



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

258114

(11) (B2)

{51} Int. Cl.⁴
C 07 H 1/06

{22} Přihlášeno 22 12 83

{21} (PV 9802-83)

{32} {31} {33} Právo přednosti od 23 12 82
(24939 A/82) Itálie

{40} Zveřejněno 17 12 87

{45} Vydáno 15 12 88

{72}

Autor vynálezu

OPPICI ERNESTO, MILÁN, VARESIO CARLO, TORINO,
GIACOMA ROSA ONORINO, SAN RAFFAELE CIMENA, TORINO
(Itálie)

{73}

Majitel patentu

FARMITALIA CARLO ERBA S.p.A., MILÁN (Itálie)

{54} Způsob čištění surových anthracyklinových glykosidů

1

2

Způsob čištění surových anthracyklinových glykosidů od organických nebo anorganických nečistot spočívá v tom, že se vodný roztok surového glykosidu o pH 3 až 5 a koncentraci 0,3 až 0,5 % hmot. objemových adsorbuje na polymerní styren-divinylbenzenové pryskyřici nebo slabě kyselé kationtoměničové pryskyřici nebo na karboxymethylcelulóze, anthracyklinový glykosid se desorbuje směsí vody a polárního rozpouštědla, popřípadě okyselené anorganickou kyselinou, o pH 2,5 až 3,5, eluát se readsorbuje na uvedenou polymerní nebo kationtoměničovou pryskyřici nebo na karboxymethylcelulózu, dále se desorbuje elucí polárním rozpouštědlem nebo svrchu uvedenou směsí rozpouštědel, odpaří ve vakuu a potom se takto přečištěný anthracyklinový glykosid o obsahu nejvýše 3 % hmot. nečistot izoluje.

Vynález se týká způsobu čištění anthracyklinových glykosidů pomocí selektivní adsorpce na pryskyřicích nebo na karboxymethylcelulóze.

Požadavek vysoce specifické metody použitelné při získávání uvedených glykosidů, které jsou v podstatě v čisté formě, vyplývá z toho, že jak u fermentačního, tak u syntetického způsobu výroby je množství organických a anorganických nečistot v surovém produktu vysoké a pohybuje se v rozmezí od 12 do 25 %.

Dosud obvyklé metody, používané při známých způsobech čištění, provádějící extrakci surového produktu chlorovanými rozpouštědly s následujícím promýváním pufrů, však vedou ke konečnému produktu, kde je procento nečistot, i když je podstatně sníženo, v rozmezí od 4,5 do 5,0 % hmot.

I když se takto získaný standard čistoty obecně pokládal jako přijatelný, vezme-li se v úvahu mimořádná citlivost glykosidové molekuly k manipulaci a chemickým činidlům, stimuloval náš zájem při hledání zlepšené čistící metody, umožňující získávat v podstatě čistý konečný produkt.

Uvažujeme-li speciální použití anthracyklinových glykosidů v klinické praxi jako antitumorálních prostředků a vedlejší problémy dávkování a toxicity, pak optimální eliminace nečistot, obvykle vysoce toxických, je zřejmým potvrzením užitečnosti tohoto vynálezu.

Předmětem vynálezu je tedy způsob čištění surových anthracyklinových glykosidů, získaných fermentačně nebo synteticky, od anorganických nebo organických nečistot a spočívá v tom, že se vodný roztok surového glykosidu o hodnotě pH 3 až 5 a koncentraci 0,3 až 0,5 % hmot. objemových adsorbuje na 50 až 400 ml polymerní styren-divinylbenzenové pryskyřice nebo slabě kyselé kationtoměničové pryskyřice nebo na karboxymethylcelulóze, anthracyklinový glykosid se desorbuje elucí směsí 1 až 3 dílů objemových vody a až 10 dílů objemových polárního rozpouštědla, například methanolu nebo ethanolu, popřípadě okyselené až 0,2 díly objemovými anorganické kyseliny, například kyseliny chlorovodíkové, o hodnotě pH 2,5 až 3,5, eluát se readsorbuje na uvedenou polymerní nebo kationtoměničovou pryskyřici nebo na karboxymethylcelulózu, přičemž adsorbentová pryskyřice je zvolena ze svrchu uvedeného souboru, avšak je popřípadě odlišná od typu použitého v prvním adsorpčním stupni, dále se přečistěný anthracyklinový glykosid desorbuje elucí polárním rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel, jaká je uvedena svrchu, eluát se odpaří za sníženého tlaku a potom se takto přečistěný anthracyklinový glykosid o obsahu nejvýše 1,5 až 3 % hmot. nečistot izoluje.

