



## (12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 33861 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 36/00; A61K 36/47**
- (43) Date de publication : **02.01.2013**

- 
- (21) N° Dépôt : **33831**
- (22) Date de Dépôt : **11.05.2011**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BENABDALLAH, institut national des plantes medecinales et aromatiques, BP 159 taounate principal (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **ECH-CHAHAD ABDELLAH**
- (74) Mandataire : **ECH-CHAHAD ABDELLAH**

- 
- (54) Titre : **Utilisation d'une nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de l'Euphorbia Résinifera Berg**
- (57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE L'UTILISATION D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE POUR LA PRODUCTION DE LA RÉSINIFERATOXINE À PARTIR DU LATEX DE L'EUPHORBIE RÉSINIFERA BERG., PLANTE ENDÉMIQUE DU MAROC. LA RÉSINIFERATOXINE EST CONNU DANS LE MONDE MÉDICINAL COMME UN AGONISTE SURPUISSANT SUR LE RÉCEPTEUR DE VANILLOÏDE TRPV-1. LES MÉTHODES D'EXTRACTION UTILISÉES POUR L'OBTENTION DE LA RÉSINIFÉRATOXINE ONT ÉTÉ REMISES À L'ÉTUDE. LA NOUVELLE MÉTHODE QUE NOUS AVONS INVENTÉE A PERMIS D'AMÉLIORER LE RENDEMENT D'EXTRACTION DE LA RÉSINIFERATOXINE ET DONNER BEAUCOUP DE SÉCURITÉ AU MANIPULATEUR CONTRE LA TOXICITÉ DU LATEX L'EUPHORBIA RÉSINIFERA BERG. CETTE NOUVELLE TECHNIQUE POUR LA PRODUCTION DE LA RÉSINIFERATOXINE À PARTIR DU LATEX DE L'EUPHORBIA RÉSINIFERA BERG., OUVRE LA VOIE VERS UNE PRODUCTION INDUSTRIELLE DE LA RÉSINIFÉRATOXINE.

## **Abrégé**

La présente invention concerne l'utilisation d'une nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de *Euphorbia Résinifera* Berg., plante endémique du Maroc. La résiniferatoxine est connu dans le monde médicinal comme un agoniste surpuissant sur le récepteur de vanilloïde TRPV-1. Les méthodes d'extraction utilisées pour l'obtention de la résinifératoxine ont été remises à l'étude. La nouvelle méthode que nous avons inventée a permis d'améliorer le rendement d'extraction de la résiniferatoxine et donner beaucoup de sécurité au manipulateur contre la toxicité du latex *Euphorbia résinifera* Berg. Cette nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de *Euphorbia Résinifera* Berg., ouvre la voie vers une production industrielle de la résinifératoxine.

## **Utilisation d'une nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de *Euphorbia Résinifera* Berg.**

La présente invention concerne une nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de l'*Euphorbia résinifera* Berg. Cette nouvelle technique résout beaucoup des problèmes liés à la toxicité du latex de l'*Euphorbia résinifera* Berg., ce qui rend l'exploitation de cette source naturelle plus facile.

La résiniferatoxine est une substance végétale, isolée pour la première en 1975 à partir du latex de l'*Euphorbia résinifera* Berg (Hergenhahn et al. *Tetrahedron Lett.* 1975, 1595-1598). En 1999 elle a été reconnue comme un agoniste surpuissant du récepteur de vanilloïde TRPV-1 (Szallasi et al. *Pharmacol. Rev.* 1999, 51, 159-211). Actuellement elle est testée en traitement anti-douleur. Son action est semblable à la capsaïcine, mais en 1000 fois plus puissante (Menendez et al. *Neuroscience letters.* 2006, 393, 70-73).

Les méthodes classiques d'extraction de la résiniferatoxine à partir de l'*Euphorbia résinifera* Berg., à savoir par macération en contact d'un solvant, donne beaucoup de difficulté au manipulateur dû à l'offensivité de la résiniferatoxine (substance très irritante). Ces difficultés présentent un obstacle majeur pour les industrielles pour la production de cette substance si importante dans la recherche neuropharmacologique.

Dans ce travail on présente une nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de l'*Euphorbia Résinifera* Berg., avec beaucoup de simplicité et de sécurité au manipulateur.

