

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C07D 519/04(45) 공고일자 1986년04월30일
(11) 공고번호 86-000488

(21) 출원번호	특1982-0005165	(65) 공개번호	특1984-0002399
(22) 출원일자	1982년11월16일	(43) 공개일자	1984년07월02일

(30) 우선권주장 321662 1981년11월16일 미국(US)
 (71) 출원인 일라이 릴리 앤드 캄파니 아더 알. 웨일
 미합중국 인디애나 인디애나폴리스 이스트 맥카티 스트리트 307

(72) 발명자 로버트 알렌 콘라드
 미합중국 인디애나 46217 인디애나폴리스 샌드 힐 코트 2010
 (74) 대리인 이병호

심사관 : 최규팔 (책자공보 제1155호)**(54) 인돌-디하이드로인돌 이량체의 1-포르밀 동종체 제조방법****요약**

내용 없음.

영세서

[발명의 명칭]

인돌-디하이드로인돌 이량체의 1-포르밀 동종체 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 동물의 악성종양 치료에 유용한 인돌-디하이드로인돌 이량체의 1-포르밀 동종체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따라, 빈카 로제아(Vinca rosea)의 잎으로부터 추출에 의해 수득한 비분리상태의 인돌-디하이드로인돌 이량체성 알칼로이드의 테트로하이드로푸란(THF) 용액을 -80°C 내지 -50°C의 온도범위에서 원래 존재하는 1-메틸 동종체가 거의 다 1-포르밀 동종체로 전환될 때까지 크로메이트-황산수용액과 접촉시키고; 임의로는 존재할 수 있는 1-데스포르밀 동종체를 포르밀화 시키고; 한가지 이상의 1-포르밀 동종체를 분리시키는 것을 포함하며, 균등한 인돌-디하이드로인돌 이량체의 한가지 이상의 1-포르밀 동종체를 제조하는 방법을 제공한다.

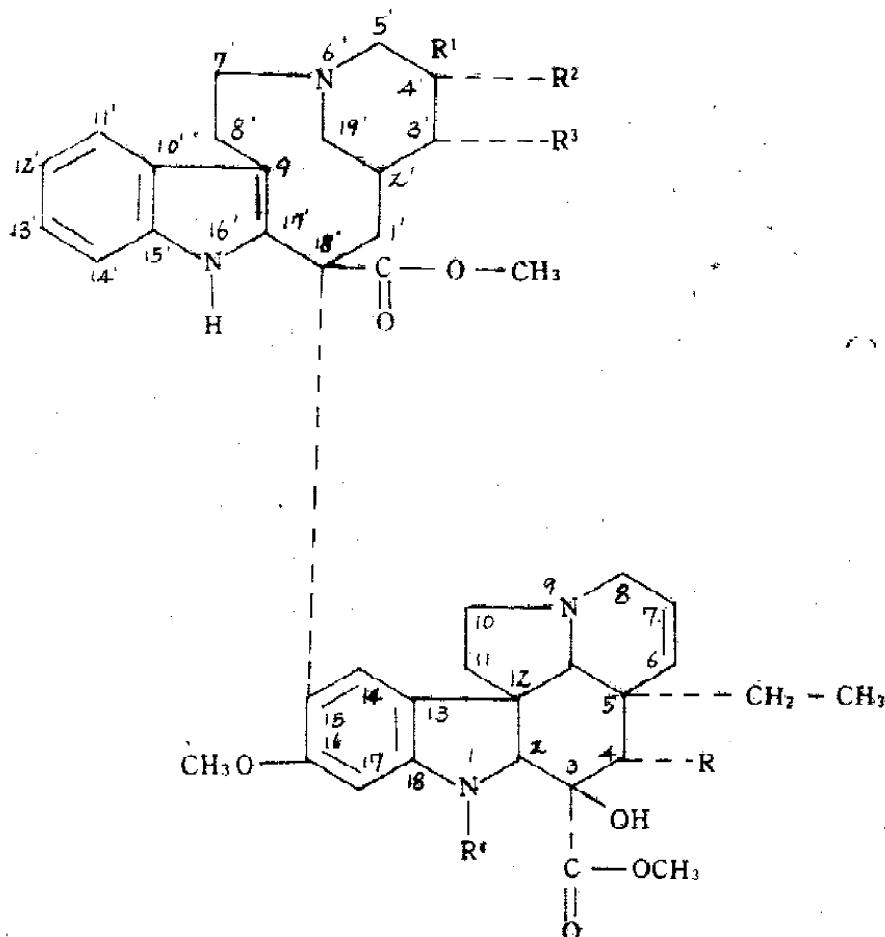
현재까지, VLB를 빈크리스틴으로 전환시키는 방법으로 문헌에 발표된 것은 네가지가 있다. 이들은 다음과 같다 : 과산화효소 및 H₂O₂에 의한 효소적 산화법(Gormam-미합중국 특허 제3,354,163호); 주위온도에서 포름산중 분자산소에 의한 촉매적 산화법(소비에트연방공화국 특허 521845호에 근거한 Derwent Abstract 33812Y/19); -60°C 빙초산 및 아세톤중 산화크롬에 의한 VLB 살펴이트의 산화법(미합중국 특허 제3,899,943호); 및 -50°C이하의 크로메이트-황산수용액에 의한 테트라하이드로푸란중 VLB의 산화(유럽 특허청 공보 0,037,290호). 나중의 두 방법은 1-포르밀로이로시딘을 제조하는데 사용할 수 있다.

