



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 312403

(13) B1

(51) Int Cl⁷ B 01 D 15/08, C 07 D 305/14

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19953617	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	1995.09.13	søknadsnummer	1994.03.18, PCT/FR94/00300
(24) Løpedag	1994.03.18	(85) Videreføringsdag	1995.09.13
(41) Alm. tilgj.	1995.09.13	(30) Prioritet	1993.03.22, FR, 9303251
(45) Meddelt dato	2002.05.06		

(71) Patenthaver	Aventis Pharma SA, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony, FR
(72) Oppfinner	André Durand, Sainte-Geneviève-des-Bois, FR Alain Gerbaud, Athis-Mons, FR Rodolphe Margraff, Viry-Châtillon, FR
(74) Fullmektig	Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse Fremgangsmåte for rensing av taxoïder

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

En fremgangsmåte for rensing av taxoïder (Taxotère, 10-desacetyl baccatin III), ved sentrifugefordelingskromatografi.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for rensing av taxoïder ved sentrifuge-fordelingskromatografi.

5 Mer spesielt angår oppfinnelsen en fremgangsmåte for rensing av Taxotère® (4-acetoxyl-2 α -benzoyloxy-5 β ,20-epoxy-1 β ,7 β -10 β -trihydroxy-9-oxo-tax-11-en-13 α -yl-(2R,3S)-3-tert-butoxykarbonylamino-2-hydroxy-3-fenylpropionat) og 10-desacetyl-baccatin III.

10 10-desacetyl-baccatin III som er ekstrahert fra blader av barlind benyttes ved fremstilling av Taxotère® under de betingelser som for eksempel er beskrevet i EP 0 253 738 eller EP 0 336 841 eller i den internasjonale søknad PCT WO 92/09589.

15 10-desacetyl-baccatin III, oppnådd ved ekstrahering av blader fra bladlind inneholder, som en funksjon av det området hvorfra den stammer, urenheter som i det vesentlige er forbindelser som stammer taxoïdfamilien som for eksempel 2 α -benzoyloksy-4-acetoksy-5 β ,20-epoksy-1 β ,7 β ,10 β ,13 α ,19penta-
20 hydroksy-9-okso-11-taksen, 2 α -benzyloksy-4-acetoksy-5 β ,20-epoksy-1 β ,7 α ,10 β ,13 α -tetrahydroksy-11-taxen eller taxiner.

25 Taxotère® som oppnås ved hemisyntese fra 10-desacetyl-baccatin III inneholder som urenheter i det vesentlige forestringsprodukter av urenheter inneholdt i 10-desacetyl-baccatin III samt andre urenheter som for eksempel stammer fra epimerisering av karbonatomer i 2'-posisjon i sidekjeden.

30 10-desacetyl-baccatin III og Taxotère® per se kan generelt renses ved metoder som væskechromatografi på kolonner og mere spesielt ved HPLC på silisiumdioksydkolonner. Selv om disse metoder er spesielt egnet for rensing av noen titalls gram er imidlertid den industrielle ekstra polering begrenset av ting
35 som for eksempel de forbrukte mengder oppløsningsmidler, samt manipulering og destruering av silisiumdioksydbæreren som er forurenset av toksiske estere, noe som er uomgjengelig.

Når det gjelder taxoïder som utgjør produkter hvis toksisitet hyppig er meget høy og hvis ømfintlighet er stor, er det særlig viktig å ha til disposisjon rengjøringsmetoder som gir en god produktivitet, som ikke nødvendiggjør en fast bærer som er kostbar i anskaffelse, bruk og destruering, som muliggjør små mengder oppløsningsmidler og som er lett automatiserbare for å tillate kontinuelig produksjon.

Det er nu funnet, og det er gjenstand for foreliggende oppfinnelse, at rensing av taxoïder og mere spesielt rensingen av Taxotère® og 10-desacetyl-baccatin III, kan gjennomføres ved å gjennomføre en sentrifugefordelingskromatografi, CPC, eller en motstrømskromatografi med høy hastighet, der prinsippet for eksempel er beskrevet av A.Foucault og P. Rosset i "Analsis", 16 (3), 157-167 (1988).

Sentrifugefordelingskromatografi tillater å gjennomføre fordeling av bestanddelene i blandingen som skal separeres mellom to ikke-blandbare flytende faser ved suksessive likevekter som oppnås på logisk og automatisk måte.

Denne metode karakteriseres ved en meget effektiv fordelingsmekanisme, en høy retensjon av den stasjonære fase og en høy hastighet for den mobile fase, noe som fører til utmerket separering i løpet av noen timer.

