



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 57760

C (45) Patentti myönnetty 10 10 1980
Patentmeddelat
(51) Kv.kl./Int.Cl. C 07 D 519/04

SUOMI—FINLAND
(FI)

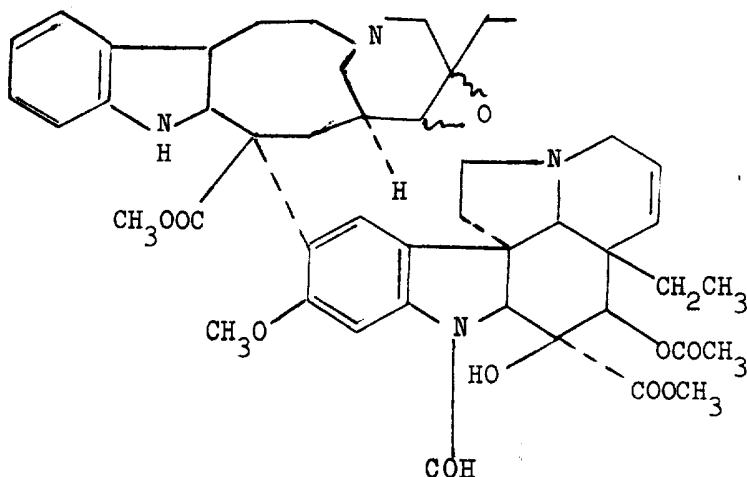
Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	347/74
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	07.02.74
(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag	07.02.74
(41) Tulut julkiseksi — Blivit offentlig	17.08.74
(44) Nähtävääksipanon ja kuuljulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.06.80
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	16.02.73

Unkari-Ungern(HU) RI-502

- (71) Richter Gedeon Vegyészeti Gyár R.T., 21 Gyömrői ut, Budapest X,
Unkari-Ungern(HU)
- (72) Karola Jovánovics, Budapest, Kálmán Szász, Budapest, Béla Kellner,
Budapest, László Németh, Budapest, Zsuzsa Relle, Budapest, Emil
Bittner, Budapest, Eszter Dezséri, Budapest, János Éles, Budapest,
Unkari-Ungern(HU)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Menetelmä tuumorien kasvua estävän N-formyylileurosiinin valmistami-
seksi - Förfarande för framställning av tillväxt av tumörer för-
hindrande N-formylleurocin

Keksinnön kohteena on menetelmä tuumorien kasvua estävän N-formyylileurosiinin valmistamiseksi, jonka kaava on



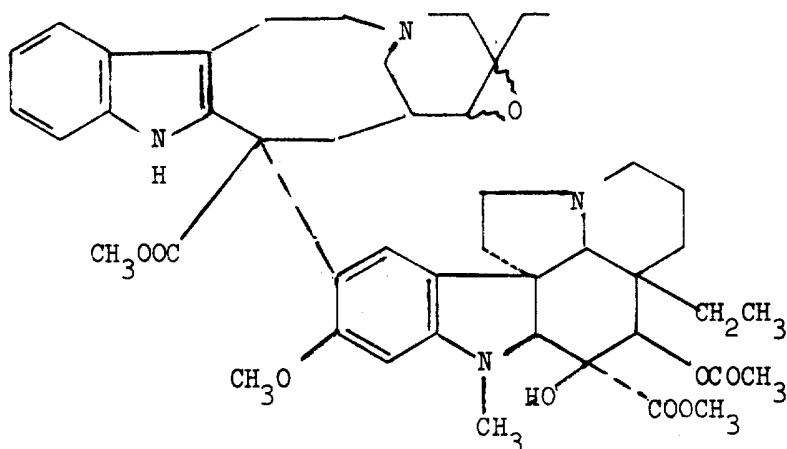
ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävien happoadditiosuolojen valmistamiseksi.

Viime vuosikymmeninä on suoritettu hyvin intensiivistä tutkimustyötä lääkkeiden valmistamiseksi, jotka ovat käyttökelpoisia syövän hoitoon. Tämän kauaskantoisen tutkimustyön aikana on suoritettu aineille, joilla on mitä erilaisimmat kemialliset rakenteet, biologisia ja kliinisiä tutkimuksia, mutta vain hyvin rajoitettu lukumäärä näistä aineista on todettu parantaviksi ihmisten hoidossa. Näistä harvoista farmaseuttisista tuotteista, jotka ovat osoittaneet positiivisia tuloksia kliinisessä käytössä, on di-indolialkaloidit (dimeeriset indolialkaloidit) todettu oivallisen merkittäviksi. Tällaisia di-indolialkaloideja ovat esimerkiksi vinkaleukoblastiini (vinblastiini), leurokristiini (vinkristiini), vinleurosiidiini (leurosiidiini), vinleurosiini (leurosiini) jne. Kaikkia näitä yhdisteitä valmistettiin, tuloksena laajasta tutkimustyöstä, kasvista, jonka nimi on *Cathareanthus roseus* G. Don (tai vinka rosea L.), ja joka kuuluu Apocynaceae-sukuun. Näitä di-indolialkaloideja on noin 1-3 % kasvin koko alkaloidipitoisuudesta ja kasvi sisältää yli 70 eri alkaloidia. Rakenneanalyysin avulla on todettu, että di-indolialkaloideilla on hyvin samanlaiset rakenteet, niinpä esimerkiksi vinblastiini- ja vinkristiinimolekyylit sisältävät kumpikin yhden osan, joka on velbanamiinirakennetta, ja toisen osan, joka sisältää indoliinirungon; ainoa ero on se, että molekyylin vindoliiniosa sisältää N-metyyliryhmän vinblastiinissa ja N-formyyliryhmän vinkristiinissä. Tämä vähäinen rakenteellinen ero aiheuttaa kuitenkin huomattavan eroavaisuuden näiden yhdisteiden biologisissa aktiviteeteissa; vinkristiinin on nimittäin todettu olevan aktiivisempaa sekä eläinkokeissa että ensisijaisesti ihmisten hoidossa.