Nous avons pris la méthode réalisée par Fattorusso et al (*Eur. J. Org. Chem.* 2002, 1, 71-78) comme point de départ dans notre travail. Cette méthode a montré des difficultés, en particulier, l'irritation causée par la résiniferatoxine, la formation d'une émulsion qui rend, d'une part, la séparation des phases très difficile et, d'autre part, l'utilisation de l'acétate d'éthyle entraîne la fraction tri terpénique non souhaitable. De plus le procédé d'extraction reste trop long. Afin d'éviter ces problèmes nous avons pensé de faire l'extraction par une solution de méthanoate de sodium dans le but d'hydrolyser de la résinifératoxine au résiniféronol orthophénylacetate (ROPA), ce dernier composé n'est pas irritant et on peut le manipuler sans problème dans les conditions normales des laboratoires académiques et des laboratoires et des usines industrielles. En suite on prépare la résiniferatoxine à partir du résiniféronol orthophénylacetate (ROPA) par hémisynthèse.

Le résiniféronol orthophénylacetate (ROPA) est mis en solution dans le tétrahydrofurane en présence du diisopropyl azodicarboxylate et la triphénylphosphine. Dans ces conditions le résiniféronol orthophénylacetate (ROPA) réagit avec l'acide homovanilique pour donner la résiniferatoxine.

Le processus se fait en deux étapes et il fournit un rendement de 0,2% du ROPA à partir de latex de l'*Euphorbia resinifera* Berg., et un rendement de 67% de la résinifératoxine à partir du ROPA.

Etape 1 : Extraction du résiniféronol orthophénylacetate à partir du latex de l'*Euphorbia resinifera* ;

1Kg de latex sec d'*Euphorbia resinifera* Berg., est traité avec 2.5 litres d'une solution de méthanoate de sodium à pH = 10,5. La solution est mise sous agitation durant 24 heures. La solution obtenue est neutralisée par 30 ml d'une solution d'acide acétique (pH = 7). La solution est filtrée sous vide. Le filtrat est lavé avec 100 ml d'éther de pétrole pour éliminer les traces des substances triterpéniques restant en solution. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (400 g de silice) sous pression atmosphérique. L'élution avec l'éther de pétrole et l'acétate d'éthyle (60:40) a donné ROPA (2 g, 0,2%, identifiés par comparaison (RMN, MS, HPLC) avec un échantillon commercial.

Etape 2 : Hémi-synthèse de la résinifératoxine.

A une solution de 1 g de ROPA (2,13 mmoles) dans 5 ml de Tétrahydrofurane (THF) anhydre sont ajoutés, à 0°C, 0,659 g d'acide homovanillique (2,13 mmoles) en maintenant la solution sous agitation magnétique. Puis 1,2 équivalents de triphénylphosphine et 1.2 équivalents de Diisopropylazodicarboxylate (DIAD) sont introduits. La solution est ensuite agitée à température ambiante pendant 2 heures. Après évaporation du THF, le résidu obtenu est repris dans le toluène puis laissé pendant une nuit à 4° C pour la précipitation de DIAD réduit et de la triphénylphosphine oxydée. La solution est ensuite filtrée. Le toluène est évaporé et le résidu est chromatographié sur gel de silice en utilisant comme éluant l'éther de pétrole et l'acétate d'éthyle (80/20) pour donner 1,16 g de la résinifératoxine avec un rendement de 67%.

L'amélioration que nous avons apportée consiste à résoudre les problèmes liés aux dangers et à la toxicité du latex en faisant recours à l'utilisation d'une solution basique de NaOMe à un pH = 10,5 très bien contrôlé tout au long de la durée de l'extraction. L'utilisation de la solution basique de NaOMe permette à la fois l'hydrolyse de la résinifératoxine au résiniféronol orthophénylacetate, ce dernier composé n'est pas irritant et on peut le manipuler sans problème dans des conditions normales des laboratoires académiques et des laboratoires et des usines industrielles.

## Revendications

1. Nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de *Euphorbia Résinifera* Berg., cette technique étant caractérisé en ce que le liquide d'extraction est une solution basique.
2. Nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de *Euphorbia Résinifera* Berg., selon la revendication 1 caractérisée en ce que la solution basique utilisée est le méthanoate de sodium (NaOMe).
3. Nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de *Euphorbia Résinifera* Berg., selon la revendication 1 caractérisée en ce que la solution utilisée pour l'extraction a un pH = 10.5.
4. Nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de *Euphorbia Résinifera* Berg., selon la revendication 1 caractérisée en ce que la solution basique hydrolyse la résiniferatoxine en la transformant en résiniféronol orthophénylacetate (ROPA).
5. Nouvelle technique pour la production de la résiniferatoxine à partir du latex de *Euphorbia Résinifera* Berg., selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'extraction de la résiniferatoxine se fait d'une manière indirecte en passant par le résiniféronol orthophénylacetate.