



(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

213 606 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 92 03119

(22) A bejelentés napja: 1992. 09. 30.

(30) Elsőbbségi adatok:

07/773 056 1991. 10. 08. US

(51) Int. Cl.⁶

C 07 H 17/08

(40) A közzététel napja: 1993. 04. 28.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1997. 08. 28.

(72) Feltaláló:

Favreau, Denis, St. Hubert, Québec (CA)

(73) Szabadalmaz:

Bristol-Myers Squibb Co., New York, New York
(US)

(74) Képvisező:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Eljárás kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás kristályos etopozid-4'-foszfát dietanolát előállítására, melynek során

– etanol és amorf etopozid-4'-foszfát elegyét visszafolytatás közben forralják,

– a nyert terméket víz vagy metanol hozzáadásával oldatba viszik,

– a kapott oldatot szűrik és a szűrletet keverés közben lehűtik, és

– a kristályos dietanolátot elválasztják.

A találmány szerinti vegyület gyógyszerészetben rák-ellenes szerként alkalmazható, és előnyös adagolási és stabilitási tulajdonságokkal rendelkezik.

A találmány tárgya kristályos etopozid-4'-foszfát dietanol szolvát előállítására.

Az etopozid rákellenes hatóanyag, amelyet az Amerikai Egyesült Államokban kissejtű tüdőrák és nehezen gyógyítható heretumor kezelésére engedélyeztek. Mivel az etopozid csak kissé oldható vízben, valamely szerves oldószer vagy szerves oldószerkeverék szükséges az etopozid-oldat előállításához. A jelenleg kereskedelemben forgalmazott, parenterális adagolásra alkalmas etopozid-készítmény több oldószerből álló oldószerrendszert tartalmaz.

Az (I) általános képletű etopozid-4'-foszfátot és a (II) általános képletű nátriumsóját a 4,904,768 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírták, mint az etopozid képzésére alkalmas prodrogot, és kimutatták, hogy in vivo tumorelles tesztvizsgálatban az etopozidhoz hasonló aktivitást mutat.

Míg az etopozid vízben való oldhatósága körülbelül 0,1 mg/ml, az etopozid-4'-foszfát és ennek dinátriumsója nagyobb egyenlő 100 mg/ml vízben való oldhatósággal rendelkezik, és ebből eredően lehetővé teszi gyógyszerészeti készítmény előállítását, amely csak kis mennyiségű szerves oldószert tartalmaz, vagy egyáltalán nem tartalmaz szerves oldószert. A korábbiakban az etopozid-4'-foszfátot és dinátriumsóját pelyhes, amorf anyagként írták le, amely nehezen kezelhető, és állás közben hajlamos bomlásra. Ennélfogva a jelen találmány egyik célja, hogy olyan etopozid-4'-foszfát formát állítsunk elő, amely előnyösebben alkalmazható gyógyszerészeti célokra, mint a korábbi formák. A találmány tárgya olyan új, kristályos etopozid-4'-foszfát etanol szolvát előállítására, amely könnyebben kezelhető, és az ismert etopozid-4'-foszfát formákkal összehasonlítva nem várt, nagy stabilitással rendelkezik.

A találmány tárgya eljárás stabil, kristályos etopozid-4'-foszfát dietanol szolvát előállítására amely a (III) képletű vegyület, és a továbbiakban etopozid-4'-foszfát dietanolát névvel jelöljük.

A találmány szerinti eljárás során az etopozid-4'-foszfát etanol-tartalmú oldószer-rendszerben készült, telített oldatát állítjuk elő.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra az etopozid-4'-foszfát dietanolát röntgen-diffrakciós poranalízist mutatja.

A 2. ábra az etopozid-4'-foszfát dietanolát H-MR-spektrumát (D₂O, 200 MHz) mutatja.

Etopozid-4'-foszfát-dietanolát előállítása

Kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolátot állíthatunk elő úgy, hogy az etopozid-4'-foszfát etanollal készült, telített oldatát képezzük, majd hagyjuk a kristályokat kiválni, és a kristályokat elválasztjuk. A kiindulási anyag etopozid-4'-foszfátot a 4,904,768 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírt eljárásnak megfelelően állíthatjuk elő, amelynek során az etopozidot difenil-klór-foszfáttal reagáltatjuk, és a kapott terméket katalitikusan hidrogénezünk. Az ezzel az eljárással nyert termék amorf anyag, amelyet kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolattá alakíthatunk át, a jelen találmánynak megfelelően.