Leurosiini eroaa rakenteeltaan edellä mainitusta vinblastiinista tai vinkristiinistä sikäli, että se sisältää epoksi-velbanamiiniosan velbamiinin sijasta.

Edellämainittuja di-indolialkaloideja ja niiden happoadditiosuoloja sekä näiden yhdisteiden valmistusta on selostettu monissa julkaisuissa, joista mainitakoon US-patenttijulkaisut 3 097 137, 3 205 220 ja 3 225 030 sekä HU-patenttijulkaisut 153 200, 154 715 ja 160 967.

Keksinnölle on tunnusomaista, että leurosiini, jonka kaava on



tai leurosiinin happoadditiosuola hapetetaan kromihapolla tai sen suolalla lämpötilassa alle -30°C , ja saatu yhdiste formyloidaan ja erotetaan, ja vapaa happo haluttaessa muutetaan happoadditiosuolakseen.

Keksinnön mukaisesti valmistetulla N-formyyllileurosiinilla on tärkeitä etuja verrattuna vinkristiiniin, joka on tunnettu ja tähän asti parhaana pidetty tuumorien kasvua estävä yhdiste. Uuden yhdisteen myrkyllisyys on huomattavasti alhaisempi: LD_{50} on hiirillä intraperitoneaalisesti annettuna 28,8 mg/kg, kun taas vinkristiinin vastaava arvo on 4,0 mg/kg. Vinkristiinillä on haitallinen sivuvaikutus; joissain tapauksissa tämän yhdisteen antamisesta aiheutuu halvaus-symptooneja syystä, että vinkristiini on hermomyrkkä. Keksinnön mukaisesti valmistetulla yhdisteellä ei ole tällaista sivuvaikutusta. Uusi yhdiste on tehokas myös sellaisia tuumoreita vastaan, joihin vinkristiini ei vaikuta. Vinkristiini on täysin tehoton rottien VX-2 karsinoomaa vastaan myrkyllisinäkin annoksina annettuna, kun taas uudella yhdisteellä on 70-100 %:n estovaikutus päivittäisen intravenoosisen annoksen ollessa 3 mg/kg. Vinkristiini on tehoton Harding-Passey-melanoomaa vastaan, kun taas uuden yhdisteen estovaikutus on 47-%:inen annettaessa yhdistettä 14 päivän ajan intraperitoneaalisesti päivittäin 5 mg/kg. Vinkristiini estää Rhabdomyo-sarkooman kasvun 25-%:isesti annettaessa yhdistettä 8 päivän ajan päivittäin 0,2 mg/kg intraperitoneaalisesti (yhdisteen myrkyllisyyden vuoksi ei voida antaa suurempia annoksia). Uuden yhdisteen estovaikutus on 61-%:inen annettaessa sitä 10 päivän ajan intraperitoneaalisesti päivittäin 2,0 mg/kg.

Keksinnön mukaisesti valmistetulla yhdisteellä on etuja myös vinblastiinin ja lähtöaineena käytettyyn leurosiiniin verrattuna. Kumpikin viime mainituista ei ole aktiivinen rottien VX-2 karsinoomaa, Hardin-Passey-melanoomaa eikä Rhabdomyo-sarkoomaa vastaan. Leurosiini ei ole aktiivinen S-180 sarkoomaa eikä

Novikoff-hepatoomaa vastaan, kun taas N-formyyllileurosiini on aktiivinen kaikkia näitä pahanlaatuisia kasvaimia vastaan.

Uusi yhdiste aikaansaa täydellisen parantumisen tai 300 %:n suuruisen eliniän pitenemisen 50-70 %:ssa tapauksista kokeissa, joissa hiiriin ympättiin Ehrlich'in ascites-karsinooma tai NK/Ly lymfooma.

Uudella yhdisteellä suoritettu hoito pidentää eläinten ikää, joita vaivaa L-1210 imukudosleukemia, s37 ascites-sarkooma tai Yoshida ascites-sarkooma, noin 150-250 %. Ihonalaisesti ruiskutettuna tämä yhdiste ehkäisee 70-80 % siirrettyjen kiinteiden kasvannaisten (Guerin-karsinooma, S-180 sarkooma) kasvusta.

