

33 0981



Case 2250⁺

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

por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA NUEVA MATERIA FARMACOLOGICAMENTE ACTIVA Y DE SUS SALES", a favor de la firma suiza J.R. GEIGY, A.G., residente en BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento para la obtención de una substancia de acción farmacológica, hasta ahora desconocida, a partir de plantas del género Voacanga, a medicamentos que contienen esta substancia activa y a su empleo.

5.

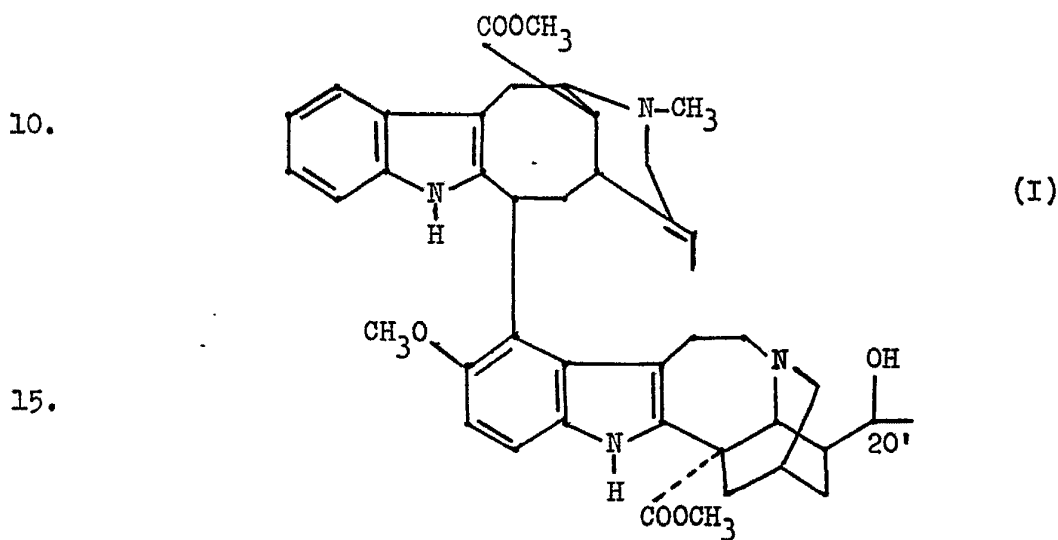
Se ha descubierto, sorprendentemente, que de plantas del género Voacanga, y en particular de la corteza del tronco de la Voacanga africana Stapf, puede extraerse una substancia, hasta ahora desconocida, que tiene acción

10.

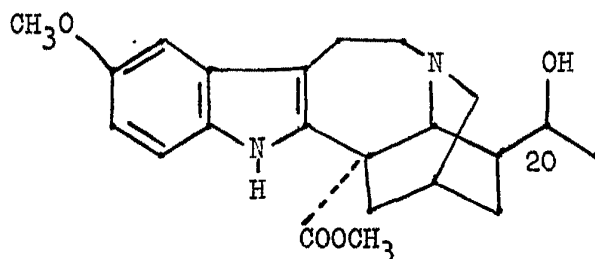
inhibidora de las neoplasias. Esta nueva substancia forma



un hidrato de diclorhidrato cristalizado, de la fórmula aditiva $C_{43}H_{52}N_4O_6 \cdot 2HCl \cdot H_2O$, que puede recrystalizarse, por ejemplo a partir de metanol-acetona, y que funde sólo por encima de 300° , con carbonización. $[\alpha]_D^{22} = -137,7^\circ$ en metanol, $c = 1$). De otros hallazgos, indicados más adelante, se deduce para la nueva sustancia la fórmula estructural I:



20. en virtud de lo cual se designa a la nueva sustancia, en lo que sigue, como 20'-hidroxi-voacamidina. La fórmula estructural I está asegurada por los siguientes hallazgos: Al calentar la nueva sustancia con ácido clorhídrico 2-n a 90° (3 horas), se obtiene de una parte, como producto de escisión, la voacristina, cuya fórmula estructural II



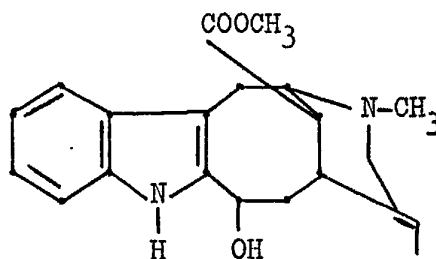
(II)

5.

ha sido aclarada por U. Renner y D.A. Prins, *Experientia* 17, 106 (1961). Como segundo producto de reacción se forma voacorina (G. Büchi, R.E. Manning y S.A. Monti, *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 4631, 1964). De este isómero de la 20'-hidroxi-voacamidina se sabe que se origina, en las condiciones de la escisión de ácido utilizada para la 20'-hidroxi-voacamidina, a partir de voacristina de la fórmula II y vobasinol de la fórmula III

10.