Při výhodném provedení navrženého způsobu čištění se adsorpce roztoku, obsahujícího

surový produkt určený k čištění, na pryskyřici provádí za použití jednoho typu pryskyřice nebo na různých typech pryskyřic ve vhodně zvoleném pořadí, v závislosti na povaze odstraňovaných nečistot.

Adsorpční pryskyřice může být obsažena ve vhodném zásobníku nebo nádobě, která má v podstatě tvar věže nebo kolony, vhodně naplněné částicemi pryskyřice. Umístění karboxymethylcelulózy v pracovním prostoru je analogické. V závislosti na druhu nečistot obsažených v surovém produktu, eluát získaný desorpční látkou z jednoho druhu pryskyřice lze potom výhodně adsorbovat na pryskyřici odlišného druhu, z níž je potom eluován známým způsobem.

Při našem chromatografickém čistícím způsobu byly použity adsorpční pryskyřice polymerního a iontoměničového typu a typu karboxymethylcelulózy; přesný výběr, vhodný sled při použití různých druhů pryskyřice podle surového produktu, který má být čištěn, mírně kyselé prostředí během adsorpce, umožňují získávat vysoký stupeň čistoty konečného produktu, eliminací použití chlorovaných rozpouštědel a výborné výtežky během čištění.

Následující příklady ilustrují použití vynálezu, aniž by jej omezovaly.

Příklad 1

Čištění 4-desmethoxydaunorubicinu

15,0 g 4-desmethoxydaunorubicinu v surovém stavu, s obsahem látky 70,2 % a s obsahem nečistot 18 %, se rozpustí v 3,6 l 0,5% roztoku octanu sodného. Roztok, jehož hodnota pH byla upravena na 4,7 přidáním kyseliny octové, se adsorbuje na 400 ml pryskyřice Amberlit XAD2 (Rohm and Haas) na koloně o průměru 2,5 cm. Produkt se promyje 1 000 ml vody a potom se eluuje směsí voda-methanol (5:1 obj./obj.). Nejprve se odebere 2 000 ml roztoku obsahujícího aglykony a různé nečistoty.

Eluce pokračuje směsí voda-methanol (1:1 obj./obj.) a shromáždí se frakce 4 500 mililitrů; eluát obsahuje v roztoku 4-desmethoxydaunorubicin spolu s 10 % nečistot.

Hodnota pH eluátu se upraví na 2,8 přidáním kyseliny chlorovodíkové, potom se koncentruje ve vakuu na objem 1 500 ml. Přidáním octanu sodného se hodnota pH koncentrovaného roztoku upraví na 4,0 a slabě kyselý roztok se adsorbuje na 150 ml CM Sepharosy Cl 6B (Pharmacia), obsažené v koloně o průměru 2,5 cm, rychlostí 150 mililitrů/h. Po dokončené adsorpci se kolona promývá nejprve 450 ml vody a potom se eluuje 0,03% kyselinou chlorovodíkovou.

Hodnota pH v prvních 800 ml eluátu obsahujících 18 % nečistot, byla upravena přidáním octanu sodného na 4,7 a roztok přidán pro recyklování k roztoku surového 4-desmethoxydaunorubicinu, který byl ad-

sorbován na amberlitovou pryskyřici XAD2 pro prvý čistící stupeň.

Následující eluát (3 500 ml), obsahující čistý 4-desmethoxydaunorubicin, se koncentruje ve vakuu na objem 50 ml, přidá se 250 ml acetonu, získaná sraženina se odfiltruje, promyje acetonem a suší. Získá se 52% výtěžek 4-desmethoxydaunorubicinu, počítáno na výchozí surový produkt, obsahuje 97 % látky a obsah nečistot je nižší než 3 %.

Příklad 2

Čistění daunorubicinu

15,0 g chlorovaného daunorubicinu, o obsahu 74,2 % látky a o obsahu nečistot 8,5 procent, se rozpustí ve 4 500 ml vody. Hodnota pH roztoku se upraví na 5,0 přidáním octanu sodného a adsorbuje se na 400 ml pryskyřice S112 Kastell nebo Amberlit ER 180 (Rohm and Haas), na koloně o průměru 2,5 cm a při průtokové rychlosti 600 ml na hodinu (1,5 obj.).

Roztok se promyje 1 000 ml 1% roztoku chloridu sodného a eluuje se směsí voda-ethanol (1:1 obj./obj.).

