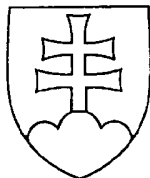


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 842

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C07D 305/14
A61K 31/335

- (21) Číslo prihlášky: **1414-2000**
(22) Dátum podania prihlášky: **18. 3. 1994**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **3. 12. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **93/03251**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **22. 3. 1993**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **FR**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **10. 1. 1996**
Vestník ÚPV SR č.: **01/1996**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **22. 11. 2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky: **1163-95**
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/FR94/00300**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO94/21622**

(73) Majiteľ: **AVENTIS PHARMA S. A., Antony, FR;**

(72) Pôvodca: **Durand André, Sainte-Geneviève-des-Bois, FR;**
Gerbaud Alain, Athis-Mons, FR;
Margraff Rodolphe, Viry-Châtillon, FR;

(74) Zástupca: **Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Trihydrát (2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,20-epoxy-1beta,7beta,10beta-trihydroxy-9-oxo-11-taxen-13alfa-yl-3-terc-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxypropionátu**

(57) Anotácia:
Opísaný je trihydrát(2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,20-epoxy-1beta,7beta,10beta-trihydroxy-9-oxo-11-taxen-13alfa-yl-3-terc-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxypropionátu, ktorý sa môže získať napríklad čistením Taxoteru odstredivou rozdeľovacou chromatografiou.

SK 282842 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka novej chemickej zlúčeniny, ktorou je trihydrát (2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,20-epoxy-1beta,7beta,10beta-trihydroxy-9-oxo-11-taxen-13alfa-yl-3-*tert*-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxypropionátu. Keďže uvedená chemická štruktúra základnej zlúčeniny zodpovedá štruktúre produktu, ktorý sa všeobecne označuje ako Taxoter, je možné uvedený trihydrát stručne označiť ako trihydrát Taxoteru.

Doterajší stav techniky

10-Desacetylbaecatin III extrahovaný z listov tisú je užitočný na prípravu Taxoteru v podmienkach opísaných napríklad v európskych patentových dokumentoch EP O 253 738 a EP O 336 841 alebo v medzinárodnej patentovej prihláške PCT WO 92/09589.

10-Desacetylbaecatin III získaný extrakciou listov tisú obsahuje v závislosti od rastlinného druhu, z ktorého sa získal, nečistoty, ktoré v podstate tvoria produkty patriace do skupiny taxoidov, medzi ktoré napríklad patrí 2alfa-benzoyloxy-4-acetoxy-5beta,20-epoxy-1beta,7beta,10beta,13-alfa,19-pentahydroxy-9-oxo-11-taxén, 2alfa-benzoyloxy-4-acetoxy-5beta,20-epoxy-1beta,7alfa,10beta,13alfa-tetrahydroxy-11-taxén alebo taxiny.

Taxoter, ktorý sa získava semisyntézou z 10-desacetylbaecatinu III, obsahuje ako hlavné nečistoty esterifikačné produkty nečistôt obsiahnutých vo východiskovom 10-desacetylbaecatine, ako aj ďalšie nečistoty, ktoré napríklad pochádzajú z epimerácie uhlíkového atómu v polohe 2' bočného reťazca.

V publikácii *Journal of liquid Chromatography*, 15 (4), 697 - 706 (1992) je opísaná separácia zmesi taxolu a cefalomaninu z extraktov z *T. baecata* rýchlou protiprúdovou chromatografiou. Touto metódou sa získal taxol s maximálnou čistotou 97 %.

10-Desacetylbaecatin III a samotný Taxoter sa môžu obyčajne čistiť metódami kvapalinovej stĺpcovej chromatografie (HPLC) na stĺpci silikagelu, ako je to písané napríklad v publikácii *J. of Chromatography*, 587, 300 - 305 (1991). Aj keď sú tieto metódy vhodné na čistenie niekoľkých desiatok gramov produktu, ich realizácii v priemyselnom meradle bránia nedostatky, medzi ktoré patria veľké objemy spotrebovaných rozpúšťadiel a manipulácia so stacionárnou fázou (silikagél) a odbúranie tejto stacionárnej fázy, ktorá je kontaminovaná toxickými zvyškami, pričom tieto nedostatky majú zásadný charakter a nemožno ich zanedbať.