15.



(III)

20.

(U. Renner, D.A. Prins, A.L. Burlingame y K. Biemann, *Helv. Chim. Acta* 46, 2186, 1963). Con ello se demuestra indirectamente al vobasinol de la fórmula III como segundo producto de escisión de la 20'-hidroxi-voacamidina. El encañamiento de ambos productos de escisión en el sentido de la fórmula I se deduce del espectro de resonancia mag-

25.



nética nuclear de la base libre en CDCl_3 , que contiene las señales características para dos protones aromáticos situados en disposición orto uno respecto a otro en la porción voacristínica (posiciones 6 y 7 del sistema del anillo indólico), o sea los dobletes en $\tau = 2,92$ y $\tau = 3,72$.

5. Para la obtención de la 20'-hidroxi-voacamidina se extrae preferentemente corteza del tronco de la Voacanga africana Stapf. Por ejemplo, se moja la corteza con una base acuosa (como solución acuosa de carbonato sódico, bicarbonato sódico o amoníaco) y se la percola con un hidrocarburo aromático líquido (como tolueno o benceno) o con un hidrocarburo halogenado; se concentra la fase orgánica, se somete el extracto total obtenido a una distribución multiplicativa entre ácido acético diluido y un disolvente orgánico no miscible con el agua o una mezcla de disolventes (como benceno, éter, cloroformo o, respectivamente, benceno-éter), se separan los componentes con un coeficiente de distribución $K > 1$, los cuales constituyen una mezcla de alcaloides de Voacanga ya conocidos, se somete los componentes con un coeficiente de distribución $K < 1$ a una distribución de Craig entre tampón pH 4,70 de ácido cítrico-fosfato y mezcla de benceno-éter, se combinan las fracciones medias de la distribución de Craig con $K \approx 1$ y se las concentra. La base remanente, que es 20'-hidroxi-voacamidina bruta, se cromatografía en ocasiones (por ejemplo, absorbiéndola en óxido de aluminio y eluyéndola con benceno-éter). Para la ulterior purificación, se
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



- la transforma, por ejemplo, en el diclorhidrato y se recristaliza este último a partir de disolventes orgánicos apropiados o mezclas de disolventes, como metanol-acetona. Por coeficiente de distribución K se entiende, en lo que antes se
5. ha expuesto, la relación de la concentración en la fase orgánica a la concentración en la fase acuosa:

$$K = \frac{C \text{ de la fase orgánica}}{C \text{ de la fase acuosa}}$$

10. (Véase E. Hecker, Monografías de "Angewandte Chemie" nº 67, "Verteilungsverfahren im Laboratorium", página 15, abajo.)

- La acción inhibidora de las neoplasias puede comprobarse mediante los ensayos siguientes con tumores inducidos experimentalmente y tumores transmitidos en los animales:
- 15.

Informe experimental

- a) Observaciones generales: Para animales de ensayo se utilizaron ratones de la raza albina heterocigota "Rüdiger", que pesan entre 18 y 22 g, en series de 4 a 5 animales por dosis y series de control del doble. Se determinó primeramente la Dosis tolerata maxima (Dtm) en los ratones por medio de una sola aplicación subcutánea y un período de observación de 10 días. La Dtm para la 20'-hidroxi-voacamidina resultó hallarse por encima de la dosis aplicable máxima, de 5000 mg/kg. En los ensayos, la materia
- 20.
- 25.



- activa se administró, conforme a las indicaciones de la tabla, en forma de suspensión en carboximetilcelulosa (Tylose C 600), por vía subcutánea o respectivamente per os, durante 8 días consecutivos y en las dosis que muestra la
5. tabla. Terminados los ensayos, se sacrificaron los animales y se determinó el tamaño de los tumores por medición de la sección transversal (al mismo tiempo que se tomaban calcos, para documentación). La diferencia en el desarrollo de los tumores entre las series de ensayo y las series de control se evaluó a base de la reducción del diámetro de los tumores de las series de ensayo respecto a las series de control. Los resultados están expresados en %.
- 10.
- b) Sarcoma de metilcolantreno (sarcoma MC) en los ratones: Inducción mediante inyección subcutánea de 2 x 1 mg de 10-metilcolantreno en suspensión en 0,5 cc de Tylose, a intervalo de una semana, bajo la piel del pescuezo. Inicio del tratamiento, unas 10 semanas después de la primera aplicación del cancerígeno, cuando el diámetro medio del tumor es de unos 6 mm. Determinación del diámetro de los tumores, 1 y 10 días después de terminar el tratamiento.
- 15.
- 20.
- c) Carcinoma de dimetilbenzoantraceno (carcinoma DMBA) en los ratones: Se inyecta percutáneamente a los animales en la piel de la espalda, 5 veces durante 10 semanas, a intervalos de 2 semanas y con 0,05 cc cada vez de una solución de acetona que contiene 10 % de aceite de croton
- 25.