Eläinkokeissa tätä yhdistettä voidaan antaa annosten suuruuden ollessa 0,3-5,0 mg/kg pitkiä aikoja, aiheuttamatta sivuvaikutuksia, jotka ovat luonteenomaisia ja väistämättömiä tunnettuja vinka-alkaloideja käytettäessä. Tämän alkaloidin terapeuttinen alue on tällöin jonkin verran samanlainen kuin vinkristiinillä ja noin 4 kertaa laajempi kuin vinleurosiinilla.

Vertailu

1. LD₅₀

	LD ₅₀ ip, mg/kg	
	hiirellä	rotalla
vinkristiini	4,0	1,2
vinblastiini	7,5	5,6
N-formyyllileurosiini	28,8	13,1

Huomataan, että N-formyyllileurosiini on neljä kertaa vähemmän myrkyllinen kuin tunnettu vinblastiini ja seitsemän kertaa vähemmän myrkyllinen kuin tunnettu vinblastiini.

2. Sivuvaikutus keskushermostoon.

Rotille (4-4 eläintä) annettiin myrkyllinen annos (1,5 mg/kg) vinkristiiniä ja myrkyllinen annos (15 mg/kg) N-formyyllileurosiinia. Vinkristiini aiheutti kaikilla neljällä eläimellä takajalkojen halvaantumisen, ja kahdessa tapauksessa havaittiin iskiashermon huomattavaa lymfosyytti-infültraatiota ilman myeliinikatoa. N-formyyllileurosiini ei aiheuttanut missään keskushermoston osassa halvausta eikä histologisia muutoksia.

3. Tuumorien kasvua estävä vaikutus

Tuumori	N-formyyliureosiini		Vinkristiini		Vinblastiini	
	annos	Estovaikutus % vertailusta	annos	Estovaikutus % vertailusta	annos	Estovaikutus % vertailusta
VX-2 epiteeli karsinooma kanininilla	3 mg/kg/d iv 10 d aikana	70 %	myrkylliseen annokseen saakka	Ø	myrkylliseen annokseen saakka	Ø
Harding-Passey melanooma	5 mg/kg/d ip 14 d aikana	47 %	myrkylliseen annokseen saakka	Ø		
Rhabdomyo sarkooma	2 mg/kg/d ip 10 d aikana	61 %	0,2 mg/kg/d ip [*] 8 d aikana	25 %	myrkylliseen annokseen saakka	Ø

* myrkytysoireiden vuoksi ei voida käyttää suurempaa annosta.

Taulukosta huomataan, että N-formyyli-leurosiini on tehokas sellaisia tuumoreita vastaan, jotka ovat resistenttejä muihin di-indoliaalkaloideihin nähden.

Keksinnön mukainen menetelmä käsittää seuraavat vaiheet: leurosiinia, joka on saatu erottamalla kromatograafisesti di-indoliaalkaloideja *Catharanthus roseus* G. Don-nimisestä kasvista HU-patenttijulkaisun n:o 160 967 mukaan, tai sen suolaa, edullisesti sulfaattia, liuotetaan orgaaniseen liuottimeen tai liuotinseokseen, edullisesti asetonin ja jääetikan seokseen, liuos jäädytetään alle 0°C:n lämpötilaan, edullisesti välille -30 ja -90°C, edellämainittuun liuokseen lisätään samalla voimakkaasti sekoittaen ja jäähdyttäen kromihappoa tai kromaattisuolaa liuotettuna saman lämpötilan omaavaan orgaaniseen liuottimeen, edullisesti etikkahappoanhydridiin, ja reaktioseoksen annetaan seistä 5-15 minuuttia, edullisesti 8 minuuttia. Sen jälkeen reaktioseosta käsitellään varovasti kylmällä (välillä -40 ja -50°C) ammoniakkin vesiliuoksella pH:n säätämiseksi arvoon 8-9, seos laimennetaan vedellä ja uutetaan useilla annoksilla orgaanista liuotinta, edullisesti metyleenikloridilla kunnes yhtään alkaloidia ei ole läsnä. Uutteet yhdistetään, pestään vedellä, kuivataan ja haihdutetaan kuiviin alipaineessa. Tällöin saadaan valkoinen, vaahtomainen, amorfinen kuiva jäännös, joka koostuu pääasiallisesti N-formyyli-leurosiinista ja N-demetyyli-leurosiinista. Nämä yhdisteet erotetaan toisistaan kromatograafisesti käyttäen pylvästä, joka on täytetty aluminiumoksidilla (aktiviteettiaste IV-V). Täytös valmistetaan aluminiumoksidin bentseenisuspensiosta. Ensimmäinen eluentti on bentseeni ja seuraavat eluentit ovat bentseenin seoksia erilaisten määrien kanssa kloorattua hiilivetyä, edullisesti kloroformia. Eri eluaattifraktioissa olevat aineet identifioidaan ohutkerroskromatografian avulla. Ensimmäisenä poistuu pylvästä seura-aineita, sen jälkeen N-demetyyli-leurosiinia ja lopuksi eluoituu N-formyyli-leurosiinia. Samoja aineita sisältävät fraktiot yhdistetään, haihdutetaan kuiviin alipaineessa ja, mikäli halutaan, saadut emäkset muutetaan niiden happoadditiosuoloiksi, edullisesti vastaaviksi monosulfaateiksi. Yhdisteet voidaan puhdistaa haluttaessa uudelleenkiteyttämällä. Tätä puhdistusmenetelmää käytetään ensisijaisesti suoloille. N-demetyyli-leurosiini formyloidaan tunnetuilla menetelmillä (katso C.W. Huffman: J. Org. Chem. 23, 727 [1958]) N-formyyli-leurosiinin saamiseksi.