Sentrifugefordelingskromatografi nødvendiggjør anvendelsen av to eller flere oppløsningsmidler som gir to partielt blandbare faser. Selv om det foreligger et stort antall oppløsningsmidler som oppviser dette karakteristikum er det særlig viktig, på industriell basis, å anvende industrielle oppløsningsmidler som ikke er klorerte og som ikke er giftige. Blant de oppløsningsmidler som kan benyttes industrielt med liten risiko er alkoholer som metanol, etere som metyl-t.butyletere, estere som etylacetat, ketoner som

metylisobutylketon og alifatiske hydrokarboner som heptan eller iso-oktan.

5 For gjennomføring av en effektiv rensing er det nødvendig å velge en blanding av oppløsningsmidler hvis hurtige og fullstendige separering fører til to faser for hvilke fordelingskoeffisienten ligger mellom 0,1 og 10 og fortrinnsvis mellom 0,5 og 5 og aller helst nær 1.

10 Et produkt for hvilken fordelingskoeffisienten K for eksempel er lik 10, er 10 ganger mere oppløselig i den øvre fase enn i den nedre fase. Som et resultat blir den meget hurtig eluert hvis den øvre fase er mobil, og i løpet av meget lang tid og med dårlig resultat, hvis det er den nedre fase som er mobil.
15 Når imidlertid K ligger nær 1 er oppløseligheten praktisk talt identisk i de to faser og to elueringsmetoder kan benyttes og eventuelt kombineres for å oppnå et maksimalt resultat.

20 Foreliggende oppfinnelse har til hensikt å forbedre den kjente teknikk og angår i henhold til dette en fremgangsmåte for rensing av 10-desacetyl-baccatin III og 4-acetoxy-2 α -bensoyloxy-5 β ,20-epoxy-1 β ,7 β -10 β -trihydroxy-9-oxo-tax-11-en-13 α -yl-(2R,3S)-3-tert-butoxykarbonylamino-2-hydroxy-3-fenylpropionat (Taxotère®) med sentrifugefordelingskromatografi mellom to delvis blandbare faser bestående av vann og ikke-klorerte og ikke-toksiske oppløsningsmidler valgt blant alkoholer, etere, estere, ketoner og alifatiske hydrokarboner, og oppfinnelsen karakteriseres ved at man, for å rense
30 10-desacetyl-baccatin III, benytter en blanding av et alifatisk hydrokarbon, en ester, en alkohol og vann ved fordelingskoeffisient mellom de to faser ligger mellom 0,1 og 10, eller en blanding av alifatiske ketoner og vann hvis fordelingskoeffisient mellom de to faser ligger mellom 0,1 og
35 10, og for å rense Taxotère®, benytter en blanding av et alifatisk hydrokarbon, en ester, en alkohol og vann hvis

fordelingskoeffisient mellom de to faser ligger mellom 0,1 og 10.

I dette spesielle tilfellet der man arbeider med 10-desacetyl-baccatin III er det spesielt hensiktsmessig å arbeide med en blanding av et alifatisk hydrokarbon, en ester, en alkohol og vann, fortrinnsvis slik at forholdet heptan:etylacetat:metanol:vann er 1:2:1:2 på volumbasis, og aller helst arbeider man med blandinger av alifatiske ketoner og vann slik at forholdet for blandingen metylisobutylketon:aceton:-vann er 2:3:2.

Videre er det nødvendig at retensjonen i den stasjonære fase, det er den volumdel av den totale apparatur som opptas av den stasjonære fase i likevekt, idet mengden av den mobile fase er fast, er så høy som mulig og minst lik 50 %.

For videre å forbedre produktiviteten er det spesielt interessant å kunne arbeide med høy mengde, noe som er begrenset av det maksimale trykk som kan legges på rotoren.

Når det spesielt gjelder Taxotère® er det fordelaktig å benytte en blanding av alifatisk hydrokarbon, en ester, en alkohol og vann slik at systemet heptan:etylacetat:metanol:-vann foreligger i volumforholdet 2:4:3:2, en blanding som har en retensjon på 80 % og en fordelingskoeffisient nær 0,5 og som gir en meget snever topp som hurtig elueres og derved fører til en meget sterk forbedring av produktiviteten.

Sentrifugefordelingskromatografi kan gjennomføres i en hvilken som helst kommersiell apparatur som er tilpasset dette formål, for eksempel de som er beskrevet av Yoichiro Ito ["CRC Crit. Rev. Anal. Chem.", 17, 65 (1986)] eller som markedsføres av SANKI Engineering Limited å Kyoto i Japan.

De følgende eksempler skal illustrere oppfinnelsen uten å begrense den.