V prípade taxoidov, ktoré tvoria produkty, ktoré majú zväčša vysokú toxicitu a nízku stabilitu, je obzvlášť dôležité mať k dispozícii čistiace metódy vykazujúce dobrú produktivitu, ktoré nevyžadujú použitie pevných stacionárnych fáz, ktorých obstarávacie náklady, použitie a odbúranie sú nákladné, ktoré vyžadujú použitie iba malých objemov rozpúšťadiel a ktoré sú ľahko automatizovateľné a umožňujú tak kontinuálnu produkciu.

Teraz sa zistilo, že čistenie taxoidov a najmä čistenie Taxoteru a 10-desacetylbaecatinu III sa môže uskutočniť použitím odstredivej rozdeľovacej chromatografie (CPC) alebo veľmi rýchlej protiprúdovej chromatografie, ktorej podstatu opísal napríklad A. Foucault a P. Rosset v *Analisis*, 16 (3), 157 - 167 (1988).

Odstredivá rozdeľovacia chromatografia umožňuje uskutočniť delenie zložiek obsiahnutých v zmesi určenej na delenie medzi dve nemiešateľné kvapalné fázy postupne

realizovanými rovnovážnymi stavmi logickým a automatickým spôsobom.

Táto metóda sa vyznačuje veľmi účinným rozdeľovacím mechanizmom, silnou retenciou stacionárnej fázy a veľkou rýchlosťou mobilnej fázy, čo má za následok vynikajúcu separáciu počas niekoľkých hodín.

Odstredivá rozdeľovacia chromatografia vyžaduje použitie dvoch alebo niekoľkých rozpúšťadiel poskytujúcich dve čiastočne miešateľné fázy. Aj keď existuje nekonečné množstvo rozpúšťadiel s takýmto charakterom, je pre priemyselné meradlo obzvlášť dôležité použiť priemyselné nechlórované a netoxické rozpúšťadlá. Z rozpúšťadiel, ktoré sa môžu priemyselne použiť s obmedzeným rizikom, sa môžu uviesť alkoholy, ako napríklad metanol, étery, ako napríklad metyl-*tert*-butyléter, estery, ako napríklad etylacetát, ketóny, ako napríklad metylizobutylketón, a alifatické uhľovodíky, ako napríklad heptán alebo izooktán.

Na uskutočnenie účinného čistenia je nevyhnutné zvoliť zmes rozpúšťadiel, rýchla a úplná separácia ktorých vedie k dvom fázam, rozdeľovací koeficient ktorých je 0,1 až 10, výhodne 0,5 až 5, pričom tento rozdeľovací koeficient leží najmä v blízkosti 1.

Produkt, pre ktorý sa rozdeľovací koeficient (K) rovná napríklad 10, je desaťkrát rozpustnejší v hornej fáze než v spodnej fáze. Dôsledkom toho sa bude tento produkt veľmi rýchlo eluovať v prípade, keď vrchná fáza bude mobilná, a iba po dlhom čase a málo špecificky v prípade, keď bude mobilnou fázou spodná fáza. Naopak v prípade, keď rozdeľovací koeficient K bude blízky 1, potom bude rozpustnosť produktu prakticky rovnaká v oboch fázach, pričom sa môžu použiť oba elučné postupy, prípadne, s cieľom maximálnej separácie, vo vzájomnej kombinácii.

Okrem toho je dôležité, aby retencia v stacionárnej fáze, ktorá predstavuje zlomok celkového objemu zariadenia zaujatého rovnovážnou stacionárnou fázou, pričom prietok mobilnej fázy je stály, bola pokiaľ možno čo najvyššia alebo aspoň rovná 50 %.

Navyše je vzhľadom na zlepšenie produktivity obzvlášť zaujímavé usporiadanie, v ktorom sa môže pracovať pri zvýšenom prietoku, ktorý je limitovaný maximálnym tlakom vytvoreným rotorom.

Podstata vynálezu

Pri uvedenom novom spôsobe čistenia Taxoteru, ktorým je, ako už bolo uvedené, (2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,20-epoxy-1beta,7beta,10beta-trihydroxy-9-oxo-11-taxen-13alfa-yl-3-*tert*-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxypropionát, vzniká ako výsledný produkt trihydrát Taxoteru, ktorý je novou chemickou zlúčeninou a tvorí podstatu vynálezu.

