3,41, 5,74, 5,93, 6,24, 6,67, 6,86, 6,97, 7,35, 7,53,  
 7,74, 8,15, 8,56, 8,75, 8,87, 9,07, 9,28, 9,70, 9,91, --  
 10,45, 10,73, 10,86, 11,23, 11,74 y 12,02 micras, de mane-  
 30 ra que la composición terapéutica resultante esté destina-



da a dar dicho compuesto en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,01 a unos 10 mmg/Kg. de peso corporal del sujeto tratado.

5 6.- El método de tratar enfermedades que se caracteriza por administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o de una composición obtenida por el procedimiento definido en cualquiera de los puntos 1 a 5.

10 7.- Un procedimiento para preparar los alcaloides leurosidina y/o leurocristina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintiuna hojas escritas a máquina por una sola cara.

15

Madrid,

19 DIC 1962

Alberto de Eusebio  
Asesor

281689