



Patent dodatkowy

do patentu nr _____

Zgłoszono: 14.12.1972 (P. 159524)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 30.09.1973

Opis patentowy opublikowano: 10.04.1976

MKP C07d 57/06

Int. Cl.²

C07D 519/04

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Karolina Jovanovics, Kálmán Szász, György Fekete, Emil Bittner, Eszter Dezséri, János Eles

Uprawniony z patentu: Richter Gedeon Vegyészeti Gyár RT, Budapeszt (Węgry)

Sposób wytwarzania półsyntetycznej winkrystyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania półsyntetycznej winkrystyny.

Winblastyna i winkrystyna są cytostatycznymi alkaloidami Vinca rosea L. (Catharantus roseus G. Don.). Są znane od około 10 lat i w badaniach klinicznych wykazały najsilniejsze działanie chemoterapeutyczne przeciwko rakowi. Przede wszystkim wyniki uzyskane z winkrystyną godne są uwagi, ponieważ związek ten wykazuje działanie zbawienne w leukemii wieku dziecięcego (Haggard, M. E.; Terapia winkrystyną w ostrej leukemii u dzieci, Caucer Chemother. Reports, 52, 477 (1968)).

Wiadomo, że winkrystyna znajduje się w alkaloidach Vinca rosea L. w niewielkiej ilości. W mieszaninie alkaloidów zawierającej około 70 różnych alkaloidów jest do uzyskania zaledwie jedna dziesiąta procenta winkrystyny, co w przeliczeniu na substrat stanowi 3—5 mg substancji na kg suchej rośliny. Otrzymywanie winkrystyny w tych ilościach opisane jest w opisie patentowym St. Zjedn. Am. nr 3205220 jak również w węgierskim opisie nr 160967 pt. „Sposób selektywnego otrzymywania winblastyny, winleurozyny, winkrystyny i ich soli”.

Ze względu na wartość farmakologiczną winkrystyny, jest zrozumiałe, że na całym świecie prowadzone są poszukiwania w celu tańszego jej wytwarzania w większych ilościach.

Wiadomo, że wspólny produkt rozpadu winblastyny i winkrystyny, N-desmetylowinblastynę

2

przez formylowanie znanymi metodami można przeprowadzić w winkrystynę (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 3354163). W opisie wymieniono, że winblastynę można utlenić w znany sposób metodą biologiczną za pomocą enzymu peroksydazy w obecności nadtlenu wodoru do N-desmetylowinblastyny, którą następnie metodą formylowania przeprowadza się w winkrystynę. W opisie jednakże nie ma żadnego przykładu, a odnośnie utleniania winblastyny i jej wydajności nie podano bliższych wskazówek.

Przy własnych przeprowadzonych eksperymentach nad utlenianiem winblastyny nieoczekiwanie stwierdzono, że przy utlenianiu kwasami chromowymi lub jedną z ich soli w niskiej temperaturze winblastyny lub jednej z jej soli addycyjnych z kwasami przede wszystkim siarczanów, grupa N-metylowa winblastyny może być bezpośrednio przekształcona w grupę formylową.

To selektywne utlenianie jest sprzeczne z dotychczasową wiedzą (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 3354163) i było dla fachowców nie do przewidzenia, ponieważ cząsteczka winblastyny zawiera liczne wrażliwe grupy, które zasadniczo łatwiej utleniają się niż wymieniona grupa N-metylowa.

Istotą wynalazku jest sposób wytwarzania półsyntetycznej winkrystyny i polega na tym, że winblastynę lub jedną z jej soli, przede wszystkim siarczan utlenia się w niskiej temperaturze kwa-

sami chromowymi lub jedną z ich soli, i że z zobojętnionej lub zalkalizowanej mieszaniny reakcyjnej ekstrahuje się produkt, ekstrakt odparowuje do sucha, ewentualnie formuluje, z suchej pozostałości izoluje winkrystynę i ewentualnie N-desmetylowinblastynę, a z izolowanego produktu względnie z izolowanych produktów ewentualnie tworzy sól, korzystnie siarczan. Otrzymaną sól względnie otrzymane sole ewentualnie przekształtują się:

Sposobem według wynalazku, winblastynę lub jedną z jej soli, korzystnie siarczan rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym lub mieszaninie rozpuszczalników, przede wszystkim w mieszaninie kwasu octowego lodowatego i acetonu, roztwór oziębia się do temperatury poniżej 0°C korzystnie —30° do —90°C i roztwór w tej temperaturze podczas intensywnego mieszania i chłodzenia zadaje oziębionym kwasem chromowym względnie roztworem jednej z soli kwasu chromowego przygotowanym z organicznego rozpuszczalnika korzystnie bezwodnika octowego, i mieszaninę reakcyjną pozostawia się do odstania w ciągu 15 minut, korzystnie 8 minut.

