



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

246541
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 29/00

(22) Přihlášeno 25 09 84
(21) (PV 7221-84)

(40) Zveřejněno 13 03 86

(45) Vydáno 15 12 87

(75)
Autor vynálezu

SVOBODA IVAN ing., VONDRÁČEK MILOSLAV RNDr.,
BÁRTA MIROSLAV RNDr., PRAHA

(54) Způsob izolace antracyklinů

1

2

Způsob izolace antracyklinů se skeletem 7,8,9,10-tetrahydro-6,11-dihydroxy-5,12-naf-tacenchinonovým, zejména daunomycinu nebo adriamycinu, jejich aglykonů nebo jejich derivátů, připravených syntézou nebo fermentací.

Řešení využívá vlastnosti antracyklinů uvedeného skeletu tvořit kovový komplex s chloridem měďnatým, jeho velmi omezené rozpustnosti a rychlé sedimentaci.

Uvedené antracykliny slouží jako protinádorová antibiotika.

Vynález se týká způsobu izolace antracyklinů, významných protinádorových antibiotik.

Uvedené antracykliny lze připravit buď synteticky, nebo působením různých druhů aktinomycet, jako například *Streptomyces coeruleorubidus*, *Streptomyces peucetius*, *Actinomadara carminata*.

Dosud publikované izolační postupy (Process Biochemistry Vol. 14, No. 12, 1979; Folia Microbiol. 22, 275 až 285, 1977 aj.) využívají pro izolaci antracyklinů obvyklých metod získání účinných látek z fermentačních pūd, a to extrakce organickými rozpouštědly, izolace na iontoměničích, popřípadě kombinaci obou metod, srážecích metod založených na nerozpustnosti účinné látky v příslušném rozpouštědle a následně krystalizace apod.

Nevýhodou uvedených metod izolace antracyklinů je značné množství rozpouštědel, neboť je třeba několikanásobné extrakce celého objemu nativní půdy, přičemž odpadní materiál obvykle obsahuje určité procento biologicky účinných látek. Vlivem těchto dvou faktorů klesá i účinnost izolačního procesu. Nelze opominout i těžkosti výrobního charakteru při manipulaci s velkým objemem reakční hmoty.

Uvedené nevýhody antracyklinů se skeletem 7,8,9,10-tetrahydro-6,11-dihydroxy-5,12-naftacenchinonovým, zejména daunomycinu nebo adriamycinu, jejich aglykonů nebo jiných derivátů připravených syntézou nebo fermentací, odstraňuje způsob izolace antracyklinů podle vynálezu.

Podstata izolace antracyklinů podle vynálezu spočívá v tom, že se k roztoku účinné látky přidá ekvivalentní množství soli dvojmocného přechodového kovu, dostatečně rozpustné v daném prostředí, potom se upraví pH roztoku na hodnotu 4 až 9, po odstranění matečného kapalného média se vzniklý omezeně rozpustný kovový komplex rozpustí a/nebo suspenduje v rozpouštědle použitým pro další krok syntézy nebo izolace, takto vzniklý roztok se případně za míchání okyselí kyselinou šťavelovou na hodnotu pH 1 až 4, načež se vyloučený šťavelan příslušného kovu oddělí a získaný filtrát účinné látky se zpracovává o sobě známým způsobem. V případě izolace daunomycinu se první extrakce provádí butylacetátem.

Máme-li k dispozici surový roztok účinné látky po fermentaci, podstata způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že se do tohoto surového roztoku přidá ekvivalentní množství soli dvojmocného přechodového kovu

dostatečně rozpustné v daném prostředí, po té se upraví pH roztoku na hodnotu 4 až 9, po odstranění matečného kapalného média se vzniklý omezeně rozpustný kovový komplex společně s myceliem suspenduje v rozpouštědle použitým pro další krok izolace.

Takto vzniklá suspenze se za míchání okyselí na hodnotu pH 1 až 4, načež se oddělí mycelium a ve filtrátu se zásadou upraví pH na hodnotu 4 až 9, vzniklý omezeně rozpustný kovový komplex se oddělí a/nebo suspenduje v rozpouštědle použitým pro další krok izolace, získaný roztok se případně za míchání okyselí kyselinou šťavelovou na hodnotu pH 1 až 4, po té se vyloučený šťavelan příslušného kovu oddělí a získaný filtrát účinné látky se zpracovává o sobě známým způsobem. V případě izolace daunomycinu se první extrakce provádí butylacetátem.