Az etopozid-4'-foszfát telített etanolos oldatát úgy állíthatjuk elő, hogy az etopozid-4'-foszfátot, az etanolt és egy koszolvenst elegyítjük; ahol a koszolvens lehet víz vagy metanol. Amennyiben szükséges, az elegyet melegíthetjük, abból a célból, hogy teljes oldódást biztosítsunk. Amennyiben az oldatot a kristályosodáshoz szükséges hőmérsékleten állni hagyjuk, kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát képződik. A hőmérséklet nem kritikus befolyású, és lehet például körülbelül 0 °C – körülbelül 65 °C közötti, de előnyösen a kristályosítást szobahőmérsékleten, azaz körülbelül 15 °C – körülbelül 25 °C közötti hőmérsékleten hajtjuk végre. A kívánt termék kristályosodása általában lassú folyamat, és jellemzően az oldatot körülbelül 18 – körülbelül 72 órán át keverjük, mielőtt a kristályokat elválasztjuk. Kívánt esetben az oldatot beolthatjuk kis mennyiségű, korábban képzett etopozid-4'-foszfát-dietanolát kristállyal. A kristályokat szokásos eljárásokkal választhatjuk el, amely lehet például szűrés, és a kristályos anyagot száraz etanollal mossuk, majd megszáritjuk. Így etopozid-4'-foszfát-dietanolát szintelen, kristályos, szilárd anyagot kapunk. A szárítást előnyösen vákuumban, 20–25 °C közötti hőmérsékleten végezzük.

Egy jellemző eljárásban az etopozid-4'-foszfátot száraz etanollal, előnyösen körülbelül 1 g etopozid-4'-foszfátot körülbelül 15 ml etanollal elegyítjük, majd az elegyet visszafolyatás melletti forráshőmérsékletre melegítjük. Ehhez a keverékhez megfelelő mennyiségű vizet adagolunk, hogy a teljes oldódást biztosítsuk; ez a vízmennyiség körülbelül 0,3 ml – körülbelül 0,6 ml, 1 g etopozid-4'-foszfát anyagra számítva. Az oldatot forrón leszűrjük, amennyiben szükséges, hogy a nem oldódott szennyeződések eltávolítsuk, majd a szűrletet hagyjuk keverés közben szobahőmérsékletre, azaz körülbelül 15–25 °C hőmérsékletre lehűlni. A szűrletet ezt követően a kristály képződéséhez szükséges hőmérsékleten tartjuk, mindaddig, ameddig megfelelő mennyiségű kristálykiválás történik. A kristályosodás megtörténhet ugyan körülbelül 55–65 °C hőmérsékleten is, előnyösen az oldatot kristályosítás céljából szobahőmérsékleten tartjuk. Ennek megfelelően az oldatot körülbelül 18–72 órán át keverjük, majd a képződött kristályokat szűréssel eltávolítjuk, a kristályos anyagot száraz etanollal mossuk, és megszáritjuk. A kívánt terméket szintelen, kristályos, szilárd anyagként kapjuk. A fenti eljárást az alábbi példákban részletesen bemutatjuk.

1 példa

Etopozid-4'-foszfát-dietanolát előállítása etopozid-4'-foszfátból kiindulva

18,0 g amorf etopozid-foszfáthoz 270 ml száraz etanolt adunk. Az elegyet visszafolyatás mellett forráshőmérsékletre melegítjük, majd annyi ionmentes vizet adunk hozzá, amely a teljes oldódást biztosítja (5–10 ml víz szükséges). Ezt követően az oldószert forrón leszűrjük, majd hagyjuk körülbelül 20 °C hőmérsékletre hűlni, és 18 órán át keverjük. A terméket szűréssel elválasztjuk, a szűrt, kristályos anyagot kétszer 20 ml száraz etanollal mossuk, majd vákuumban, 20 °C hőmérsékleten 18 órán át szárítjuk. Szintelen, kristályos, szilárd

etopozid-foszfát-dietanolátot nyerünk, 15,4 g (91%-os hozam).