Pri uvedenom spôsobe čistenia Taxoteru sa Taxoter čistí odstredivou rozdeľovacou chromatografiou medzi dve čiastočne miešateľné fázy tvorené vodou a nechlórovanými a netoxickými rozpúšťadlami zvolenými z množiny zahrnujúcej alkoholy, étery, estery, ketóny a alifatické uhľovodíky, pričom podstata tohto spôsobu spočíva v tom, že sa na čistenie Taxoteru použije zmes alifatického uhľovodíka, esteru, alkoholu a vody, ktorej rozdeľovací koeficient medzi obe fázy je 0,1 až 10.

Výhodne je rozdeľovací koeficient medzi obe fázy 0,5 až 5. Výhodne je rozdeľovací koeficient medzi obe fázy rovnajúci sa 1. Výhodne sa na čistenie Taxoteru použije zmes heptánu, etylacetátu, metanolu a vody. Výhodne sa použije zmes heptánu, etylacetátu, metanolu a vody v objemovom pomere 2 : 4 : 3 : 2.

Uvedená odstredivá rozdeľovacia chromatografia sa môže uskutočniť v ľubovoľnom komerčne dostupnom zariadení prispôsobenom na tento účel, napríklad v zariadeniach, ktoré vyvinula spoločnosť Yoichiro Ito/CRC Crit. Rev. Anal. Chem., 17, 65 (1986) a uviedla na trh firma SANKI Engineering Limited, Kyoto (Japonsko).

V nasledujúcej časti opisu bude vynález bližšie objasnený pomocou príkladov jeho konkrétneho uskutočnenia, pričom tieto príklady majú iba ilustračný charakter a nijako neobmedzujú rozsah vynálezu, ktorý je jednoznačne vymedzený definíciou patentových nárokov.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 znázorňuje spektrogram získaný práškovou difrakčnou röntgenovou spektroskopiou produktu z príkladu 1 uskutočnenou za podmienok opísaných v príklade 1.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Čistenie Taxoteru za vzniku finálneho trihydrátu Taxoteru

Taxoter (alebo (2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,20-epoxy-1beta,7beta,10beta-trihydroxy-9-oxo-11-taxen-13alfa-yl-3-*terc*-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxypropionát) sa získa pôsobením zinku v prítomnosti kyseliny octovej na (2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,20-epoxy-1beta-hydroxy-7beta,10beta-bis-(2,2,2-trichlóretoxykarbonyloxy)-9-oxo-11-taxen-13alfa-yl-3-*terc*-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxypropionát za podmienok opísaných v európskom patente EP O 336 841.

Rozpustí sa 10 g (2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,20-epoxy-1beta-hydroxy-7beta,10beta-bis-(2,2,2-trichlóretoxykarbonyloxy)-9-oxo-11-taxen-13alfa-yl-3-*terc*-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxypropionátu v 150 cm³ metyl-*terc*-butyléru, a potom sa k získanému roztoku pridá 10 g zinku. Po odparení do sucha sa získa sivý prášok, ktorý sa zavedie do reaktora. Pri miešaní sa pridá v priebehu 5 minút zmes 6 cm³ kyseliny octovej a 50 cm³ acetonitrilu. Zmes sa zahrieva zvonka na vodnom kúpeli s teplotou 45 °C jednu hodinu. Po ochladení na ľade sa za silného miešania zavedie 850 cm³ metyl-*terc*-butyléru, a potom sa zinočnatá soľ a prebytočný zinok odfiltrujú na sklenej frite s poréznosťou 4.

Filtrát sa zahutí do sucha. Takto sa získa krehký pevný produkt (12 g), ktorý sa bezprostredne vyberie 20 cm³ etylacetátu, 15 cm³ metanolu, 10 cm³ heptánu a 10 cm³ vody.

Odstredivá rozdeľovacia chromatografia sa uskutočňuje v zariadení SANKI LLI-07. Odstredivka sa napája dvoma piestovými čerpadlami vybavenými hrdiacimi ventilmi limitujúcimi tlak na 5,5 MPa. Jedno z čerpadiel slúži na poháňanie jednej alebo druhej z oboch fáz prostredníctvom rozvodného ventilu. Druhé čerpadlo je vyhradené na nástrek.

Po naplnení zariadenia stacionárnou fázou pri nízkych otáčkach (200 otáčok za minútu) a veľkom prietoku (110 cm³/minútu) sa bezprostredne uskutoční nástrek.