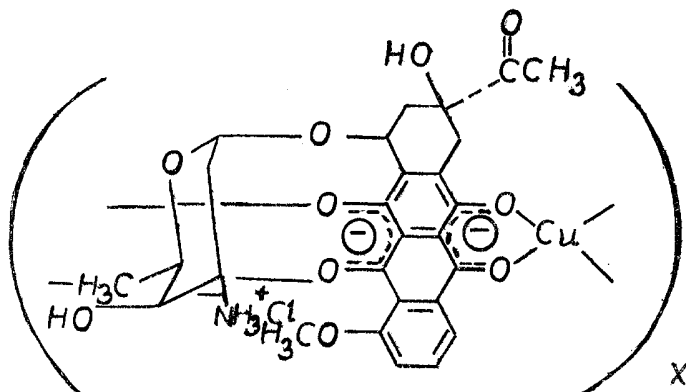
Další výhodou izolace antracyklinů podle vynálezu je to, že se do surového roztoku účinné látky přidá ekvivalent měďnatých iontů, výhodně ve formě chloridů nebo síranu měďnatého, čímž vznikne kovový komplex se stechiometrií kov/účinná látka = 1 : 1 až 2.

Způsob izolace antracyklinů podle vynálezu se dále vyznačuje tím, že se po přidání odpovídajícího množství soli příslušného kovu upraví pH roztoku na hodnotu 6,5.

Další výhoda izolace antracyklinů po fermentaci způsobem podle vynálezu se vyznačuje tím, že se vzniklá suspenze mycelia a kovového omezeně rozpustného komplexu okyselí kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 1,3 až 1,5, čímž dojde k rozpuštění kovového komplexu a tím umožní odfiltrování účinné látky od již nepotřebného mycelia.

V případě izolace antracyklinů po fermentaci se způsob podle vynálezu vyznačuje tím, že se po odstranění matečného kapalného média včetně mycelia, vzniklý roztok nebo suspenze kovového komplexu okyselí za míchání kyselinou šťavelovou na hodnotu pH 1,5, čímž dojde k rozpuštění kovového komplexu a vysrážení šťavelanu kovu.

Způsob podle vynálezu tedy využívá vlastnosti 7,8,9,10-tetrahydro-6,11-dihydroxy-5,12-naftacenchinonových derivátů tvořit s některými transičními kovy omezeně rozpustné kovové komplexy (Biochim. Biophys. Acta 103, 25, 1975; J. Inorg. Biochem., Vol. 16, 91 až 107, 1982) vazbou kovu na deprotonovanou formu antrachinonu, jak vyplývá z následujícího schématu: (uveden příklad vazby mědi na daunomycin)