Más eljárás szerint kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolátot állíthatunk elő úgy, hogy a 4,904,768 számú amerikai szabadalmi leírásban leírt etopozid-4'-foszfát előállítás eljárását egy utolsó kristályosítási lépéssel egészítjük ki. A kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát etopozidból kiinduló általános előállítási eljárását az alábbiakban ismertetjük. Az etopozid-4'-foszfátot a 4,904,768 számú amerikai szabadalmi leírásban leírt, módosított eljárással állítjuk elő.

2. példa

Etopozid-4'-foszfát-dietanolát előállítása etopozidból kiindulva

A) Etopozid-4'-dibenzil-foszfát előállítása

446,5 g (1,70 mol, 2 ekvivalens) dibenzil-foszfát 3,5 l diklór-metánban készült, kevert oldatához 20 °C hőmérsékleten egy részletben 227,5 g (1,70 mol, 2 ekvivalens) N-klór-szukcinimidet adagolunk. A reakcióelegyet 3 órán át 30 °C hőmérsékleten keverjük, majd 0 °C hőmérsékletre hűtjük, és 12–72 órán át ezen a hőmérsékleten tartjuk, majd leszűrjük. Az így előállított dibenzil-klór-foszfát-oldat (62,5%; 1,25 ekvivalens) egy részét 1–1,5 óra időtartam alatt 500 g (0,85 mol) etopozid 10,5 g (0,086 mol, 0,1 ekvivalens) 4-(dimetil-amino)-piridin és 311,5 ml (1,75 mol, 2,1 ekvivalens) N,N-diizopropil-etil-amin 5 l száraz acetonnitrilben készült oldatához adagoljuk inert gáz atmoszférában, –15 – –20 °C hőmérsékleten. A reakcióelegyet 20 percen át –15 – –20 °C hőmérsékleten keverjük, és kis mennyiségű (0,1–0,25 ekvivalens) dibenzil-klór-foszfát adagokat adunk hozzá mindaddig, amíg nyomású folyadék-kromatográfiás analízis (HPLC) szerint az etopozid legalább 98%-a átalakult.

A reakcióelegyhez ezt követően 5 l (0,5 mol) KH_2PO_4 oldatot adunk, és az elegyet hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni. A szerves fázist elválasztjuk, és kétszer 2 l 10%-os nátrium-klorid-oldattal mossuk. Azután a szerves oldatot nátrium-szulfáton megszáritjuk, és az oldószert vákuumban elpárologtatjuk. A nyers, szilárd anyagot szilikagélén, 20% etil-acetát/diklór-metán, 40% etil-acetát/diklór-metán, végül etil-acetát eluens alkalmazásával, kromatográfia segítségével tisztítjuk. A kívánt terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük, és vákuumban 2 l térfogatra bepároljuk. Az oldatot erős keverés közben lassan 5 l heptánhoz adjuk, majd az elegyet 20 °C hőmérsékleten 1–3 órán át keverjük. Ezt követően az elegyet leszűrjük, és a csapadékot 40 °C hőmérsékleten 18 órán át vákuumban szárítjuk. 505 g (70% termelés) cím szerinti vegyületet nyerünk.

B) Kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát előállítása

500 g (0,59 mol) etopozid-4'-dibenzil-foszfát 2 l metanolban készült oldatát adagoljuk 50 g 10%-os aktív szénre felvitt palládium (Pd/C) katalizátor 1 l metanolban készült szuszpenziójához, majd a szuszpenziót körülbelül 37 °C hőmérsékletre melegítjük. Az elegyhez lassan 555 g (660 ml, 5,89 mol, 10 ekvivalens) 1-metil-

-1,4-ciklohexadién 1 l metanolban készült oldatát adagoljuk, majd a szuszpenziót 40–45 °C hőmérsékleten keverjük, amíg a reakció vékonyréteg-kromatográfiás analízis szerint befejeződik. A reakcióelegyet ezután leszűrjük, és a szűrlet térfogatát bepárlással vagy további metanol hozzáadásával 1 l térfogatra állítjuk be. A kapott oldatot ezután 4 l száraz etanolhoz adagoljuk. Az oldatot etopozid-4'-foszfát standard kristállyal beoltjuk, majd körülbelül 2,5 l térfogatra bepároljuk. A kapott oldathoz 3,5 l száraz etanolt adunk, majd a szuszpenziót körülbelül 20 °C hőmérsékleten, 18–72 órán át keverjük. A szilárd anyagot leszűrjük, kétszer 250 ml száraz etanollal mossuk, majd vákuumban 18 órán át körülbelül 20 °C hőmérsékleten szárítjuk. 300–350 g cím szerinti vegyületet kapunk (80–90% termelés).

A kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát fizikai-kémiai tulajdonságai

Olvadáspont: 141–150 °C (oldószeresztés); 160–172 °C (olvadás).
Etanolmaradék: 11,8% (NMR-spektrum szerint) 13,2% (termogravimetriás analízis szerint)
A $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{O}_{16}\text{P}$. $2\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ képletre számítva 12,1%.
Nedvességtartalom: 0,22, Karl Fischer eljárása szerint.
NMR-spektrum: a 2. ábra szerinti.

Az 1. ábrán bemutatott röntgendiffrakciós por-analízist Philips APD 3720 modell készüléken por-diffrakciós rendszerrel mértük, amely függőleges szögmérővel $\theta/2\theta$ geometria ellátott. A röntgensugár-generátor (Philips XRG 3100 modell) 45 kV és 40 mA értékkel működött, és sugárforrásként réz K alfa 1,544056 Å vonalat alkalmaz. Valamennyi mintát 2 és 32 2 θ fok között mértünk, a lépések mérete 0,04 2 θ fok, és a haladási sebesség 0,04 2 θ fok/másodperc. Az adatgyűjtésre és analízisre Philips APD 4,00 változat programot alkalmaztunk.

Stabilitás-vizsgálatok

A) Alkalmazott anyagok

a/ A fent leírtak szerint előállított kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát

b/ Kristályos etopozid-4'-foszfát (nem szolvatált), amelyet az alábbi eljárás szerint állítunk elő.

300 mg etopozid-4'-foszfát 175 ml etanolban készült oldatát keverés közben 70 °C hőmérsékletre melegítjük, és így átlátszó oldatot nyerünk. Az oldatot leszűrjük, és a szűrletet 70 °C hőmérsékletre melegítjük, amíg térfogata körülbelül 34 ml értékre csökken. Az oldat egy részletét (körülbelül 17 ml-t) ampullába helyezzük, és beoltjuk kis mennyiségű tús, kristályos, korábban előállított etopozid-4'-foszfát anyaggal. Az oldatot –12 °C hőmérsékletre hűtőgéphe helyezzük 4 napon át, majd a kapott tús, kristályos anyagot pelyhes anyaggént elválasztjuk. Az anyag NMR-spektrum analízise azt mutatja, hogy etanol-tartalma körülbelül 1,6 tömeg/tömeg%.

c/ Amorf dinátrium-etopozid-4'-foszfát, amelyet a 4,904,768 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírt eljárással állítunk elő.

d/ Amorf etopozid-4'-foszfátot nyerünk úgy, hogy 125 mg kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolátot oldunk 50 ml metanolban, majd az oldószert szárazra pároljuk rotációs bepárló alkalmazásával, és a kapott maradékot vákuumban 25 °C hőmérsékleten 1 órán át szárítjuk.

B) Eljárás

Pontosan lemért tesztvizsgálat-anyagmintákat I típusú kvarcüveg ampullákba helyezünk, majd az ampullákat teflonnal bevont dugóval és alumínium zárral lezárjuk. Az ampullákat 50 °C hőmérsékleten tároljuk.

A minták hatásosságát, illetve hatóanyag-tartalmát 2, 4 és 8 hét múlva nagynyomású folyadék-kromatográfia segítségével (HPLC) meghatározzuk. Kontroll-anyagként 4 °C hőmérsékleten szárítóedényben tárolt anyagokat alkalmazunk (feltételezett hatóanyag-tartalom: 100%).

C) Nagynyomású folyadék-kromatográfias analízis körülményei (HPLC)

Oszlop : Jones Apex oktadecil, 5 mikron, 150×4,6 mm.