Eksempel 1 - Rensing av Taxotère®

Taxotère® (eller 4-acetoksy-2 α -benzoyloksy-5 β ,20-epoksy-1 α ,7 β ,10 β -trihydroksy-9-okso-tax-11-en-13 α -yl-(2R,3S)-3-t.butoksykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroksy-propionat) oppnås ved behandling med sink i nærvær av eddiksyre av 4-acetoksy-2 α -benzoyloksy-5 β ,20-epoksy-1 β -hydroksy-7 β ,10 β -bis(triklor-2,2,2-etoksykarbonyloksy)-9-okso-tax-11-en-13 α -yl-(2R,3S)-3-t.butoksykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroksy-propionat under de betingelser som er beskrevet i EP 0 336 841.

Man oppløser 10 g 4-acetoksy 2 α -benzoyloksy-5 β ,20-epoksy-1 β -hydroksy-7 β ,10 β -bis-(triklor-2,2,2-etoksykarbonyloksy)-9-okso tax-11-en-13 α -yl-(2R,3S)-3-t.butoksykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroksy-propionat i 150 cm³ metyl-t.butyleter og tilsetter derefter 10 g sink. Etter fordamping til tørr tilstand oppnås et grått pulver som anbringes i en reaktor.

Man omrører og tilsetter så i løpet av 5 minutter en blanding av 6 cm³ eddiksyre og 50 cm³ acetonitril. Man oppvarmer utvendig med et vannbad som holder 45°C, i 1 time. Etter avkjøling i et isbad innføres 850 cm³ metyl-t.butyleter under sterk omrøring og derefter avfiltreres sinksalter og sink i overskudd på frittet glass med porøsitet 4.

Filtratet konsentreres til tørr tilstand. Man oppnår på denne måte 12 g av en marengmasse som umiddelbart tas opp i 20 cm³ etylacetat, 15 cm³ metanol, 10 cm³ heptan og 10 cm³ vann.

Sentrifugefordelingskromatografien gjennomføres på en SANKI LLI-07-apparatur. Sentrifugen mates med to stempelputer utstyrt med ventilanordninger som begrenser trykket til 55 bar. En pumpe tjener til transport til det ene eller andre av de to faser ved hjelp av en omstillingsventil, den andre pumpe er reservert for injeksjon.

Efter fylling av apparaturen med stasjonær fase under langsom rotasjon (200 omdr./min) og høy mengde (110 cm³/min.), gjennomføres injeksjonen umiddelbart.

5 Man injiserer de to faser idet man begynner med den vandige fase og eluerer, i en mengde av 60 cm³/min., med den vandige fase av systemet hexan:etylacetat:metanol:vann 2:4:3:2 på volumbasis. Man gjenvinner 1,9 liter stasjonær fase, det vil si en retensjon på 71 %, og gjenvinner så fraksjoner på 15
10 cm³. Fraksjonene 72 til 110 samles og konsentreres til et volum på 140 cm³. Det dannede precipitat separeres ved filtrering. Man oppnår på denne måte, i et utbytte på 80,5 %, 5,2 g Taxotère®.trihydrat med en renhet på 99,7 % ved intern normalisering.

15

Eksempel 2 - Rensing av Taxotère®

Man arbeider som i eksempel 1 men går ut fra 82 g 4-acetoksy-2 α -benzoyloksy-5 β ,20-epoksy-1 β -hydroksy-7 β ,10 β -bis-(triklor-
20 2,2,2-etoksykarbonyl)-9-okso-tax-11-en-13 α -yl-(2R,3S)-3-t.butoksykarbonylamino-3-fenyl-2-hydroksy-(2R,3S)-propionat, 82 g sink og 150 cm³ av en blanding av 49,2 cm³ eddiksyre og 328 cm³ acetonitril og man oppnår 115 g råprodukt som i teorien inneholder 49,69 g Taxotère® og 53 g Taxotère®.-
25 trihydrat.

Man tar opp råproduktet i 450 cm³ metyl-t.butyleter og vasker det så 3 ganger med tilsammen 450 cm³ vann inneholdende 15 g natriumklorid. De forenede vandige faser ekstraheres med 2 x
30 200 cm³ t.butyleter. De tre eterekstrakter forenes og konsentreres til tørr tilstand. Man oppnår på denne måte 72 g av en marengmasse som tas opp i 120 cm³ metanol.

Til den oppnådde gule oppløsning setter man efter hverandre
35 160 cm³ etylacetat, 180 cm³ vann og 80 cm³ heptan.

Man oppnår på denne måte to klare flytende faser med et totalt volum på 460 cm³ og der det øvre sjikt ikke utgjør mer enn ca. 1/4 av det totale volum istedet for 35 % i fravær av Taxotère®.

5

Apparaturen som anvendes ved denne sentrifugefordelingskromatografi fylles med den organiske fase i en mengde av 110 cm³/min. med en omdreiningshastighet på 200 omdr./min. Når apparaturen er full bringes rotasjonshastigheten til 800 omdr./min. Man injiserer den vandige fase og efter injeksjon av den organiske fase skyller man med 200 cm³ organisk fase og eluerer så, i en mengde av 60 cm³/min., med den vandige fase.