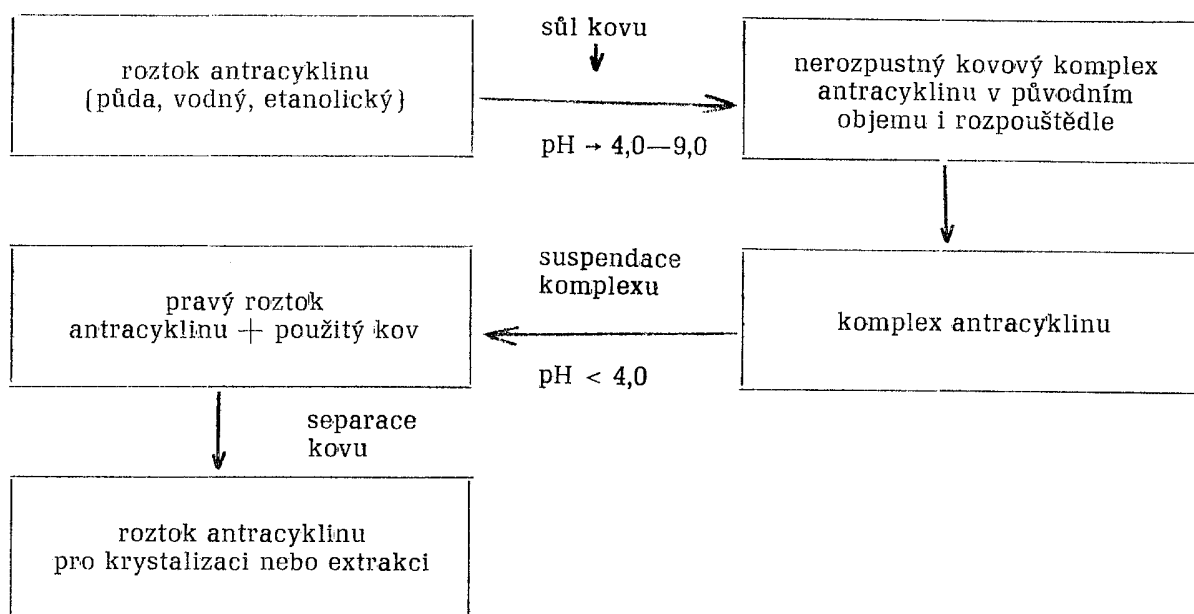


Způsob izolace antracyklinů podle vynálezu spočívá v možnosti kvantitativního vysrážení látek antracyklinového typu, získaných synteticky, tak fermentačně, z fermentačních pūd, vodných roztoků a organických rozpouštědel ve formě velmi omezeně rozpustného kovového komplexu, v jeho separaci a dalším zpracování v objemu, který je již řádově menší proti objemu, z něhož byla účinná látka srážena. To má velký význam hlavně z výrobního hlediska. Rozpustnost látky v určitém rozpouštědle za daných podmínek je jako přírodní konstanta neměnná veličina, a tedy musí kvantitativním převedením této látky do řádově menšího objemu vzrůst i účinnost její izolace. Tohoto principu využívá způsob podle vynálezu.

Totální nerozpustnost kovových komplexů antracyklinů při hodnotě pH 4 až 9 ve fermentačních pūdách ve vodě nebo organických rozpouštědlech umožňuje redukci zpracovávaného objemu v kterékoliv fázi izolačního postupu. Tím jsou vytvářeny řá-

dově lepší podmínky pro nasazení klasické extrakční metody, která může být součástí izolačního postupu. V případě dostatečné čistoty kovem sráženého antracyklinu ať již vlivem dostatečné selektivity produkčního kmene nebo předchozích operací lze extrakci eliminovat a po odstranění kovu krystalovat účinnou látku přímo z roztoku. Kov použitý k vysrážení komplexu (například ionty železa, zinku, mědi, kobaltu, niklu aj.) lze snadno odstranit jeho vysrážením ve formě omezeně rozpustné soli (například oxalát, sulfid) a jejím odfiltrováním, nebo lze využít omezené rozpustnosti některé jeho soli v organickém rozpouštědle v průběhu extrakce (je-li tato prováděna), kdy sraženina komplexu zůstává ve vodné fázi. Příklad jmenovaný jako druhý je ovšem k odstranění kovu méně vhodný pro častou tvorbu úporných emulzí.

Způsob izolace antracyklinů podle vynálezu vyplývá z následujícího blokového schématu:



Uvedené blokové schéma kvantitativního srážení antracyklinů (typu 7,8,9,10-tetrahydro-6,11-dihydroxy-5,12-naftacencinon) je pro izolaci jednotlivých derivátů nutno vhodným způsobem modifikovat; například při izolaci daunomycinu z fermentační půdy není účelné odstranění kovu v první fázi izolace.

Srážení antracyklinů ve formě kovových omezeně rozpustných komplexů podle vynálezu má kromě již uvedených výhod i tu přednost, že při izolaci účinných látek z nativních půd lze živný roztok odstranit již v počátku izolace a všechny ostatní kroky izolace provádět v čistých rozpouštědlech. Ve všech případech izolací antracyklinů podle vynálezu z nativní půdy touto metodou bylo navíc zjištěno značné urychlení separace mycelia filtrací na křemelinových filtrech, které potom probíhá i bez obnovení povrchu křemelinového filtru. Oddělení kovového komplexu z roztoku, který již neobsahuje mycelium, usnadňuje nově zjištěná a dosud nepublikovaná vlastnost kovového komplexu, a to jeho schopnost sedimentace na třetinový objem během 6 až 7 hodin. Vrstvu kapaliny nad sedimentem kovového komplexu lze dekantovat a případnou následnou centrifugaci či filtraci kovového komplexu lze provést pouze v třetinovém objemu proti původnímu, z kterého byl kovový komplex srážen. Tím se značně zjednoduší výrobní zařízení a dojde i ke snížení výrobních nákladů.