y 1,5 % de 9,10-dimetilbencilantraceno. El tratamiento se inicia cuando el carcinoma ha alcanzado un diámetro de 8 mm aproximadamente. Determinación del diámetro del tumor, 2 días después de concluido el tratamiento.

5.

T A B L A

10.	Substancia de ensayo	Clase de tumor	Dosificación en mg/kg	Acción (reducción del diámetro del tumor)
	20'-hidroxi-voacamidina	saecoma MC	8 x 625 s.c.	11 - 50 %
		carcinoma DMBA	8 x 312,5 s.c.	76 - 99 %
15.		carcinoma DMBA	8 x 625 p.o.	26 - 50 %

20.

El ejemplo que sigue explica con más detalle la obtención de la nueva 20'-hidroxi-voacamidina, pero no constituye en absoluto la única modalidad de realizarla y no debe limitar de ningún modo el alcance del invento.

E J E M P L O 1

25.

13000 g de corteza molida de Voacanga africana stapf se mojan uniformemente con 8000 cc de solución de sosa al 10 % y se percolan a fondo con unos 100.000 cc de tolueno. Se concentra el extracto en vacío hasta unos 1000



- cc, y el conjunto de alcaloides disueltos se somete a una purificación preliminar por distribución multiplicativa entre ácido acético diluido y benceno-éter (1:1). Con este fin, el extracto toluénico concentrado se sacude con 300
5. cc de ácido acético 0,4-n en el embudo separador 1 de una batería de 11 embudos separadores. Una vez realizada la separación de las fases, se deja la fase acuosa en el embudo separador 2 y se la sacude con 800 cc de benceno-éter (1:1); la fase superior toluénica se vuelve a sacudir en
10. el embudo separador 1 con 800 cc de ácido acético 0,4-n. Efectuada la separación de las fases, se trasladan ambas subfases al siguiente embudo separador, se introducen en el embudo separador 1 800 cc de ácido acético 0,4-n y en el embudo separador 3 800 cc de benceno-éter (1:1) y en
15. todos los tres embudos separadores se vuelve a establecer por sacudimiento el equilibrio de distribución. La distribución multiplicativa se prosigue de manera análoga hasta que la primera fase acuosa haya llegado al embudo separador 11. Entonces se alcaliniza el contenido de todos los embu-
20. dos separadores por adición a cada uno de 20 cc de solución concentrada de amoníaco y se extraen las bases liberadas con la fase superior respectiva. Se separan las subfases alcalinas y se las desecha. Después de secar sobre sulfato sódico, se combina el contenido de los embudos separadores
25. 7 a 11 y se le concentra hasta sequedad. Quedan 230 g de una fracción alcaloide purificada, que aparece en forma de espuma sólida. Los embudos separadores 1 a 6 contienen una



mezcla de alcaloides de voacanga ya conocidos (voacangina, voacamina, voacamidina y voacristina).

- 230 g de la fracción alcaloide purificada se someten a una distribución de Craig en 20 etapas, entre
5. 800 cc cada vez de tampón pH 4,70 de ácido cítrico-fosfato (426 cc de ácido cítrico 0,1 molar y 374 cc de hidrofosfato disódico 0,2 molar) y 800 cc de mezcla de benceno-éter (1:1). Terminada la distribución, se añaden a cada elemento 20 cc de solución concentrada de amoníaco, se extraen las bases
 10. liberadas con la fase superior respectiva y se separan y desechan las subfases alcalinas. Se combina el contenido de los elementos 6 a 14 y, después de secarlo sobre sulfato sódico, se le concentra. Recogiendo el residuo en éter y triturándolo con vobasina cristalizan 13 g de este alcaloide.
 15. Se filtra por succión, se concentra el filtrado hasta sequedad y se cromatografía el residuo (72 g) en 2000 g de óxido de aluminio neutro, de actividad III. Con benceno, en 5 fracciones de 2000 cc cada una, se eluyen primeramente 32 g de una mezcla de alcaloides constituida
 20. predominantemente por vobasina. En la elución ulterior con benceno-éter (7:3), en 5 fracciones de 2000 cc cada una, se obtienen 21 g de 20'-hidroxi-voacamidina bruta. Se disuelve ésta en 100 cc de acetona y, por instilación de 10 cc de una solución etérea de cloruro de hidrógeno
 25. saturada en frío, se la convierte en el diclorhidrato. Se filtra por succión y se recrystaliza a partir de metanol-acetona. Se obtienen 16 g de diclorhidrato puro de 20'-