Następnie ostrożnie alkalizuje się amoniakiem oziębionym do —40 do —50°C do uzyskania wartości pH 8—9, rozcieńcza wodą i ekstrahuje wielokrotnie rozpuszczalnikami organicznymi, korzystnie chlorkiem metylenu aż do całkowitego wyekstrahowania alkaloidu. Ekstrakty łączy się, przemycza wodą, suszy i pod zmniejszonym ciśnieniem odparowuje do sucha. Bezpostaciową surową winblastynę-zasadę, zawierającą jako zanieczyszczenie N-desmetylowinblastynę oczyszcza się chromatograficznie. Chromatograficzne oczyszczanie przeprowadza się na kolumnie zawierającej tlenek glinu nasycony benzenem.

Surową winkrystynę rozpuszcza się w benzenie i wprowadza na kolumnę. Eluuje się najpierw mieszaniną 2:1 benzenem i chloroformem, a następnie w stosunku 1:1. Poszczególne frakcje identyfikuje się na podstawie chromatografii bibułowej względnie cienkowarstwowej. Frakcje zawierające winkrystynę względnie desmetylowinblastynę łączy się i odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Winkrystynę względnie N-desmetylowinblastynę ewentualnie przeprowadza się w sól, zwłaszcza siarczan i jeśli trzeba oczyszcza się przez krystalizację.

W przytoczonych uprzednio sposobach według wynalazku postępuje się w ten sposób, że po utlenianiu, po obróbce utlenionej mieszaniny otrzymaną suchą pozostałość stanowiącą surową winkrystynę formuluje się mieszaniną kwasu mrówkowego z bezwodnikiem octowym. Suchą pozostałość po reakcji formylowania, zawierającą także N-desmetylowinblastynę w postaci winkrystyny, uzyskuje się z mieszaniny reakcyjnej przez zobojętnienie jej, ekstrakcję chlorkiem metylenu, przemycie i odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem i oczyszczenie za pomocą chromatografii. Winkrystynę można przeprowadzić w sól, zwłaszcza siarczan i ewentualnie oczyścić przez przekrystalizowanie.

Sposób według wynalazku objaśniają bliżej następujące przykłady.

Przykład I. 10 g (0,011 m) siarczanu winblastyny rozpuszcza się w 2200 ml acetonu, dodaje 500 ml kwasu octowego lodowego i roztwór oziębia się do temperatury —60°C. Równocześnie rozpuszcza się 4,96 g (0,0494 m) kwasu chromowego w 1860 ml bezwodnika octowego, roztwór oziębia się również do —60°C i bezpośrednio potem podczas mieszania wkrapla do roztworu siarczanu winkrystyny. Po ośmiominutowym mieszanin, wkrapla się 4400 ml stężonego amoniaku oziębionego do —40 do —50°C aż do uzyskania wartości pH 8. Temperatura roztworu podczas zobojętniania nie może przekroczyć +50°C. Zalkalizowaną mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się 10 l wody i ekstrahuje chlorkiem metylenu do całkowitego usunięcia alkaloidów. Fazy chlorku metylenu łączy się, a powstały w czasie zobojętniania octan amonu, który przeszedł do fazy organicznej wymywa się 2×3000 ml wody.

Następnie wysuszony roztwór chlorku metylenu odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 8,5 g bezpostaciowej, surowej winkrystyny, która jako zanieczyszczenie zawiera jeszcze N-desmetylowinblastynę. Bezpostaciową, surową winkrystynę rozpuszcza się w 30 ml benzenu i chromatografuje na kolumnie zawierającej tlenek glinu nasycony benzenem. Na początku eluuje się 1300 ml benzenu, następnie 5500 ml mieszaniny 2:1 benzenu z chloroformem a wreszcie 4250 ml mieszaniny 1:1 benzenu z chloroformem.

Zbiera się frakcje po 250 ml. Poszczególne frakcje bada się za pomocą chromatografii bibułowej lub cienkowarstwowej. Mieszaniną 2:1 benzenu z chloroformem ekstrahuje się zanieczyszczenia N-desmetylowinblastyną powstałą jako uboczny produkt utleniania, a mieszaniną o stosunku 1:1 winkrystynę. Zidentyfikowane za pomocą chromatografii bibułowej lub cienkowarstwowej, frakcje zawierające identyczne alkaloidy łączy się i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. W ten sposób otrzymuje się 5,9 g bezpostaciowej winkrystyny względnie 2,7 g bezpostaciowej N-desmetylowinblastyny.