Výpočet příkladů izolace látek podle vynálezu obsahujících ve své molekule 7,8,9,10-tetrahydro-6,11-dihydroxy-5,12-naftacendionový skelet, může být velice obsáhlý, neboť metodu kvantitativního srážení kovových antracyklinových komplexů lze nasadit ve všech izolačních metodách, kdy je účelné kvantitativní převedení antracyklinu do malého objemu, například při izolaci antracyklinu na iontoměničích. Způsob podle vynálezu umožňuje zredukovat objem kapaliny, ze které se účinná látka adsorbuje na iontoměničích; umožňuje kvantitativně získat antracyklin z chelátu a tento pak izolovat z minimálního objemu. Způsob podle vynálezu lze uplatnit v extrakčních postupech izolace. Kombinací „klasických“ způsobů izolace antracyklinů se způsobem izolace podle vynálezu může být celá řada.

Následující příklady způsobů izolace antracyklinů podle vynálezu pouze dokládají, ale nijak neomezují.

Příklad 1

Izolace daunomycinu

V 1 000 ml fermentační půdy se ihned po ukončení fermentace rozpustí mírný nadbytek soli příslušného kovu (chlorid měďnatý, síran zinečnatý) v takovém množství, aby roztok obsahoval ekvivalent kovu pro tvorbu komplexu se stechiometrií kovdaunomy-

cin = 1:1 až 2 (navážka se řídí počtem stanovených jednotek) a přidávkem koncentrovaného čpavku se upraví pH na hodnotu 6,5. Po krátkém promíchání se prázdná půda odfiltruje na křemelinovém filtru, mycelium s vysráženým kovovým komplexem se na filtru promývá destilovanou vodou do doby, až filtrát teče bezbarvý. Tím je odstraněn přebytek kovu použitý k vysrážení komplexu (při hodnotách pH vyšších než 6,0 tvoří 7,8,9,10-tetrahydro-6,11-dihydroxy-5,12-naftacencinonové deriváty kovové komplexy se stechiometrií kov/antracyklin = 1:2). Mycelium s vysráženým komplexem je přeneseno do kádinky, kde se rozmíchá v takovém množství destilované vody, aby vznikla míchatelná suspenze a upraví se pH na 1,3 až 1,4 přidávkem koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl). Suspendované mycelium se při teplotě místnosti míchá po dobu 30 minut. Po této operaci je vyextrahované mycelium odfiltrováno na křemelinovém filtru a na filtru promýváno okyselenou destilovanou vodou (HCl) do doby, kdy filtrát teče bezbarvý. K vytěsnění posledních zbytků účinné látky z filtračního koláče (mycelia) je možné na závěr filtrace promýt mycelium malým množstvím etanolu do filtrátu. Ve filtrátu se přidávkem koncentrovaného čpavku upraví pH na 6,5 a opětovně vyloučený kovový komplex daunomycinu se vhodným způsobem separuje — po sedimentaci komplexu na třetinový objem a dekantací — centrifugací, nebo lépe filtrací na křemelinovém filtru, což umožní důkladné promytí komplexu vodou přímo na filtru. Souborem výše zmíněných operací byl získán kvantitativně veškerý materiál antracyklinové povahy, jež obsahovala původní fermentovaná půda, ve formě nerozpustného kovového komplexu, objem sráženiny ve vlhkém stavu činí 5 až 8 % obj. původního objemu půdy. Další operace s tímto preparátem (rozpuštění, extrakce, krystalizace atd.) jsou pak prováděny v minimálních objemech daných potřebou manipulace s nimi. Získaný preparát obsahuje 98 až 99 % daunomycinu z původního množství stanoveného v nativní půdě.

Vlhký, případně suchý komplex suspendujeme v minimálním množství destilované vody a za míchání přidáváme mírný nadbytek ekvivalentního množství kyseliny šťavelové pro vyvázání kovu a roztok zchladíme na 10 až 15 °C. Po 10 minutách míchání odfiltrujeme vyloučený šťavelan měďnatý a filtrát dvakrát extrahujeme v dělicí nálevce nebo extrakční koloně stejným objemem octanu butylnatého. Do octanu butylnatého přejde daunomycinon, vodnou fází obsahující daunomycin dvakrát extrahujeme stejným množstvím n-butanolu. V butanolicím extraktu pak po spojení obou podílů upravíme pH na hodnotu 6,0 až 7,0 a zfiltrujeme jej na křemelinovém filtru. Ve filtrátu se

dodatečně vyloučí vodná fáze, kterou oddělíme a poté butanolický extrakt odpaříme za sníženého tlaku do sucha. Získaný surový daunomycin se pak vhodným způsobem rekrystaluje (například ze směsného rozpouštědla metanol : etanol : HCl : chloroform v poměru 3,5 : 60 : 70. Výtěžek: 91 % daunomycinu hydrochloridu vztaženo na obsah daunomycinu v nativní půdě, b. t. 175 až 176 °C.