Keksinnön erään edullisen menetelmän mukaan menetellään seuraavalla tavalla: Kuiva jäännös, joka on saatu käsittelemällä hapetuksen reaktiotuotetta, formyloidaan muurahaishapon ja etikkahappoanhydridin seoksen kanssa. Tässä reaktiossa N-demetyyli-leurosiini muuttuu N-formyyli-leurosiiniksi. Reaktioseos neutraloidaan, uutetaan metyleenikloridilla, uute pestään vedellä ja haihdutetaan kuiviin alipaineessa. Saatu kuiva jäännös puhdistetaan kromatografisesti. Saatu N-formyyli-leurosiini muutetaan mahdollisesti sen suolaksi, edullisesti sulfaatiksi, ja

suola kiteytetään haluttaessa uudelleen.

Keksintöä valaistaan lähemmin seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkki 1

N-formyyli-leurosiini ja -monosulfaatti

12 g (0,0132 moolia) leurosiinisulfaattia liuotetaan 2 640 ml:aan asetonia, jonka jälkeen lisätään 0,6 litraa jäätikkää, joka on juuri tislattu kromihappoa sisältävästä seoksesta. Liuos jäädytetään -50°C :een ja kylmää aset-anhydridiä, joka sisältää 5,94 g (0,135 moolia) kromihappoa, lisätään hämmennettyyn seokseen 3 minuutin kuluessa. Seoksen annetaan seistä vielä 5 minuuttia, jonka jälkeen liuoksen pH säädetään arvoon 6 käyttäen kylmää väkevää ammoniakkin vesiliuosta. Tämä operaatio suoritetaan 7 minuutin kuluessa ja ammoniakkiliuosta tarvitaan noin 6 litraa. Tämän neutraloinnin aikana seosta jäädytetään lämpötilan estämiseksi kohoamasta yli $+50^{\circ}\text{C}$. Saatu seos täytetään lasiastiaan, joka on varustettu lasisella hämmennyslaitteella ja laskuhanalla, ja se sisältää ennestään 9 litraa tislattua vettä. Laimennettu liuos tehdään alkaliseksi ammoniakkin vesiliuoksen lisämäärillä pH:n säätämiseksi arvoon 8,5.

Tämän jälkeen reaktioseos uutetaan metyleenikloridilla (4 x 1,5 litraa). Alkaloidiemäkset siirretään metyleenikloridifaasiin. Faasit erotetaan, orgaaniset liuokset yhdistetään ja pestään tislattulla vedellä (3 x 1 litra) neutraloimisvaiheessa muodostuneen ammoniumasetatin poistamiseksi. Tämän jälkeen orgaaninen faasi kuivataan natriumsulfaatin avulla ja haihdutetaan kuiviin alipaineessa.

Tällöin saadaan 10 g beigenvalkoista kuivaa jäännöstä. Tuote on N-formyyli-leurosiinin ja N-demetyyli-leurosiinin epäpuhdasta seosta.

Kuiva jäännös liuotetaan 60 ml:aan bentseeniä ja liuos kaadetaan kromatografiapylvään päälle, jonka halkaisija on 35 mm ja joka on täytetty 500 g:lla aluminiumoksidia (aktiiviteettiaste IV-V). Täytös valmistetaan aluminiumoksidin bentseenisuspensiosta.

Pylväs eluoidaan taulukossa 1 luetelluilla liuottimilla tai liuotinseoksilla.

T a u l u k k o 1

Eluimisaineen kokoomus	Eluimisaineen määrä ml
Bentseeniä	900
Bentseenin ja kloroformin 9:1-seosta	1 800
Bentseenin ja kloroformin 8,5:1,5-seosta	1 000
Bentseenin ja kloroformin 8:2-seosta	2 800
Bentseenin ja kloroformin 1:1-seosta	2 800
Kloroformia	800

Eluaatti kootaan 400 ml:n fraktioiksi. Eri fraktiot tutkitaan ohutkerroskromatografian avulla (Fransworth, N.R. et al.: Lloydia, 27, 302 [1964]).

Fraktiot 1-5 eivät sisällä alkaloideja. Ensimmäiset jäljet alkaloidista ilmestyvät yleensä fraktiossa 6, joka sisältää pääasiallisesti ei-reagoinutta leurosiinia. N-demetyyli-leurosiinia ilmaantuu yleensä ensimmäisen kerran suunnilleen fraktiossa 7 ja se eluoituu täydellisesti suunnilleen fraktioon 15 mennessä. N-formyyli-leurosiinin eluoituminen alkaa suunnilleen fraktiossa 13 ja päättyy yleensä suunnilleen fraktioissa 19-21.