Áramlási sebesség : 1 ml/perc,

Mozgó fázis, A : 0,02 mol ammónium-foszfát (egybazisos), Milli-Q víz anyagban (pH = körülbelül 4,5) : acetonitril (85 : 15).

Mozgó fázis, B : acetonitril,

Gradiens: 0–3 perc izokratikus 0% B;
3–18 perc – lineáris gradiens 0–30% B;
18–23 perc – izokratikus 30% B;
23–25 perc – lineáris gradiens 30–0% B;
25–30 perc – újra egyensúlyba hozó 100% A (azaz 0% B).

Hullámhossz: 235 nm.

Minta-koncentráció : 0,1 mg/ml.

Minta-hígítóanyag: A mozgó fázis.

Injektált térfogat: 20 µl.

Retenciósidők: etopozid-4'-foszfát – 5,4 perc;
lignan P – 11,5 perc;
etopozid – 17,5 perc.

Az etopozid-4'-foszfát csúcsterület lineárisan függ a 0,05–0,20 mg/ml koncentrációtól (korrelációs koefficiens = 0,9999).

D) Eredmények

A fent leírt stabilitás-tesztvizsgálat eredményeit az alábbi táblázatban adjuk meg, ahol az „EP” jelentése etopozid-4'-foszfát.

Tesztvizsgálati anyag	Százalék maradó EP		
	2 hét	4 hét	8 hét
Kristályos EP 2EtOH			
1. tesztvizsgálat	100	98,4	97,5
2. tesztvizsgálat	100	100	99,3
Kristályos EP	93,3	87,9	85,1
Amorf EP	65,8	54,1	46,1
Amorf EP 2Na	85,5	69,3	61,6

10 Az 50 °C hőmérsékleten végzett stabilitás-tesztvizsgálat azt mutatja, hogy a kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát igen kis hatóanyag-veszteséget szenved 8 hetes időtartam alatt; ugyanakkor világosan mutatja, hogy a kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát stabilitása sokkal jobb, mint az etopozid-4'-foszfát egyéb formáké.

15 A találmány szerinti kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát anyag közvetlenül felhasználható gyógyszerkészítmények előállításában. Például gyógyszerkészítménnyé alakítható inert, gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagokkal, mint például laktózzal; mannitollal, dextránnal, vagy ilyen, hasonló töltőanyagokkal; a pH-beállítása nátrium-citráttal történik. Az így nyert szilárd keverék ezután ampullákba tölthető, és injektálható oldattá alakítható felhasználás előtt úgy, hogy szokásosan alkalmazott, fiziológiásan elfogadható hígítóanyaggal, mint például dextróz-oldattal vagy normál fiziológiás sóoldattal oldattá alakítjuk. A szilárd keverék továbbá alkalmazható zselatinkapszulák töltésére, amelyek orális adagolásra használhatók etopozid-4'-foszfát esetében.

30 Más eljárás szerint a kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát alkalmazhatjuk liofilizált etopozid-4'-foszfát készítmények előállítására. Ennek során a kristályos 4-etopozid-4'-foszfát-dietanolátot injektálásra alkalmas vízben oldjuk, majd az oldat pH-értékét körülbelül 4 – körülbelül 5 értékre állítjuk be úgy, hogy gyógyszerészetileg elfogadható bázist, mint például nátrium-hidroxidot vagy nátrium-citrátot adagolunk hozzá; kívánt esetben az oldat más gyógyszerészeti hordozóanyagokat, mint például töltőanyagokat, például laktózt vagy dextránt is tartalmazhat. 1 ml oldatot üvegampullába helyezünk, majd liofilizáljuk, A liofilizált anyagot fiziológiailag elfogadható hígítóanyaggal felhasználás előtt újra oldattá alakíthatjuk.

45 Megjegyzendő, hogy a kristályos etopozid-4'-foszfát-dietanolát gyógyszerkészítményként vagy tömeghatóanyag formájában egyaránt alacsony relatív nedvességtartalmú környezetben tárolandó, amely előnyösen kisebb mint körülbelül 33% relatív nedvességtartalom, és legelőnyösebben valamely szárítószer jelenlétében tároljuk, vagy levegőtől elzárt tartóban tároljuk, hogy elkerüljük a nedvességgel való túlzott érintkezést.