그러나 -60°C에서의 크롬산-아세톤-아세트산 산화법은 결점을 갖고 있다. 즉, 제조공장에서 그와같이 낮은 반응온도를 유지하기가 힘이 들며, 고온에서는 원치 않는 부산물의 양이 증가된다. 또한, Barnett 등(미합중국 특허 제 4,110,330호)은 VLB-빈크리스틴 전환에서, VLB는 그와 같은 산화조건하에, -60°C에서 조차 아세톤과 C-5' 위치에서 반응하여 5'-아세토닐빈크리스틴 및 관련 생성물을 생성한다는 것을 밝혀냈다. 로이로신 또는 4'-데옥시로이로시딘을 이러한 산화계에 의해 산화시킬 때도 유사한 5'-치환생성물이 제조된다.

아세톤중 VLB살펴이트의 크롬산 산화법에서 부산물로 생성되는 바람직하지 못한 5'-VCR유도체는, VLB로부터 빈크리스틴을 제조하는데 이 방법을 사용하려 할 때명백한 장해요인이다. 물론, 5'-아세토닐 화합물을 크로마토그래피에 의해 빈크리스틴으로부터, 분리할 수 있으나, 목적 생성물인 빈크리스틴의 필연적인 손실이 따른다. 또한, 이러한 산화과정 도중에, 상당량의 N-데스포르밀 빈크리스틴이 제조되는데 빈크리스틴 수율을 최대로 하기 위해서는 이를 재포르밀화 시켜야 한다. 산화반응 결과 산화뿐 아니라 탈포로밀화가 일어나는 경우 재포르밀화는 부가적인, 비용이 많이 드는 공정이다.

특히, 빈크리스틴에 관해, 본 발명의 방법은 단지일단계의 알칼로이드 분리 과정만을 필요로 하며, 이는 산화 공정 이후에 수행되는 반면에, 표준방법에서는 빈크리스틴 및 VLB를 모두 VRA로 부터 분리하여, VLB는 이어서 빈크리스틴으로 산화시키고 빈크리스틴을 반응률로 부터 재분리하여야 한다. 통상적인 재포르밀화 단계는 또한 VRA에 원래 존재하는 및/또는 산화과정에서 생성된 데스포르밀 동종체를 상응하는 N-포르밀 유도체로 전환시키는데도 바람직하다. 기질로써 조알칼로이드 혼합물을

이용하는 본 발명의 산화방법은 표준 산화법과 비교해 취급이 간편하며 잎으로 부터 단시간내에 생성물을 얻을 수 있다는 점에서 유리하다. 약 -60°C에서 THF 중 크로메이트-황산 혼합물을 이용하는 본 발명의 신규한 산화법은 조이랑체성 알칼로이드 혼합물(VRA)을 산화시켜 상당량의 빙크리스틴 및 포르밀로이로신을 수득하는데 특히 유용한데, 선행기술에 의한 방법과 비교해 취급, 추출 및 재순환이 용이하며 공정이 보다 간단하며 시간이 단축되기 때문이다. 이들 장점은 VLB를 빙크리스틴으로 전환시키는 시험을 Cr_2O_7 -아세톤-아세트산법과 비교실시한 결과 입증되었다.