Fraktiot, jotka ohutkerroskromatograafisen analyysin perusteella sisältävät samoja alkaloideja, yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin alipaineessa.

Tällöin saadaan 5,6 g raakaa, amorfista N-formyyli-leurosiinia ja 1,5 g raakaa, amorfista N-demetyyli-leurosiinia.

Seuraavassa vaiheessa nämä epäpuhtaat, amorfiset emäkset muutetaan erikseen niiden monosulfaateiksi. 1 paino-osa raakaa tuotetta liuotetaan 5 tilavuusosaan kuivaa etanolia, sen jälkeen liuos hapotetaan pH-arvoon 4 lisäämällä rikkihapon 1-%:ista liuosta kuivassa etanolissa. Kiteisen sulfaatin erottuminen alkaa välittömästi. Seoksen annetaan seistä huoneen lämpötilassa useita tunteja ja sen jälkeen erottuneet kiteet suodatetaan. Suolat kiteytetään sen jälkeen uudelleen seuraavalla tavalla: 1 paino-osa kiteistä sulfaattia liuotetaan 5 tilavuusosaan metanolia ja liuoksen tilavuus suurennetaan viisinkertaiseksi kuivalla etanolilla. Liuoksen annetaan seistä huoneen lämpötilassa, jonka jälkeen erottunut tuote suodatetaan, pestään kuivalla etanolilla ja kuivataan.

Tässä menetelmässä saadaan seuraavia aineita: 48 g (40,1 %) N-formyyli-leurosiinimonosulfaattia, sp.: $248-252^{\circ}\text{C}$ (Boetius), $(\alpha)_{20}^D = +37^{\circ}$ ($c = 1$, vedessä); ja 1,1 g (9,3 %) N-demetyyli-leurosiinimonosulfaattia; hajoaa sulamatta; $(\alpha)_{20}^D = 3,2^{\circ}$ ($c = 1$, vedessä).

N-formyyli-leurosiiniemäksen fysikaalisten vakioiden määrittämiseksi liuotetaan osa näin saatua N-formyyli-leurosiinimonosulfaattia veteen, liuoksen pH säädetään välille 8-9 väkevällä ammoniakkin vesiliuoksella ja seos uutetaan kolmasti metyleenikloridilla. Orgaaniset faasit yhdistetään, kuivataan ja haihdutetaan kuiviin alipaineessa. Saatu amorfinen N-formyyli-leurosiini kiteytetään uudelleen metanolista. Kiteinen N-formyyli-leurosiini sulaa välillä $209-211^{\circ}\text{C}$ (Boetius); $(\alpha)_{20}^D = +80,3^{\circ}$ ($c = 1$, kloroformissa).

N-formyyli-leurosiinin IR-spektri on esitetty kuviossa 1. Tämän spektrin ero leurosiinin spektristä on formyyli-ryhmän voimakkaassa absorptiovyössä, joka esiintyy kohdassa 1672 cm^{-1} .

Massaspektrin perusteella on N-formyyli-leurosiinimolekyyli-ionin massaluku 822. Mitattu tarkka massa on $M = 822.3977$, josta voidaan laskea empiirinen kaava $\text{C}_{48}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{10}$, jonka teoreettinen massaluku on 822.3909.

Analyysi:

Lasketut arvot kaavalle $C_{46}H_{54}N_4O_{10}$:

C: 67,15 %, H: 6,61 %, N: 6,81 %, O: 19,43 %,
 Saadut arvot: 66,95 %, H: 6,58 %, N: 6,75 %, O: 19,27 %.

Tämä molekyyli-ioni aiheuttaa ionihuipun massaluvulla 793, mikä vastaa formyyli-ryhmän poistumista, kuten osoitetaan tarkan massaluvun avulla

$$m/e_{\text{mitattu}} = 793,3866.$$

Empiirinen kaava, joka vastaa tätä massalukua, on $C_{45}H_{53}N_4O_9$, jonka laskettu massa on

$$m/e_{\text{laskettu}} = 793,3882.$$

Samoin kuin leurosiiniemäksen massaspektrillä, esiintyy ionihuippu, joka vastaa massalukua 353, N-formyyli-leukosiiniemäksen massaspektrissä, mikä vastaa epoksivelbanamiini-osaa. Tämä seikka on myös varmennettu mittaamalla tarkka massa:

$$m/e_{\text{mitattu}} = 353,1874,$$

joka vastaa empiiristä kaavaa $C_{21}H_{25}N_2O_3$, jonka laskettu massa on

$$m/e_{\text{laskettu}} = 353,1858.$$

Esimerkki 2

N-formyyllileurosiinimonosulfaatti

1 g N-demetyyllileurosiinia liuotetaan seokseen, jossa on 6 ml väkevää muurahaishappoa ja 1 ml ~~aset~~-anhydridiä, ja seoksen annetaan seistä huoneen lämpötilassa 10 minuuttia. Sen jälkeen seos kaadetaan 30 ml:aan kylmää vettä (0-5°C), ja seoksen pH säädetään arvoon 9,0 kylmällä, väkevällä ammoniakki-vesiliuoksella. Ammoniakkiliuosta lisättäessä hämmennetään. Alkoloidi uutetaan vesiliuoksesta metyleenikloridilla (3 x 30 ml). Metyleenikloridiliuokset yhdistetään, kuivataan ja haihdutetaan kuiviin alipaineessa.