50 A találmány szerinti leírás és nem korlátozó példák a találmány tárgyát mutatják, és alkalmasak arra, hogy a szakember ezt teljes mértékben alkalmazza. Bármely módosítást és változtatást a találmány szerinti leírásban könnyen végrehajthat a szakember anélkül, hogy a találmány tárgyát lényegében befolyásolná.

SZABADALMI IGÉNYPONT

Eljárás kristályos etopozid-4'-foszfát dietanolát előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

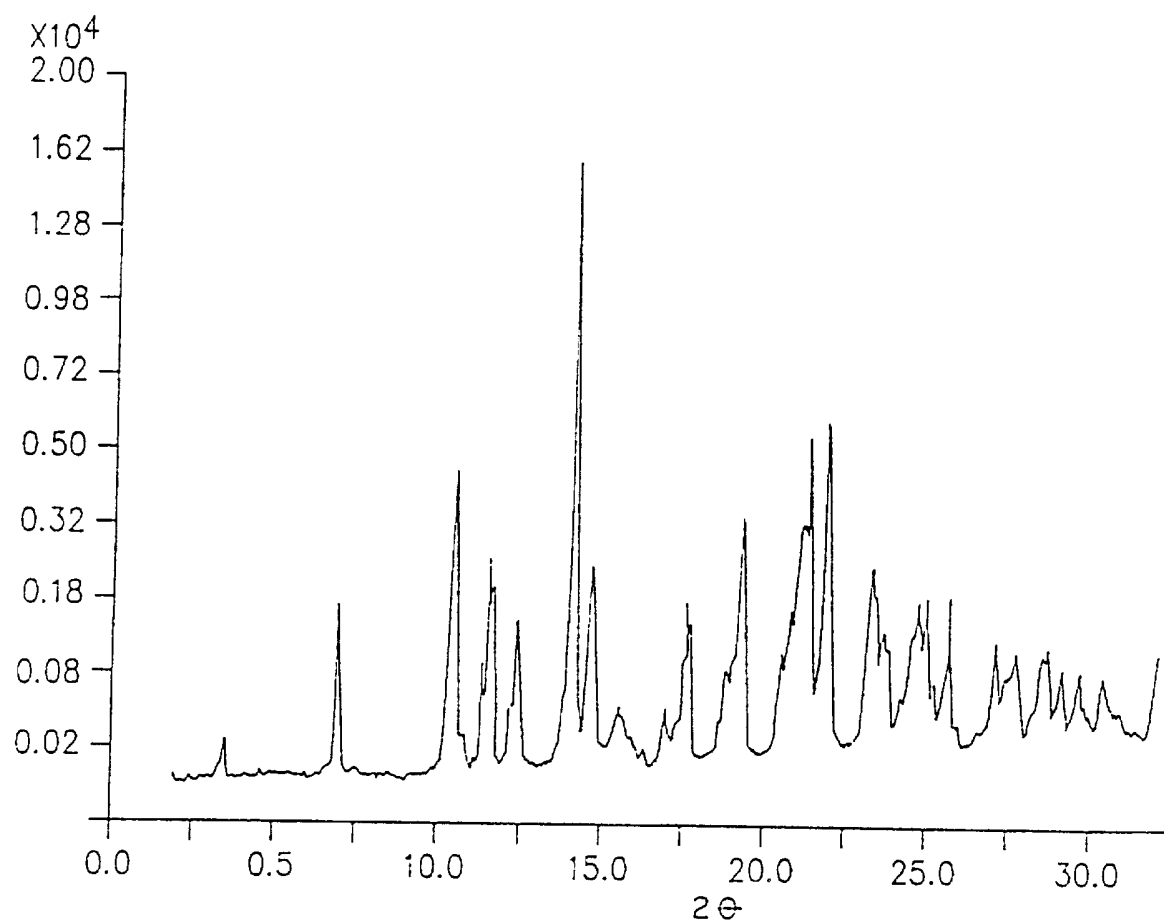
etanol és amorf etopozid-4'-foszfát elegyét visszafolyatás közben forraljuk,