Prvé frakce (400 ml), obsahující aglykony v roztoku, se odstraní a eluce pokračuje shromážděním dalších 260 ml eluátu obsahujícího čistý daunorubicin. Hodnota pH se upraví na 2,5 přidáním zředěné kyseliny chlorovodíkové, k roztoku se přidá aceton a produkt se nechá krystalovat po dobu 6 hodin při teplotě +5 °C. Produkt se odfiltruje, promyje acetonem a suší po dobu 12 hodin ve vakuu.

Daunorubicin se takto získává ve výtěžku 80 %, vztaženo na výchozí produkt, s následujícími vlastnostmi, které byly zjištěny pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie: obsah 97 %, obsah nečistot 2,6 %.

Příklad 3

Čistění 4-desmethoxydoxorubicinu

2 000 ml vodného roztoku obsahujícího 10,4 g 4-desmethoxydoxorubicinu o obsahu 14 % nečistot se adsorbuje na 50 ml pryskyřice ER 180 (Rohm and Haas) umístěné v koloně o průměru 2,5 cm, rychlostí 250 mililitrů/h.

Eluát, parciálně zbavený selektivní adsorpcí nečistot, se potom adsorbuje na 200 mililitrů pryskyřice CM Sepharose Cl 6B (Pharmacia). Produkt je potom eluován směsí methanol 50, voda 50 a koncentrovaná kyselina chlorovodíková 0,015, přičemž první frakce (asi 800 ml), obsahující aglykony a další nečistoty, se odstraní. Odebere se potom 2 000 ml eluátu obsahujícího čistou látku a koncentruje se ve vakuu na objem 60 ml. Přidá se 300 ml acetonu za míchání po dobu 3 hodin. Sraženina se odfiltruje, promyje acetonem a suší. Získá se 6,5

gramu čistého 4-desmethoxydoxorubicinu, tj. o 58,2 % výtěžku a o obsahu nečistot 3 %.

Příklad 4

Čistění 4'-desoxydoxorubicinu

15,0 g 4'-desoxydoxorubicinu o obsahu 69,2 % a s obsahem organických nečistot 12 % a s obsahem 12 % minerálních solí, se rozpustí ve 2 000 ml vody a adsorbuje na 300 ml pryskyřice CM Sephadex C25 rychlostí 600 ml/h. Po skončené adsorpci se roztok eluuje 0,03% kyselinou chlorovodíkovou a získá se 6 500 ml frakce obsahující 4'-desoxydoxorubicin.

Hodnota pH uvedeného eluátu se upraví na 3,8 přidáním roztoku hydroxidu sodného a eluát se adsorbuje na 200 ml pryskyřice S112 Kastell rychlostí 400 ml/h. Produkt se promyje 600 ml vody a potom se eluuje methanolem okyseleným na hodnotu pH 2,0 kyselinou chlorovodíkovou.

Získá se 600 ml jádra eluátu, který se koncentruje ve vakuu na 60 ml. Zkoncentrovaný roztok se pomalu vlije do 600 ml acetonu. Vzniklá sraženina se odfiltruje, promyje acetonem a suší. Získá se 61% výtěžek 4'-desoxydoxorubicinu o obsahu 98,5 procent a o obsahu nečistot 4,2 %.

Příklad 5

Čistění 4'-epidoxorubicinu

15,0 g surového 4'-epidoxorubicinu o obsahu 75,9 % a s obsahem nečistot 15 % se rozpustí ve 4 000 ml vody.

Hodnota pH roztoku se upraví na 4,3 přidáním mravenčanu sodného a roztok se adsorbuje na 400 ml pryskyřice Amberlit IRC 724, umístěné na koloně o průměru 2,5 cm, rychlostí 1 600 ml/h (4 obj.).

Kolona se promyje 800 ml vody a potom se eluuje směsí 95 methanolu, 5 vody a 0,015 koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Odebírá se 4 000 ml jádra eluátu se 4'-epidoxorubicinem, obsahujícím ještě 10 % nečistot a 1 500 ml konečného eluátu s převládajícím obsahem nečistot.

Jádro eluátu se koncentruje na 1 500 ml, hodnota pH se upraví na 4,8 přidáním mravenčanu sodného a adsorbuje se na 250 ml karboxymethylcelulóze pryskyřice (Wathman), umístěné na koloně o průměru 2,5 cm rychlostí 500 ml/h (2 obj.).