Nastriekavajú sa obe fázy, pričom sa začína vodnou fázou a eluuje sa pri prietoku 60 cm³/minútu vodnou fázou systému hexán-etylacetát-metanol-voda (v objemovom pomere 2 : 4 : 3 : 2). Berie sa 1,9 litra stacionárnej fázy, čo predstavuje retenciu 71 % a potom sa odoberajú frakcie s objemom 15 cm³. Frakcie 72 až 110 sa zlučia a zahustia až

na objem 140 cm³. Vylúčená zrazenina sa oddelí filtráciou. Takto sa vo výťažku 80,5 % získa 5,2 g trihydrátu Taxoteru s čistotou 99,7 %.

Získaný produkt sa analyzoval použitím práškovej difrakčnej röntgenovej spektroskopie uskutočnenej v zariadení Siemens D5000 Matic (trubica s kobaltovou antikatódou, privedené urýchľovacie napätie 40 kV, intenzita vlákna 30 mA) a lineárneho detektora Braun (vybaveného detekčným okienkom so šírkou 10° v 2θ). Dopadajúce svetlo je filtrované 0,2 mm štrbinami usporiadanými pred difrakťometrom a Solleroými štrbinami. Záznam difrakčného spektrogramu sa uskutočňuje za nasledujúcich podmienok: rozsah 1,5 až 50° 2θ po krokoch 0,02° 2θ, meracia doba 10 sekúnd). Získaný spektrogram je zobrazený na obrázku 1.

Elementárna analýza

(Taxoter.3H₂O = C₄₃H₅₃NO₁₄.3H₂O)

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	voda (%)
vypočítané	59,92	6,90	1,63	31,55	6,27
nájdene	60,36	6,96	1,68	28,28	4,9 - 6,0 - 6,2

Príklad 2

Čistenie Taxoteru za vzniku finálneho trihydrátu Taxoteru

Postupuje sa rovnako ako v príklade 1, pričom sa však vychádza z 82 g (2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,20-epoxy-1beta-hydroxy-7beta,10beta-bis-(2,2,2-trichlóretoxykarbonyloxy)-9-oxo-11-taxen-13alfa-yl-3-*terc*-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxypropionátu, 82 g zinku a 150 cm³ zmesi 49,2 cm³ kyseliny octovej a 328 cm³ acetonitrilu a získa sa 115 g surového produktu, ktorý teoreticky obsahuje 49,69 g Taxoteru alebo 53 g trihydrátu Taxoteru.

Surový produkt sa vyberie 450 cm³ metyl-*terc*-butyléru a trikrát sa premyje celkom 450 cm³ vody obsahujúcej 15 g chloridu sodného. Vodné fázy sa zlučia a dvakrát extrahujú 200 cm³ metyl-*terc*-butyléru. Tri éterické extrakty sa zlučia a zahustia do sucha. Takto sa získa 72 g krehkého pevného produktu, ktorý sa vyberie 120 cm³ metanolu.

K získanému bledožltému roztoku sa v nasledujúcom poradí pridá 160 cm³ etylacetátu, 80 cm³ vody a 80 cm³ heptánu.

Takto sa získajú dve číre kvapalné fázy s celkovým objemom 460 cm³, pričom horná vrstva predstavuje len jednu štvrtinu celkového objemu namiesto 35 % v neprítomnosti Taxoteru.

Zariadenie na odstredivú rozdeľovaciu chromatografiu sa naplní organickou fázou pri prietoku 110 cm³/minútu a rýchlosťou otáčania 200 otáčok za minútu. Keď je zariadenie plné, zvýši sa rýchlosť otáčania na 800 otáčok za minútu. Nastriekne sa vodná fáza a po nástreku organickej fázy sa uskutoční premytie 200 cm³ organickej fázy a eluuje sa pri prietoku 60 cm³/minútu vodnou fázou.

Odoberá sa 2,5 litra nadbytočnej stacionárnej fázy, čo predstavuje retenciu 67,7 %.

Po prechode 200 cm³ vodnej mobilnej fázy sa odoberá 360 frakcií s objemom 12 až 13 cm³. Frakcie 25 až 110 po zahutení až na objem 200 cm³ poskytnú vo výťažku 87,7 % zrazeninu 46,5 g trihydrátu Taxoteru, s čistotou 99,1 %.