Příklad 2

Izolače daunomycinu

V 1 000 ml fermentační půdy se po ukončení fermentace upraví koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou pH na hodnotu 1,5 a 30 minut se intenzivně míchá při 20 °C. Poté se půda zfiltruje na křemelinovém filtru a mycelium na filtru se promývá okyselenou vodou (HCl, pH 2) do filtrátu do doby, kdy filtrát teče bezbarvý. Ve filtrátu se rozpustí chlorid měďnatý v takovém množství, aby roztok obsahoval mírný nadbytek ekvivalentu mědi pro tvorbu komplexu se stechiometrií Cu/daunomycin = 1:1 a upraví pH na 6,5. Vysrážený Cu-komplex daunomycinu se dále zpracovává jako v příkladu 1, příp. 3.

Příklad 3

Izolače daunomycinu

Postup izolace je stejný podle příkladu 1 do stadia získání vlhkého kovového komplexu daunomycinu, jehož zpracování je následující: vlhký komplex se na křemelinovém filtru odvodní promytím n-butano-lem, poté se komplex rozpustí v n-butanolu, ve kterém byl předem rozpuštěn mírný nadbytek kyseliny šťavelové k vyvázání kovu použitého pro srážení komplexu. Vyloučený šťavelan je odfiltrován a butanolický filtrát je zpracován stejným postupem jako butanolický extrakt v příkladě 1 (úprava pH, filtrace na křemelině, oddělení vodné fáze, odpaření, rekrystalizace).

Výtěžek: 90 až 92 % daunomycinu hydrochloridu, b. t. 175 až 176 °C.

Příklad 4

Izolače daunomycinonu

V 1 000 ml fermentační půdy se rozpustí mírný nadbytek ekvivalentu mědi (ve formě chloridu měďnatého) pro tvorbu komplexu se stechiometrií měď/daunomycin = 1:1 až 2 (navážka se řídí počtem stanovených jednotek účinné látky) a přidavkem koncentrovaného čpavku se upraví pH na hodnotu 6,5 a po krátkém promíchání se prázdňá půda odfiltruje na křemelinovém

filtru; mycelium s vysráženým komplexem se na filtru promyje destilovanou vodou. Poté se filtrační koláč rozmíchá v minimálním množství destilované vody a za míchání se upraví koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou pH na hodnotu 1,3. Suspense se na vodní lázni vyhřeje na 85 °C; za míchání při této teplotě probíhá kyselá hydrolyza (odštěpení daunosaminu) 45 minut. Poté se suspense zchladí na 5 až 10 °C a nechá při této teplotě stát 1 hodinu. Po odfiltrování mycelia s vysráženým daunomycinonem se na křemelinovém filtru filtrační koláč extrahuje mícháním s 300 ml acetonu, vyextrahované mycelium se odfiltruje a promyje acetonem do filtrátu tak, aby filtrát tek l bezbarvý. Ve filtrátu se rozpustí mírný nadbytek ekvivalentního množství kyseliny šťavelové pro vyvázání kovu a po 20 minutách míchání se vyloučený šťavelan měďnatý odfiltruje. Filtrát obsahující daunomycinon se odpaří ve vakuové odparce do sucha. Získá se surový daunomycinon s 95% výtěžkem (vztaženo na stanovené množství jednotek účinné látky v nativní půdě), b. t. 215 °C. Rekrystalizace získaného daunomycinonu byla prováděna z ledové kyseliny octové.