hidroxi-voacamidina, de la fórmula aditiva $C_{43}H_{52}O_6N_4 \cdot 2 HCl \cdot H_2O$ (calculado: C 63,6 H 6,91 N 6,90 Cl 8,76 %; hallado: C 63,11 H 6,67 N 6,94 Cl 9,06 %), de punto de fusión $300^{\circ} C$ (carbonización); $[\alpha]_D^{22} = -137,7^{\circ}$ (en metanol, $c = 1$).

- 5.
- Los nuevos agentes de este invento para la inhibición del crecimiento de las neoplasias contienen como materia activa la 20'-hidroxi-voacamidina, o una sal atóxica de la misma, en una forma usual de dosificación unitaria, en particular para la administración oral. Por sales atóxicas se entienden las sales con los ácidos que en las dosis administradas no pueden motivar ningún síntoma tóxico o, respectivamente, ningún síntoma tóxico adicional. Para la formación de las sales entran en consideración, por ejemplo, los ácidos siguientes: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metansulfónico, ácido etandisulfónico, ácido beta-hidroxi-etan-sulfónico, ácido canfosulfónico, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 4,4'-metilenbis-3-hidroxi-2-naftoico (ácido embónico), ácido fenilacético y ácido mandélico.
- 10.
- 15.
- 20.

- 25.
- Las formas de dosificación unitaria para el uso oral contienen preferentemente como materia activa entre 10 % y 90 % de 20'-hidroxi-voacamidina o de una sal atóxica de la misma. Para su preparación, se combina la materia activa, por ejemplo, con materias de vehículo só-



- lidas, en forma de polvo, como lactosa, sacarosa, sorbita, manita; almidones, como el almidón de patata, el almidón de maiz o la amilopectina; laminaria en polvo o pulpa cítrica en polvo; derivados de celulosa o gelatinas, eventualmente con adición de deslizantes, como estearato magnésico o cálcico o polietilenglicoles (carbowaxes) de peso molecular apropiado, para formar pastillas o núcleos para grageas. Estos últimos se recubren, por ejemplo, con soluciones de azúcar concentradas, las cuales pueden contener todavía, por ejemplo, goma arábiga, talco y/o dióxido de titanio, o con una laca disuelta en disolventes orgánicos, o mezclas de disolventes orgánicos, de fácil volatilidad. A estas envolturas pueden añadirse colorantes, por ejemplo con el fin de caracterizar dosis diferentes de materia activa.
- 5.
- 10.
- 15.

- Como otras formas de aplicación entran en consideración, por ejemplo, soluciones acuosas (eventualmente amortiguadas) de sales y dispersiones acuosas de la base, en particular suspensiones preparadas con ayuda de dispersantes usuales apropiados, para administración parenteral, por ejemplo endovenosa y respectivamente subcutánea o intramuscular.
- 20.

- De los ensayos en animales cabe deducir para el tratamiento de las neoplasias, como por ejemplo el linfogranuloma (enfermedad de Hodgkin) y las leucemias, dosis de 1 a 3 g de 20'-hidroxi-voacamidina en los adultos, como choques de tratamiento en intervalos de varios días; pero,
- 25.



en vista de la buena compatibilidad, entra también en cuenta la administración diaria de dosis correspondientemente reducidas, lo mismo que la administración parenteral. Sin embargo, la acción de la 20'-hidroxi-voacamidina contra las neoplasias en el hombre no se ha comprobado todavía.

5.

El ejemplo que sigue describe la preparación de una forma de aplicación típica, apropiada para tal tratamiento; no obstante, no debe limitar de modo alguno el ámbito de este invento, ni respecto a la cantidad de materia activa, ni respecto a las materias de adición.

10.