상기일반식(II)에서 R^1 이 아세톡시이고, R^1 이 OH 이며, R^2 는 C_2H_5 이고, R^3 은 H 이고 R^4 는 CH_3 인 경우가 VLB인데, 이를 빙크리스틴(R 은 아세톡시이고, R^1 은 OH 이고, R^2 는 C_2H_5 이며 R^3 은 H 이며 R^4 는 CHO 이다)으로 산화시킨다. 본 발명의 신규 방법은 또한 로이로시딘(R 은 아세톡시이고, R^1 은 C_2H_5 이고, R^2 는 OH 이며, R^3 은 H 이며 R^4 는 CH_3 이다)의 1-포르밀-1-데스메틸로이로시딘(R , R^1 , R^2 및 R^3 은 전술한 바와 동일하나 R^4 는 CHO 이다)로의 산화반응, 4'-데옥시 VLB(R^1 및 R^3 은 H 이고, R^2 는 C_2H_5 이며, R 은 아세톡시이고 R^4 는 CH_3 이다)의 4'-데옥시빙크리스틴(R^1 및 R^3 은 H 이고, R 은 아세톡시이며, R^2 는 C_2H_5 이고 R^4 는 CHO 이다)로의 산화, 4'-데옥시로이로시딘(R^2 및 R^3 은 H 이고, R^1 은 C_2H_5 이고, R 은 아세톡시이며 R^4 는 CH_3 이다)의 1-포르밀-4'-데옥시-1-데스메틸로이로시딘(R^2 및 R^3 은 H 이고, R^1 은 C_2H_5 이며, R 은 아세톡시이고 R^4 는 CH_3 이다)으로의 산화, 로이로신(R^1 은 C_2H_5 이고, R 은 아세톡시이며, R^2 및 R^3 은 브리지 산소원자와 함께 X-에폭사이드 그룹을 생성하며 R^4 는 CH_3 이다)의 포르밀로이로신의 산화 및 4-데스아세틸 VLB(R 및 R^1 은 OH 이고, R^2 는 C_2H_5 이며, R^3 은 H 이고, R^4 는 메틸이다)의 4-데스아세틸빙크리스틴으로의 산화반응을 포함한다. 후술하는 종 다른 별도의 관용명을 갖지 않는 1-포르밀 화합물을 명명할 때, "1-데스메틸"은 생략된 것으로 이해해야 한다; 즉, 만일 포르밀그룹이 N-1에 존재하면, 메틸그룹은 존재할 수가 없다.

상술한 과정에는 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, K_2CrO_4 , Na_2CrO_4 , CrO_3 등과 같은 디크로메이트 또는 크로메이트 역시 사용 할수 있으나 나트륨디크로메이트 이수화물이 크로메이트로써 바람직하다고 밝혀졌다. 명세서 중에서 "크로메이트"란 용어는 모든 이러한 종류를 포함한다. 나트륨 디크로메이트 이수화물의 무수 알칼로이드에 대한 비율은 1.5 내지 2.0대 1(W/W) 범위내여야한다. 통상 사용되는 테트라하이드로푸란(THF)의 양은 사용된 VLB 또는 로이토신 또는 다른 알칼로이드 또는 알칼로이드 혼합물양에 대해 무수상태를 기준으로 약 100 내지 200배이며, 약 150 대 1(V/W)의 비율이 바람직하다. 반응온도는 -80°C(드라이아이스/아세톤) 내지 약 -50°C의 범위가 가능하다. 그러나 아세톤/ 드라이아이스조(-77

°C)를 사용하여 온도를 -70°C이하로 유지할 때 가장 만족스런 결과가 얻어진다 약-50°C이하의 온도-최적온도는 아니지만-에서도 만족스럽게 진행된다. 이 분야 전문가라면 쉽게 이해하는 바와 같이 저온 한계는 반응 혼합물이 고체화하기 시작하는 온도이며, 이는 약 -80°C인데 THF 중에 존재하는 용질에 관계된다.

반응시간은 약 2시간이 최적조건인데 1내지 3시간의 반응시간도 만족스럽다. 반응이 거의 완결된 후 황산제일철 또는 나트륨메타비설피트 같은 환원제로 산화혼합물을 세척하면 과산화물 또는 잔류 산화제를 제거하는데 유리하다. 산화제로는 황산이 바람직하나, 퍼클로르산 같은 다른 강산 역시 사용할 수 있다.