Příklad 5

Izolace adriamycinu

Podle příkladu 1 byl z fermentační půdy izolován adriamycin. Postup izolace je shodný do stadia získání vodné fáze po extrakci butylacetátem. Vodnou fází extrahujeme dvakrát stejným množstvím chloroformu. Chloroformový extrakt je sušen síranem sodným a po té odpařen za sníženého tlaku do sucha. Získaný surový adriamycin je rekrystalován ze směsi rozpouštědel metanol : etanol . HCl : chloroform. Výtěžek: 90 % adriamycinu hydrochloridu vztaženo na obsah adriamycinu v půdě, t. t. 205 až 208 °C.

Příklad 6

Izolace adriamycinu

Po syntéze adriamycinu z daunomycinu byl adriamycin z reakční směsi izolován ve formě nerozpustného měďnatého komplexu přidáním ekvivalentního množství síranu měďnatého a úpravou pH na hodnotu 6,5. Zpracování komplexu probíhá podle bodu 1 a 5.

Příklad 7

Izolace daunomycinu

Podle postupu v příkladě 1 bylo použito ke vzniku kovového komplexu daunomycinu síranu měďnatého se stejným výtěžkem daunomycinu jako v příkladě 1.

Příklad 8

Izolace daunomycinu

Podle postupu v příkladě 1 bylo použito

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob izolace antracyklinů se skeletem 7,8,9,10-tetrahydro-6,11-dihydroxy-5,12-naftacencchinonovým, zejména daunomycinu nebo adriamycinu, jejich aglykonů nebo jiných derivátů připravených syntézou nebo fermentací, vyznačující se tím, že se k surovému roztoku účinné látky po syntéze přidá ekvivalentní množství soli dvojmocného přechodového kovu dostatečně rozpustné v daném prostředí, po té se upraví pH roztoku na hodnotu 4 až 9, po odstranění matečného kapalného média se vzniklý omezeně rozpustný kovový komplex rozpouští a/nebo suspenduje ve stejném rozpouštědle použitým při syntéze nebo rozpouštědle použitým pro další krok syntézy, vzniklý roztok se případně za míchání okyselí kyselinou šťavelovou na hodnotu pH 1 až 4, načež se vyloučený šťavelan příslušného kovu oddělí a získaný filtrát účinné látky se zpracovává o sobě známým způsobem nebo se do surového matečného roztoku účinné látky po fermentaci přímo přidá ekvivalentní množství soli dvojmocného přechodového kovu dostatečně rozpustné v daném prostředí, po té se upraví pH roztoku na hodnotu 4 až 9, po odstranění kapalného matečného média se vzniklý omezeně rozpustný kovový komplex společně s myceliem suspenduje ve vodě nebo rozpouštědle použitým pro další krok izolace, vzniklá suspenze se za míchání okyselí na hodnotu pH 1 až 4, načež se oddělí mycelium a ve filtrátu se zásadou upraví pH na hodnotu 4 až 9, vzniklý omezeně rozpustný kovový komplex se oddělí a/nebo suspenduje ve stejném rozpouštědle, získaný roztok se případně za míchání okyselí kyselinou šťavelovou na hodnotu pH 1 až 4, po té se vyloučený šťavelan příslušného kovu oddělí a zís-

ke vzniku kovového komplexu daunomycinu síranu zinečnatého se stejným výtěžkem daunomycinu jako v příkladě 1.

kaný filtrát účinné látky se zpracovává o sobě známým způsobem, přičemž se v případě izolace daunomycinu první extrakce provádí vždy butylacetátem.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se do surového roztoku účinné látky přidá ekvivalent měďnatých iontů, výhodně ve formě chloridu nebo síranu měďnatého za vzniku kovového komplexu se stechiometrií kov/účinná látka = 1:1 až 2.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se po přidání odpovídajícího množství soli příslušného kovu upraví pH roztoku na hodnotu 6,5.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že vzniklá suspenze mycelia a kovového omezeně rozpustného komplexu se okyselí kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu pH 1,3 až 1,5.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se po odstranění matečného kapalného média, vzniklý roztok nebo suspenze kovového komplexu okyselí za míchání kyselinou šťavelovou na hodnotu pH 1,5.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se po odstranění matečného kapalného média včetně mycelia, vzniklý roztok nebo suspenze kovového komplexu okyselí za míchání minerální kyselinou na hodnotu pH 1,5 a vzniklý roztok se saturuje sirovoříkem.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se po odstranění matečného kapalného média včetně mycelia, vzniklý roztok nebo suspenze kovového komplexu okyselí za míchání kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 1,5 a vzniklý roztok se extrahuje butylacetátem.