EJEMPLO 2

Se mezclan 500 g de hidrato de diclorhidrato de 20'-hidroxi-voacamidina con 70,5 g de almidón de maiz o de patata y 45 g de lactosa. Se moja la mezcla con una solución acuosa de 25 g de gelatina, se la granula pasándola por un tamiz y se la seca. El granulado obtenido se combina con 28 g de almidón, 28,0 g de talco y 3,5 g de estearato de magnesio y se comprime en pastillas con el contenido de materia activa deseado; por ejemplo, en 1000 pastillas de unos 700 mg de peso cada una, con 500 mg cada una de materia activa, o en 2000 pastillas de 250 mg de materia activa cada una, que si se quiere pueden proveerse de entallas para fraccionarlas.

15.

20.

25.

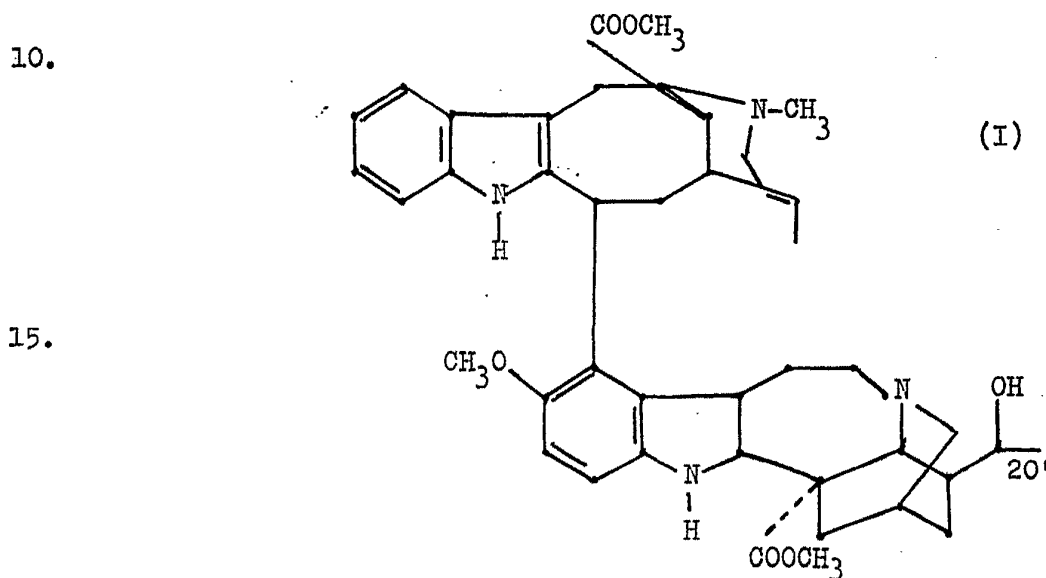
- - - - -



N O T A

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente suiza nº 12 527/65 del 8 de Septiembre de 1965.

5. 1. Procedimiento para la obtención de una nueva materia farmacológicamente activa y de sus sales, caracterizado por extraerse de las plantas del género Voacanga la 20'-hidroxi-voacamidina, de la fórmula I



20. y, si se quiere, transformarse la base obtenida en una sal de adición con un ácido inorgánico u orgánico.



2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por extraerse corteza de Voacanga afrinaca Stapf.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por humedecerse corteza de Voacanga africana Stapf con una base acuosa y percolarla con un hidrocarburo aromático o un halohidrocarburo, líquidos, concentrarse la fase orgánica, someterse el extracto total obtenido a una distribución multiplicativa entre ácido acético diluido y un disolvente orgánico, o mezcla de disolventes orgánicos,
5. no miscible con el agua, separarse los componentes con un coeficiente de distribución $K > 1$, someterse los componentes con un coeficiente de distribución $K < 1$ a una distribución de Craig entre amortiguador de ácido cítrico/fosfato a pH 4,70 y mezcla de benceno/éter y combinarse y evaporarse las fracciones medias de la distribución de Craig con $K \approx 1$.
- 10.
- 15.

4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 3, que se caracteriza en que la 20'-hidroxi-voacamidina bruta se absorbe en óxido de aluminio y se eluye con benceno/éter.
- 20.

5. Procedimiento para la obtención de una nueva materia farmacológicamente activa y de sus sales.

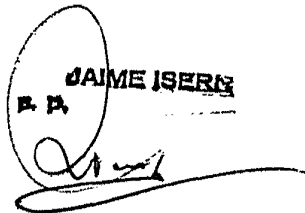
Según se describe y reivindica en la presente me-



moria descriptiva que consta de 15 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 7 de Septiembre de 1966

p.a.


Firmado: JOSÉ RODRIGUEZ