Bezpostaciową N-desmetylowinblastynę rozpuszcza się w 27 ml bezwodnego etanolu i doprowadza wartość pH do 4 za pomocą 1%-owego etanolowego roztworu kwasu siarkowego przy czym wytrąca się krystaliczny siarczan N-desmetylowinblastyny. Otrzymuje się 2,5 g siarczanu N-desmetylowinblastyny. Rozpuszcza się go w 13 ml metanolu i do roztworu dodaje 60 ml bezwodnego etanolu. Roztwór pozostawia się do odstania w temperaturze pokojowej, po czym odfiltrowuje wykrystalizowany siarczan N-desmetylowinblastyny.

Wydajność: 2,2 g (0,0024 m) siarczanu N-desmetylowinblastyny (20%).

Z części siarczanu N-desmetylowinblastyny uwalnia się zasadę i identyfikuje na podstawie następujących danych: temperatura topnienia 212—215°C (Boetius), $[\alpha]_D^{20} = +15,8^\circ$ ($c = 1$, chloroform).

Powstałą przy utlenianiu winkrystyny N-desmetylowinblastynę lub jej sól można w znany spo-

sób formylować, przy czym otrzymuje się winkrystynę lub jej sól.

Otrzymanej 5,9 g bezpostaciowej winkrystyny rozpuszcza się 60 ml bezwodnego etanolu i zakwasza 1%-owym etanolem kwasu siarkowego do uzyskania wartości $\text{pH} = 4$, po czym wypada krystaliczny siarczan winkrystyny. Otrzymuje się 5,6 g siarczanu winkrystyny. Rozpuszcza się go w 30 ml metanolu i dodaje 120 ml bezwodnego etanolu. Roztwór pozostawia się do odstania w ciągu 1 godziny i następnie odsąca wykrystalizowany siarczan winkrystyny.

Wydajność: 5,2 g (0,0055 m) siarczanu winkrystyny (50%). $[\alpha]_D^{20} = +11-12^\circ$ ($c=1$, woda)

$R_f = 0,30$ (ukazuje się z żywym niebieskim zabarwieniem).

Produkt identyfikuje się za pomocą UV-spektrum. W porównaniu z winblastyną wykazuje przy $5,94 \mu$ silne pasma absorpcji.

Badania za pomocą chromatografii cienkowarstwowej przeprowadza się na tlenku glinu firmy G. Merck. Rozwija się chloroformem zawierającym 0,5% metanolu, do wywoływania stosuje się stężony kwas fosforowy zawierający 1% siarczanu cerowo-amonowego.

Przykład II. 5 g (0,0055 m) siarczanu winblastyny rozpuszcza się w 1100 ml acetonu i dodaje 250 ml 99,5%-owego lodowego kwasu octowego, który był destylowany nad kwasem chromowym i nie zawiera żadnych substancji utleniających. Roztwór oziębia się do temperatury -60°C . Równocześnie rozpuszcza się 2,48 g (0,0297 m) kwasu chromowego w 930 ml bezwodnika octowego, roztwór również oziębia do -60°C i podczas mieszania dodaje się roztworu siarczanu winblastyny.

Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu 8 minut, i doprowadza pH do wartości 9 za pomocą stężonego amoniaku oziębionego do temperatury -40 do -50°C . Podczas zobojętniania temperatura mieszaniny reakcyjnej nie może przekroczyć $+50^\circ\text{C}$. Zalkalizowaną mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się wodą i ekstrahuje 3×1000 ml chlorkiem metylenu do całkowitego wyekstrahowania alkaloidów. Fazy chlorku metylenu łączy się a powstały w czasie zobojętniania octan amonu, który przeszedł do fazy organicznej wymywa 2×1500 ml wody. Następnie fazę chlorku metylenu suszy się i pod zmniejszonym ciśnieniem odparowuje do sucha.

Pozostałość rozpuszcza się w mieszaninie 75 ml stężonego kwasu mrówkowego i 12,5 ml bezwodnika octowego i pozostawia do odstania w temperaturze pokojowej w ciągu 5 minut. Następnie kwaśny roztwór rozcieńcza się wodą do trzykrotnej jego objętości i doprowadza pH do wartości 9 stężonym amoniakiem podczas chłodzenia. Alkaloidy ekstrahuje się 3×100 ml chlorkiem metylenu. Fazy chlorku metylenu łączy się i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Suchą pozostałość zawierającą winkrystynę rozpuszcza się w 20 ml benzenu i chromatografuje na kolumnie zawierającej tlenek glinu o aktywności IV—V nasycony benzenem.