Tällöin saadaan 0,95 g amorfista, valkoista N-formyyllileurosiinia, joka muutetaan sen monosulfaatiksi esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Tässä reaktiossa saadaan 1,01 g N-formyyllileurosiinimonosulfaattia.

Esimerkki 3

N-formyyllileurosiini

10 g beigenvalkoista, vahtomaista raakaa tähdettä, joka koostuu N-formyyllileurosiinista ja N-demetyyllileurosiinista ja joka on saatu hapettamalla 12 g (0,0132 moolia) leurosiinisulfaattia esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, liuotetaan seokseen, jossa on 60 ml väkevää muurahaishappoa ja 10 ml ~~aset~~-anhydridiä, ja seos kaadetaan, samalla hämmentäen, 300 ml:aan kylmää (0-5°C) vettä. Seoksen pH säädetään, samalla hämmentäen, arvoon

9,0 kylmällä, väkevällä ammoniakkin vesiliuoksella. Liuos uutetaan metyleenikloridilla (3 x 100 ml). Metyleenikloridifaasit yhdistetään, kuivataan ja haihdutetaan kuiviin alipaineessa. Tällöin saadaan 9,8 g amorfista, valkoista, raakaa N-formyyli-leurosiinia.

Saatu raaka N-formyyli-leurosiini puhdistetaan pylväskromatografian avulla. Raaka tuote liuotetaan 60 ml:aan bentseeniä ja tämä liuos kaadetaan pylvään päälle, joka halkaisija on 45 ml ja joka on täytetty 500 g:lla aluminiumoksidia (aktiiviteettiaste III) bentseenissä. Pylväs eluoidaan taulukossa 2 luetelluilla liuottimilla.

T a u l u k k o 2

Eluomisaineen kokoomus	Eluomisaineen määrä, ml
Bentseeniä	1200
Bentseenin ja kloroformin 2:1-seosta	5000
Bentseenin ja kloroformin 1:1-seosta	3000
Kloroformia	800

Eluaatti kootaan fraktioiksi, joiden jokaisen tilavuus on 400 ml.

Fraktiot 1 - 3 eivät sisällä alkaloideja. Fraktiot 4 - 10 sisältävät seura-aineita. Suunnilleen fraktiosta 11 alkaen esiintyy myös N-formyyli-leurosiinia seura-aineiden lisäksi. Suunnilleen fraktiot 15 - 20 sisältävät yksistään N-formyyli-leurosiinia. Seuraavissa fraktioissa pienenee eluoituneen N-formyyli-leurosiinin määrä asteettain. Ne fraktiot, jotka sisältävät yksistään N-formyyli-leurosiinia, yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin alipaineessa. Tällöin saadaan 6,5 g raakaa, amorfista N-formyyli-leurosiinia.

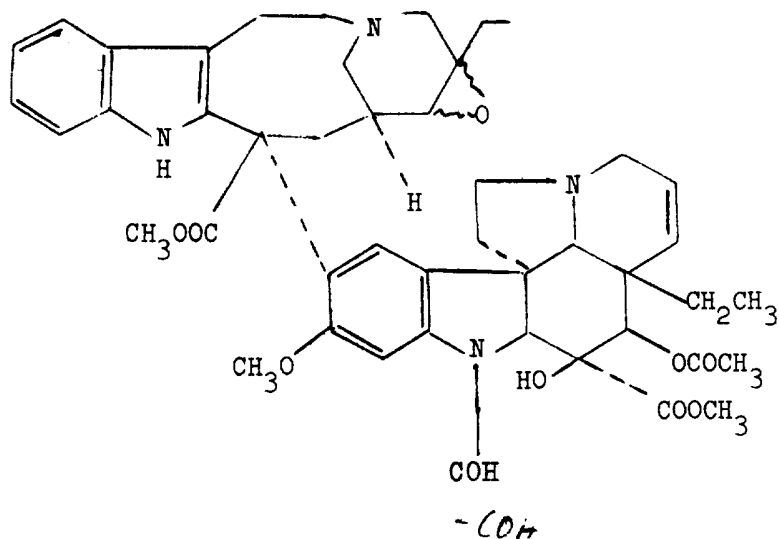
Tämä raaka, amorfinen N-formyyli-leurosiiniä muutetaan sen monosulfaatiksi seuraavalla tavalla: 6,5 g N-formyyli-leurosiinia liuotetaan 32,5 ml:aan kuivaa etanolia, jonka jälkeen liuos hapotetaan pH-arvoon 4 lisäämällä rikkihapon 1 %:tista liuosta kuivassa etanolissa. Kiteisen aineen erottuminen alkaa välittömästi. Seoksen annetaan seistä huoneen lämpötilassa useita tunteja, jonka jälkeen kiteet erotetaan suodattamalla ja pestään kuivalla metanolilla. Tällöin saadaan 6,5 g kiteistä N-formyyli-leurosiini-monosulfaattia.