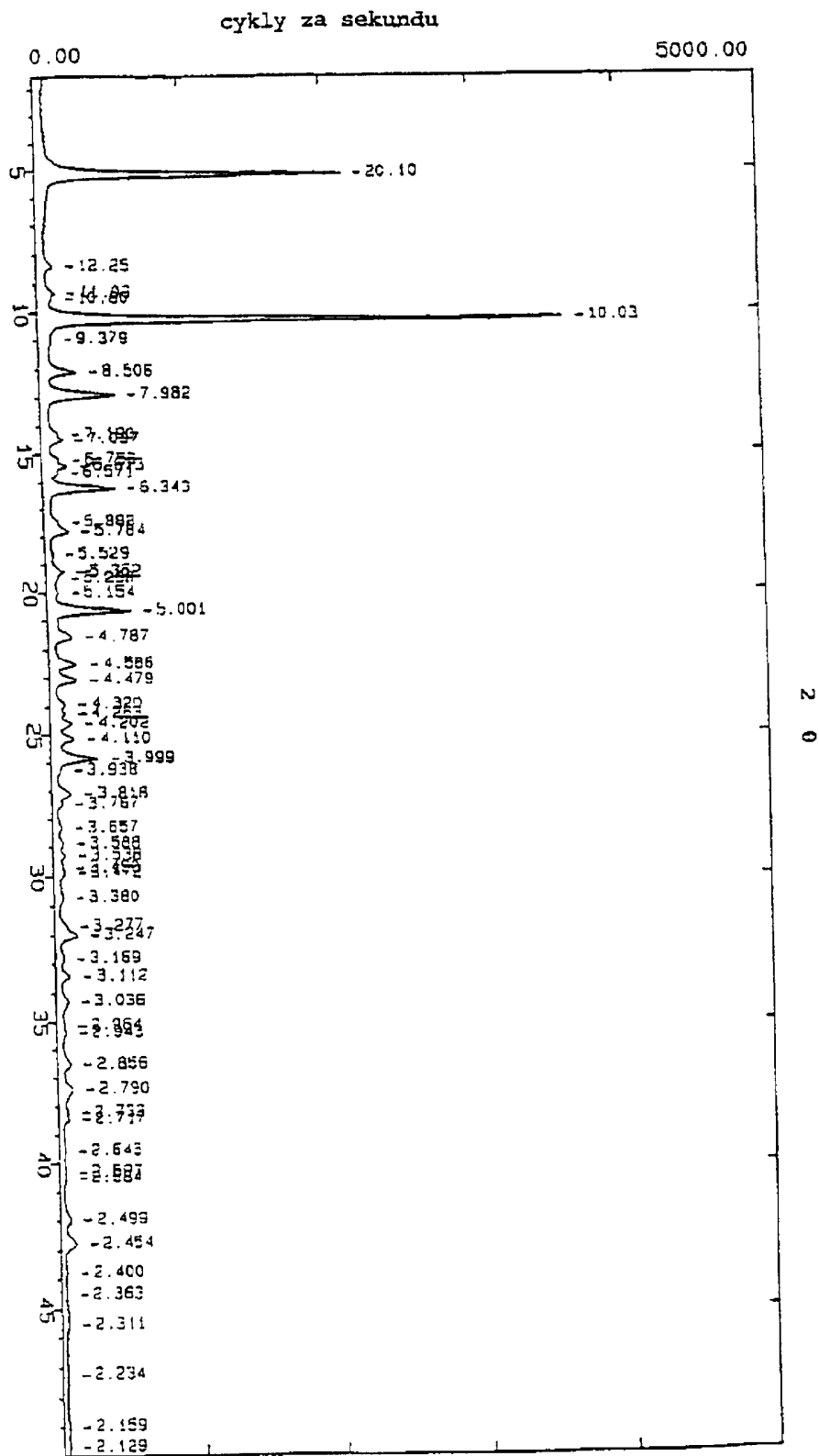
Aj tento produkt sa analyzoval pomocou práškovej difrakčnej röntgenovej spektroskopie a elementárnej analýzy, pričom sa získali rovnaké výsledky oboch analýz ako v príklade 1.

PATENTOVÉ NÁROKY

Trihydrát (2R,3S)-4-acetoxy-2alfa-benzoyloxy-5beta,-
20-epoxy-1beta,7beta,10beta-trihydroxy-9-oxo-11-taxen-
-13alfa-yl-3-*tert*-butoxykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroxy-
propionátu.

1 výkres

OBR. 1



Koniec dokumentu