-60°C 크롬산 산화법에 의한 VLB의 빈크리스틴으로의 산화에는 아세톤-아세트산보다, THF가 용매로 써 월등하지만, 유럽특허청 공보 0,037,290호에 기술된 바와 같이, THF 및 나트륨 디크로메이트-황산을 병용하면 THF와 크롬산 또는 아세톤과 디크로메이트를 사용하는 경우에 비해 예상외로 탁월한 효과를 얻을 수 있음이 밝혀졌다.

[실시예 1]

VRA의 10g 샘플 4가지(빈카 로제아의 잎으로 부터 추출하여 미합중국 특허 제3,932,417호의 방법을 이용하여 제조한 조알칼로이드 혼합물)를 다음과 같이 처리한다 :

A. 알루미나상의 HPLC에 의해 VLB 분획을 제조하고; 실리카상의 HPLC에 의해 정제(98%) VLB를 제조하고; VLB설페이트로 전환시킨다.

B. A와 동일하나 그에 앞서 다음과정에 따라 재포르밀화를 수행한다 :

10g의 VRA 60ml에 의아세트산 무수물을 60ml의 포름산을 가한다. 혼합물을 주위온도에서 1시간 교반하고 진공건조시킨다. 그 건조잔사물 1000ml의 물중 150ml의 14N 수성수산화암모늄으로 중화한다. 알칼리성 용액을 1000ml씩의 염화메틸렌으로 3회 추출한다. 추출물은 모아 무수 황산나트륨상에서 건조시키고, 여과하고 용매를 진공증발시켜 제거한다.

C. 다음 방법에 따라 산화시킨다 :

10g의 VRA를 1200ml의 THF에 용해한다. 37.5ml의 빙초산을 가하고 혼합물을 질소불랭킷하에 클로로포름/드라이아이스조에 의해 약 -65°C로 냉각한다. 다음에, 1 내지 2분에 걸쳐, 용액(12.5g의 나트륨 디크로메이트를 75ml의 물에 용해하고 여기에 8.5ml의 18M 황산을 가해 제조한다)을 교반하면서 VRA 용액에 서서히 가하고(이 때 온도를 약 -65°C로 유지시킨다), 1000ml의 물중 165ml의 14M 수성수산화암모늄을 함유하는 용액중에 끓는다. 이 용액을 1000ml씩의 염화메틸렌으로 3차례 추출한다. 유기추출물을 합해 5% 수성 나트륨 메타비설피트로 50ml당 2.5g의 비율로 세척한다. 알루미나상HPLC로 빈크리스틴 분획을 제조하고; 실리카상 HPLC로 정제된 빈크리스틴을 제조하고; 빈크리스틴설페이트로 전환시킨다.

D. C와 동일하나 산화 및 알루미나상 HPLC과정 중간에 포르밀화 단계가 수행된다.

다음 표 1은 이들 네가지 시험결과를 요약한 것이다. 표에서, 1단은 VLB 설페이트 수율을 나타내며, 2단은 존재하는 1-데스포르밀 빈크리스틴(DFVCR)의 양으로 부터 예측되는 빈크리스틴 설페이트의 수율을 나타내고 3단은 빈크리스틴(VCR) 설페이트의 수율을 나타내며, 이를 모두 VRA 유리영기의 퍼센트로 표시한다. 분리는 해냈으나 실제적인 정제과정을 수행하기에는 너무 소량인 알칼로이드에 관해선 동일종류의 물질 대량을 이용한 선형시험을 기준하여 최종수율을 추정하였다.

[표 1]

시 험	VLB · SO ₄	VCR · SO ₄ DFVCR로 부터	VCR · SO ₄
A	34.6%	1.7%*	4.0%*
B	31.0%	ND	5.8%*
C	ND	0.4%*	33.1%
D	ND	ND	29.4%

정제된 알칼로이드의 최종수율은 필연적으로 감소되는데 취급상의 손실, 정제에 따른 손실 및 다른 분획에 존재하는 회수불가능한 양때문이다. VRA에 존재하는 로이로신의 산화에 의해 생성된 포르밀로이로신(조흔합물 분석에 의하면 40 내지 45%의 VLB와 비교해 25 내지 40%이다)을 빈크리스틴보다 앞선 분획으로써, HPLC 칼럼으로 부터 수득한다. 포르밀로이로신 분획을 제2차 HPLC 공정에 의해 더 정제한다.