Eluaatit, jotka on koottu ennen puhdasta N-formyyli-leurosiinia sisältäviä fraktioita ja niiden jälkeen, sisältävät seura-aineita ja N-formyyli-leurosiinia. Nämä fraktiot yhdistetään ja haihdutetaan kuiviin. Tällä taval-

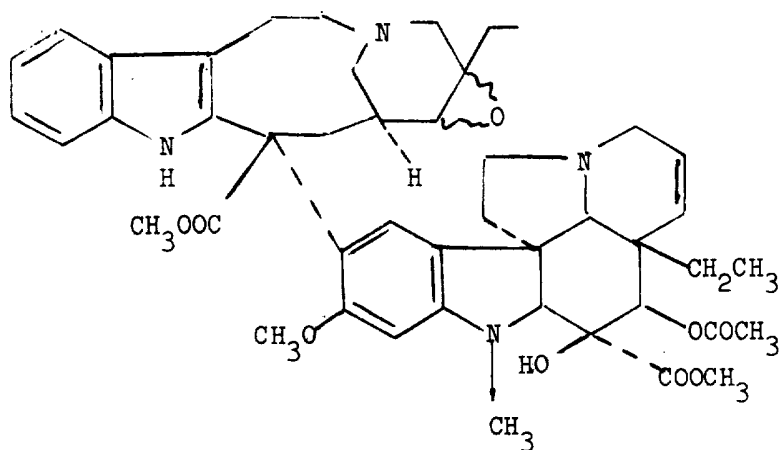
la saatu amorfinen aine (1,75 g) liuotetaan bentseeniin ja puhdistetaan kromatograafisesti edellä kuvatulla tavalla, vain sillä erotuksella, että paremman erottumisen takaamiseksi pylväs eluoidaan 1200 ml:lla bentseenin ja kloroformin 2:1-seosta. Niitä fraktioita, jotka sisältävät yksinomaan N-formyyli-leurosiinia, käsitellään edellä kuvatulla tavalla, jolloin saadaan lisäksi 1,05 g puhdasta, kiteistä N-formyyli-leurosiinimonosulfaattia. Kokonaissaanto: 7,10 g (63,7 %) N-formyyli-leurosiinimonosulfaattia. Tämän yhdisteen fysikaaliset vakiot ovat identtiset esimerkissä 1 esitettyjen vakioiden kanssa.

Patenttivaatimus:

Menetelmä tuumorien kasvua estävän N-formyylileurosiinin valmistamiseksi, jonka kaava on



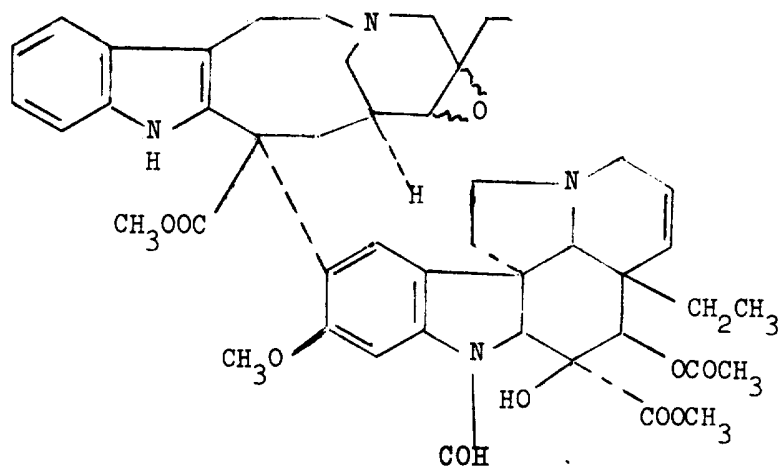
ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävien happoadditiosuolojen valmistamiseksi, tunnettu siitä, että leurosiini, jonka kaava on



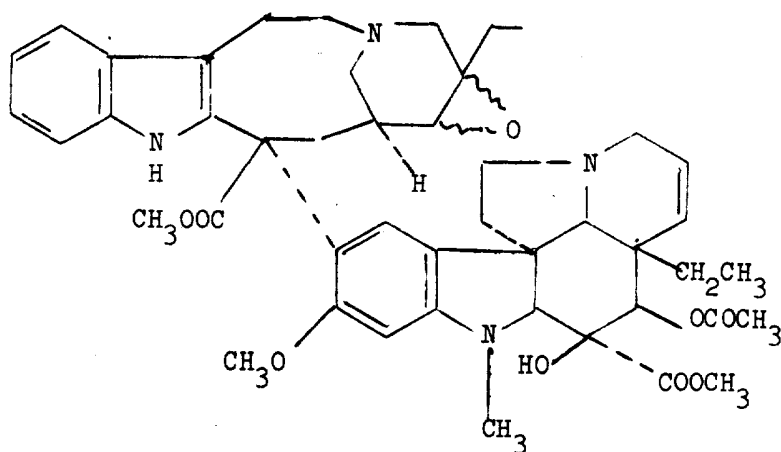
tai leurosiinin happoadditiosuola hapetetaan kromihapolla tai sen suolalla lämpötilassa alle -30°C , ja saatu yhdiste formyloidaan ja erotetaan, ja vapaa happo haluttaessa muutetaan happoadditiosuolakseen.