10

Man gjenvinner 2,5 liter stasjonær fase i overskudd, det vil si en retensjon på 67,7 %.

15

Efter passasje av 200 cm³ mobil vandig fase gjenvinnes 360 fraksjoner på 12 til 13 cm³. Fraksjonene 25 til 110 gir, efter konsentrering til et volum på 200 cm³, og i et utbytte på 87,7 %, et presipitat på 46,5 Taxotère®.trihydrat hvis renhet er 99,1 %.

20

Eksempel 3 - Rensing av 10-desacetyl-baccatin III.

25

Man gjennomfører sentrifugefordelingskromatografien på en SANKI HPCPC-kromatograf serie 1000 med et totalt volum på 245 cm³.

30

Rotoren som dreies med 100 omdr./min. fylles på fallende måte med samtidig pumping av den organiske fase i en mengde på 6 cm³/min. og den vandige fase i en mengde av 3 cm³/min. av blandingen metylisobutylketon:aceton:vann i volumforholdet 2:3:2.

35

Omdreiningshastigheten bringes så til 1200 omdr./min. før man sprøyter inn 1,5 g krystallisert, uren 10-desacetyl-baccatin

III inneholdende 83,3 % 10-desacetyl-baccatin III og 3,4 % 10-desacetyl-19-hydroksy-baccatin III.

Man eluerer derefter på fallende måte med den vandige fase i en mengde av 3 cm³/min. og gjenvinner fraksjoner på 6 cm³ hvert annet minutt.

10-desacetyl-19-hydroksy-baccatin III inneholdes i fraksjonene 39 til 52.

Fra den 61 fraksjon inverteres elueringsretningen og man benytter nå den organiske fase som mobilfase på stigende måte i en mengde av 5 cm³/min. og gjenvinner fraksjoner på 10 cm³ hvert annet minutt.

Fraksjonene 70 til 84 som inneholder 10-desacetyl-baccatin III konsentreres under redusert trykk. Etter omkrystallisering fra 15 cm³ acetonitril oppnås 1,25 g 10-desacetyl-baccatin III som er solvatisert med acetonitril (1 mol/mol) i form av hvite krystaller hvis renhet, bestemt ved HPLC med intern normalisering, er 98 %.

Det korrigerte utbyttet er 91,2 %.

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for rensing av 10-desacetyl-baccatin III og 4-acetoxy-2 α -bensoyloxy-5 β ,20-epoxy-1 β ,7 β -10 β -trihydroxy-9-oxo-tax-11-en-13 α -yl-(2R,3S)-3-tert-butoxykarbonylamino-2-hydroxy-3-fenylpropionat (Taxotère®) med sentrifugefordelingskromatografi mellom to delvis blandbare faser bestående av vann og ikke-klorerte og ikke-toksiske oppløsningsmidler
10 valgt blant alkoholer, etere, estere, ketoner og alifatiske hydrokarboner, k a r a k t e r i s e r t v e d at man, for å rense 10-desacetyl-baccatin III, benytter en blanding av et alifatisk hydrokarbon, en ester, en alkohol og vann ved fordelingskoeffisient mellom de to faser ligger mellom 0,1 og
15 10, eller en blanding av alifatiske ketoner og vann hvis fordelingskoeffisient mellom de to faser ligger mellom 0,1 og 10, og for å rense Taxotère®, benytter en blanding av et alifatisk hydrokarbon, en ester, en alkohol og vann hvis fordelingskoeffisient mellom de to faser ligger mellom 0,1 og
20 10.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fordelingskoeffisienten mellom de to faser ligger
25 mellom 0,5 og 5.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fordelingskoeffisienten mellom de to faser ligger
30 nær 1.

4.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at man, for å separere
35 10-desacetyl-baccatin III, anvender en blanding av heptan, etylacetat, metanol og vann.

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t
v e d at man benytter heptan:etylacetat:metanol:vann i
volumforholdet 1:2:1:2.

6.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at man benytter en
blanding av metylisobutylketon, aceton og vann.

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t
v e d at man benytter metylisobutylketon:acetol:vann i
volumforholdet 2:3:2.

8.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at man for å rense 4-
acetoxy-2 α -bensoyloxy-5 β ,20-epoxy-1 β ,7 β -10 β -trihydroxy-9-
oxo-tax-11-en-13 α -yl-(2R,3S)-3-tert-butoxykarbonylamino-2-
hydroxy-3-fenylpropionat (Taxotère®), benytter en blanding av
heptan, etylacetat, metanol og vann.

9.

Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t
v e d at man benytter heptan:etylacetat:metanol:vann i
volumforholdet 2:4:3:2.