상기표의 결과로 부터 본 발명의 신규한 산화법에 의한 빈크리스틴 수율은 표준방법에 의해 얻을 수 있는 수율과 최소한 같음을 알 수 있다. 예를들어, 본 방법에 의한 VLB의 산화로 부터 예측되는 VCR 수율은 A(80% 수율)에서 약 27.7%이며, 데스포르밀빈크리스틴 및 빈크리스틴의 수율은 33.4%(실제수율은 33.1%)이다.

조알칼로이드 혼합물의 산화를 더 연구하기 위해, D에 따라 4× 규모(40g의 VRA)로 다섯번째 시험(E)을 실시한다. 이 시험결과는 표 2와 같으며 각 단의 표제는 표1에서와 같다.

[표 2]

시 험	VLB · SO ₄	VCR · SO ₄ DFVCR로 부터	VCR · SO ₄
E	ND	ND	43.0%
VRA 출발물질*	31%	2.5%	3.5%

* = 선행시험을 기준한 예상 수율

ND = 측정할 수 없음

여기서, VCR의 총이론적 수율은 30.8%가 된다. [(80% 전환율 × 31% VLB=24.8%)+2.5 DFVCR+3.5% VCR=30.8%]. 실제수율은 43.0%로 이론적 수율을 훨씬 초과한다. 이러한 고수율에 대한 설명으로 몇 가지의 가능한 경우를 생각할 수 있다. 먼저, N메틸 빈카 이량체의 상응하는 N-포르밀 화합물로의 산화에 의해 알칼로이드 혼합물이 단순화되는데, 산화혼합물의 주성분은 포르밀로이로신 및 빙크리스틴인데 반하여 VRA에서는 이들 두가지의 목적 알칼라이드(암화학요법의 관점에서)는 VLB, 로이로신 및 몇 가지의 소량 N-메틸 알칼로이드로 크게 오염되어 있기 때문이다.

다시말해, HPLC 정제 혼합물을 VRA 출발물질보다 훨씬 단순하다. 두번째로, VLB를 크로마토그래피로 정제할 때, 몇 가지의 VLB오염물 분획은 크로마토그래프 상에서 이웃하여 있으므로 정제된 VLB를 기질로 사용할 때는 이들을 산화에 이용할 수 없다. 그러나, 이로 인해 소실된 VLB의 대부분은, 인접된 크로마토그래프의 분획, VLB 설페이트 생성모액 등을 모아 이로부터 VLB를 분리하므로써 회수할 수 있다. 이 VLB는 이어서 빙크리스틴으로 산화시킬 수 있는데 그 수율은 80%이다. 따라서, 빙크리스틴 수율의 증가는 실제로 주류(mainstream) 수율의 증가이며 반드시 총수율의 증가는 아니다.

주류 수율의 증가는 수득된 빙크리스틴 g당 모액, 인접 크로마토그래프적 분획등으로 부터 VLB를 회수하고, 이어서 VLB를 빙크리스틴으로 전환시키는 비용이, 출발물질 g당의 비용보다 훨씬 높다는 점에서 특히 유리하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

빈카 로제아의 잎으로 부터 추출에 의해 수득한 비분리상태의 인돌-디하이드로인돌 이량체성 알칼로이드의 테트라하이드로프란(THF) 용액을 -80°C 내지 -50°C의 온도범위에서 원래 존재하는 1-메틸동종체를 거의 다 1-포르밀동종체로 전환될 때 까지 크로메이트-황산 수용액과 접촉시키고; 임의로는 존재할 수 있는 1-데스포밀 동종체를 포르밀화시키고; 한가지 이상의 1-포르밀 동종체를 분리시키는 것을 특징으로 하여, 균등한 인돌- 디하이드로인돌 이량체의 한가지 이상의 1-포르밀 동종체를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 빙크리스틴 및 포르밀-로이로신을 제조하기 위해 빈카 로제아로부터 추출해낸 비분리 상태의 인돌-디하이드로인돌 이량체성 알칼로이드로 부터 빙크리스틴 및 포르밀-로이로신을 분리하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 빙크리스틴을 제조하기 위해 빈카 로제아로부터 추출해낸 비분리상태의 인돌-디하이드로인돌 이량체성 알칼로이드로 부터 빙크리스틴을 분리하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 포르밀-로이로신을 제조하기 위해 빈카 로이드로부터 추출해낸 비분리상태의 인돌-디하이드로인돌 이량체성 알칼로이드로 부터 포르밀-로이로신을 분리하는 방법.

청구항 5

제1 내지 4항의 어느 하나에 있어, 분리의 최종단계에 크로마토그래프적 방법을 사용하는 방법.