Najpierw eluuje się 500 ml benzenu, następnie

1000 ml mieszaniny 9:1 benzenu z chloroformem, po czym 700 ml mieszaniny 8,5:1,5 benzenu z chloroformem, następnie 2300 ml mieszaniny 8:2 i wreszcie mieszaniną 1:1. Zbiera się frakcje po 250 ml. Benzen i mieszaniny benzen — chloroform w stosunku 9:1 i 8,5:1,5 powodują najlepszy rozdział substancji na odsorbencie; pierwsze frakcje zawierające alkaloidy ukazują się przy elucji pierwszą połową mieszaniny 8:2 benzenu z chloroformem.

Te frakcje łączy się i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, przy czym przy utlenianiu powstaje 5—10% produktu ubocznego w przeliczeniu na ciężar produktu końcowego — siarczanu winkrystyny. Frakcje zawierające winkrystynę otrzymuje się przy elucji drugą połową mieszaniny 8:2. Ługowanie winkrystyny kończy się mieszaniną 1:1 benzenu z chloroformem.

Zidentyfikowane za pomocą chromatografii cienkowarstwowej względnie bibulowej, frakcje zawierające winkrystynę łączy się i odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 3,8 g suchej pozostałości, którą rozpuszcza się w 40 ml bezwodnego etanolu i roztwór doprowadza do wartości pH 4 1%-owym etanolem kwasem siarkowym. Winkrystyna wypada w postaci siarczanu, oddziela się ją, rozpuszcza w 30 ml metanolu i roztwór zadaje 120 ml bezwodnego etanolu.

Siarczan winkrystyny krystalizuje w czasie jednogodzinnego odstania. Produkt odsąca się, przemyna i suszy.

Wydajność: 3,5 g (0,0039 m) siarczanu winkrystyny (70%).

Fizyczne stałe siarczanu winkrystyny odpowiadają danym wymienionym w przykładzie I.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania półsyntetycznej winkrystyny, **znamienny tym**, że winblastynę lub jedną z jej soli, zwłaszcza siarczan utlenia się w niskiej temperaturze kwasem chromowym lub jego solą, produkt ekstrahuje się z obojętnej lub zalkalizowanej mieszaniny reakcyjnej, ekstrakt odparowuje do sucha, ewentualnie formuluje, a z suchej pozostałości izoluje winkrystynę i ewentualnie N-desmetylowinblastynę, a z izolowanego produktu względnie izolowanych produktów ewentualnie tworzy sól, korzystnie siarczan.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że utlenianie przeprowadza się w rozpuszczalniku organicznym lub mieszaninie rozpuszczalników, zwłaszcza w mieszaninie aceton — kwas octowy lodowy w stosunku 4:1.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że utlenianie przeprowadza się w rozpuszczalniku organicznym lub mieszaninie rozpuszczalników organicznych, kwasem chromowym rozpuszczonym w bezwodniku octowym, lub jedną z jego soli.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że utlenianie przeprowadza się w temperaturach poniżej 0° , a zwłaszcza -30 do -90° .

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że po utlenianiu, pH mieszaniny doprowadza się do

wartości 7—9 za pomocą stężonego amoniaku, przy czym temperaturę roztworu utrzymuje się co najwyżej +50°C.

6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że zubożoną lub zalkalizowaną mieszaninę reakcyjną ekstrahuje się organicznym rozpuszczalnikiem lub mieszaniną rozpuszczalników, korzystnie chlorkiem metylenu.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że formylowanie suchej pozostałości przeprowadza się za pomocą mieszaniny kwasu mrówkowego z bezwodnikiem octowym.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rozdzielanie winkrystyny od ewentualnie powstałej jako produkt uboczny N-desmetylowinblastyny przeprowadza się metodą chromatograficzną.

9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że suchą pozostałość rozpuszcza się w benzenie i rozdziela na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu, przy czym eluuje się najpierw benzenem, następnie mieszaniną benzenu z chloroformem w stosun-

ku 2:1, a eluaty zawierające identyczny produkt odparowuje się do sucha.

10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że izolację winkrystyny przeprowadza się z formylowanej suchej pozostałości za pomocą chromatografii.

11. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że chromatograficzne rozdzielanie przeprowadza się z rozpuszczonej w benzenie suchej pozostałości na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu przy czym eluuje się najpierw benzenem, następnie mieszaniną benzen — chloroform w stosunku 2:1, później mieszaniną benzen — chloroform w stosunku 8,5:1,5 po czym mieszaniną benzen — chloroform w stosunku 8:2 i wreszcie mieszaniną benzen — chloroform w stosunku 1:1, a frakcje zawierające winkrystynę odparowuje się do sucha.

12. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wytwarzanie soli przeprowadza się z roztworu etanolowego i/lub z zawierającej eluat suchej pozostałości za pomocą etanolowego roztworu kwasu siarkowego, korzystnie 1%-owego.