Patentkrav:

Förfarande för framställning av tillväxt av tumörer förhindrande
N-formylleurocin med formeln



och farmaceutiskt godtagbara syraadditionssalter därav, k ä n n e t e c k n a t
därav, att leurocin med formeln



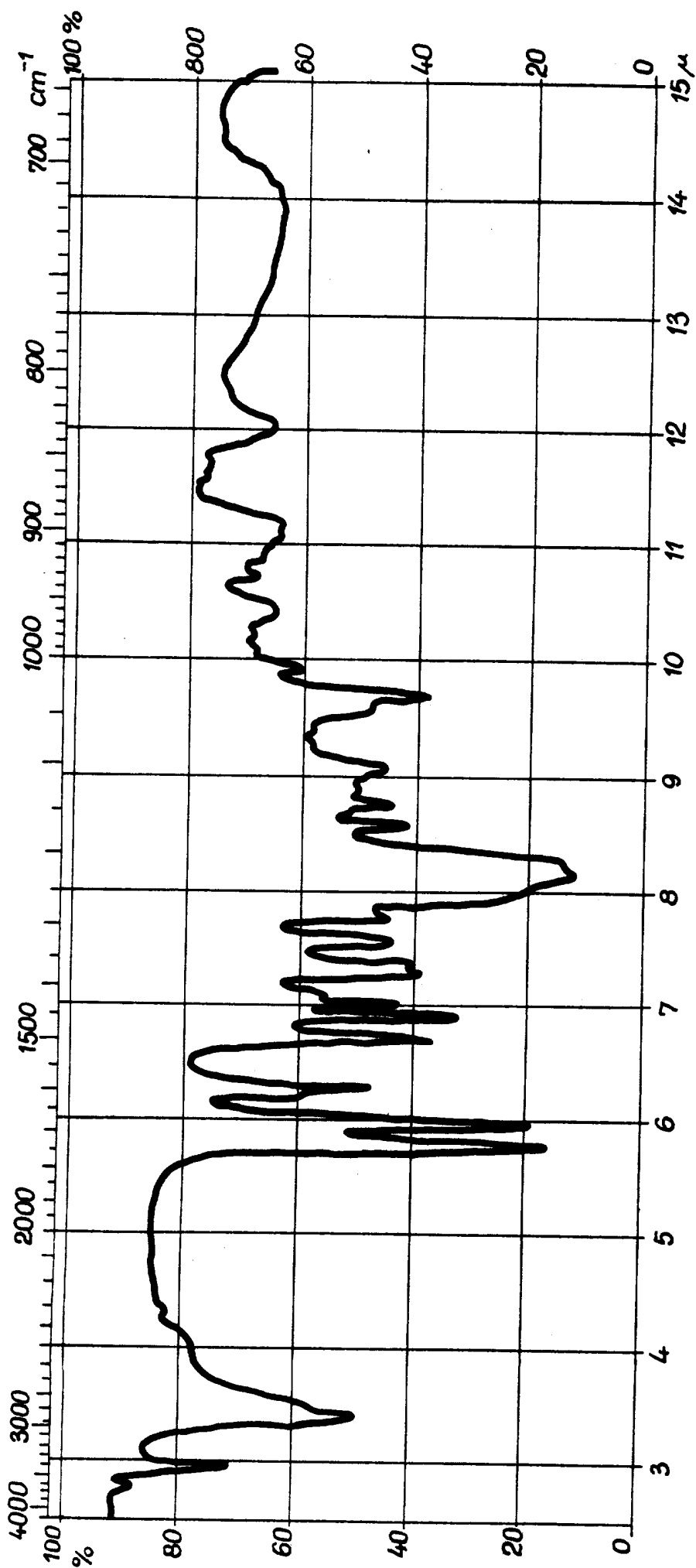
eller ett syraadditionssalt av leurocin oxideras med kromsyra eller ett salt
därav vid temperatur under -30°C , och den erhållna föreningen formyleras och
separeras, och om så önskas, den fria basen omvandlas till sitt syraadditionssalt.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Iso-Britannia-Storbritannien(GB) 1 095 833
(C 07 d 57/00). Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
1 545 759 (C 07 D 519/04), 2 124 023 (C 07 d 43/00). Tanska-Danmark(DK)
128 321 (C 07 d 57/04).

Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Journal of pharmaceutical science
58(1969):6 p. 694-8. Tetrahedron letters 7(1968) p. 783-7.

57760



Kuvio 1