Po skončené adsorpci se produkt promyje směsí 99,3 ethanolu, 0,7 vody a 0,015 koncentrované kyseliny chlorovodíkové a potom eluuje směsí 90 ethanolu, 10 vody a 0,05 koncentrované kyseliny chlorovodíkové, přičemž se shromažďuje 3 200 ml jádra eluátu.

Eluát se koncentruje ve vakuu na 60 ml a produkt se sráží přidáním 300 ml acetonu.

Získá se 6,9 g 4'-epidoxorubicinu o obsa-

hu 91,2 % a o obsahu nečistot 3 %. Výtěžek: 55,3 %.

Příklad 6

Čistění doxorubicinu

a) 70 g doxorubicinu se rozpustí ve 28 ml vody, hodnota pH se upraví na 3,7 až 4,5 přidáním pufru a roztok se adsorbuje na 2 litrech pryskyřice S112 Kastell, umístěné na koloně o průměru 6 cm. Produkt se eluuje směsí 35 litrů vody a 15 litrů methanolu.

40 litrů eluátu se koncentruje ve vakuu na 0,5 litru a produkt vykřystaluje přidáním směsi 1 litru ethanolu a 4,5 litru acetonu za míchání při teplotě $+5^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 hodin.

Produkt se odfiltruje, promyje acetonem a suší ve vakuu při teplotě $+40^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 hodin.

Získá se 56,0 g předčistěného doxorubicinu (I).

b) 80,0 g předčistěného doxorubicinu (I), získaného postupem podle a), se rozpustí ve 24 litrech vody a hodnota pH se upraví na 4,0 přidáním pufru.

Roztok se adsorbuje na koloně o průměru 12 cm a obsahující 1,6 l karboxymethylcelulózové pryskyřice Wathman.

Eluent z kolony se odstraní.

Po promytí 3,2 l vody se produkt eluuje 55 l vody o hodnotě pH 2,5 po přidání kyseliny chlorovodíkové.

Shromáždí se 46 l eluátu a koncentruje ve vakuu na objem 0,6 l a produkt se nechá krystalovat po opatrném přidavku směsi isopropylalkohol-aceton 1 : 3.

Produkt se odfiltruje, promyje 1 l acetonu a suší po dobu 4 hodin při teplotě $+40^{\circ}\text{C}$.

Získá se 65 g doxorubicinu o obsahu 98,5 procent a obsahu 1,5 % nečistot.

V předcházejících příkladech 1 až 6 se používá různých typů pryskyřic, které jsou v textu označovány ochrannými známkami. Uvádí se bližší charakterizace těchto typů pryskyřic:

Všechny typy pryskyřic Amberlit a Kastell jsou tvořeny zesíťovanými styren-divinylbenzenovými kopolymery.

Všechny typy pryskyřic Sepharose jsou z agaróny ve formě kuliček.

Sepharexové pryskyřice jsou vyrobeny na bázi dextranu a jsou ve formě kuliček.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob čistění surových anthracyklinových glykosidů, získaných fermentačně nebo synteticky, od organických nebo anorganických nečistot, vyznačující se tím, že se vodný roztok surového glykosidu o hodnotě pH 3 až 5 a koncentraci 0,3 až 0,5 % hmot. objemových adsorbuje na 50 až 400 mililitrech polymerní styren-divinylbenzenové pryskyřice nebo slabě kyselé kationtoměníčové pryskyřice nebo na karboxymethylcelulóze, anthracyklinový glykosid se desorbují elucí směsí 1 až 3 dílů objemových vody a až 10 dílů objemových polárního rozpouštědla, například methanolu nebo ethanolu, popřípadě okyselená až 0,2 díly objemovými anorganické kyseliny, například kyseliny chlorovodíkové, o hodnotě pH 2,5 až 3,5, eluát se readsorbuje na uvedenou polymerní nebo kationtoměníčovou prysky-

řici nebo na karboxymethylcelulózu, přičemž adsorbentová pryskyřice je zvolena ze souboru uvedeného, avšak je popřípadě odlišná od typu použitého v prvním adsorpčním stupni, dále se desorbují přečistěný anthracyklinový glykosid elucí polárním rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel, jako je uvedena výše, eluát se odpaří ve vakuu a potom se takto přečistěný anthracyklin o obsahu nejvýše 1,5 až 3 % hmotnostní nečistot izoluje.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že adsorpce roztoku, obsahujícího surový produkt určený k čistění, na pryskyřici se provádí za použití jednoho typu pryskyřice nebo, v závislosti na povaze nečistot, různých typů pryskyřic ve zvoleném pořadí.