a nyert terméket víz vagy metanol hozzáadásával oldatba visszük,

a kapott oldatot szűrjük és a szűrletet keverés közben lehűtjük, és

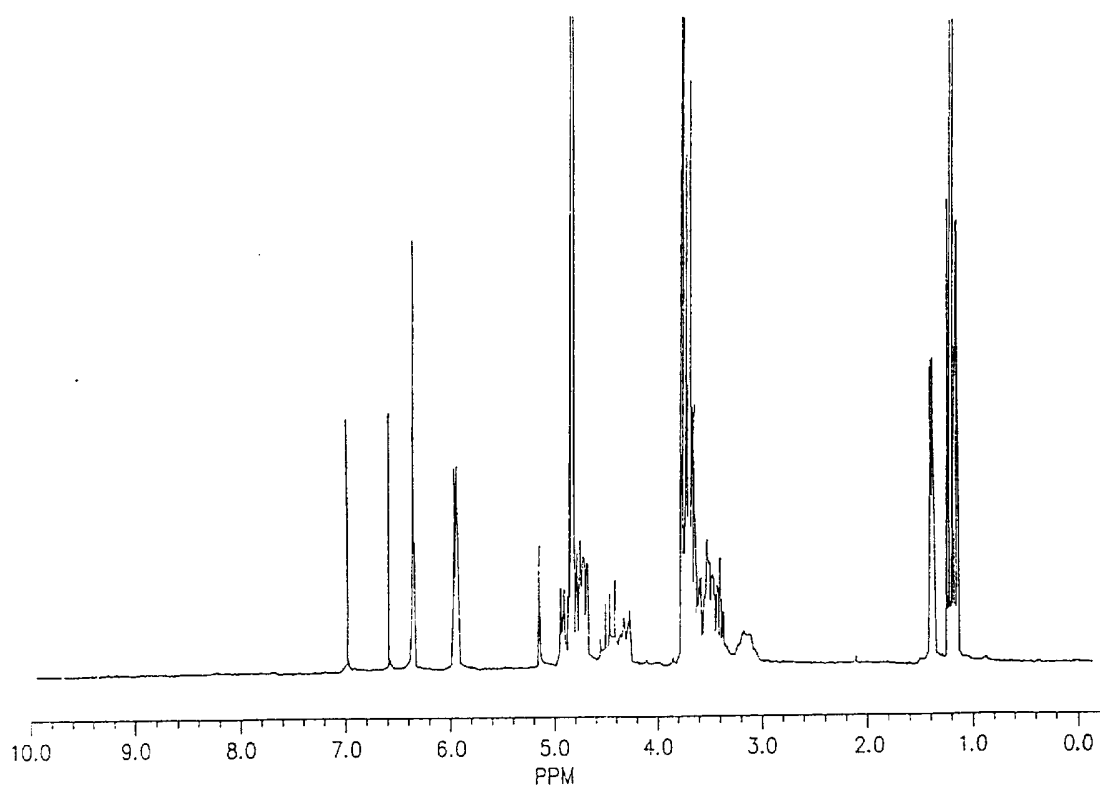
5 a kristályos dietanolátot elválasztjuk.

HU 213 606 B
Int. Cl.⁶: C 07 H 17/08

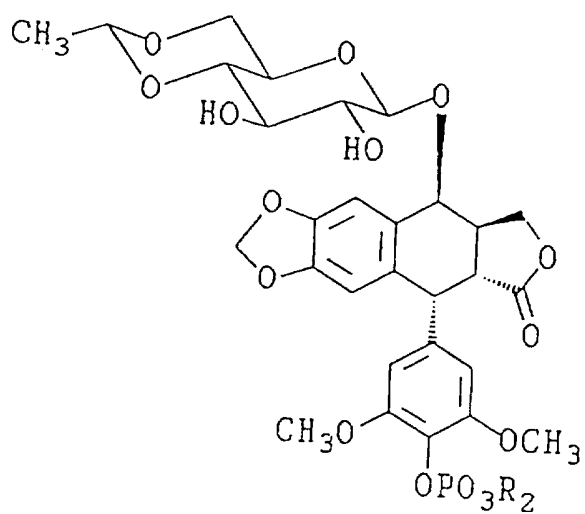


1. ábra

HU 213 606 B
Int. Cl.⁶: C 07 H 17/08

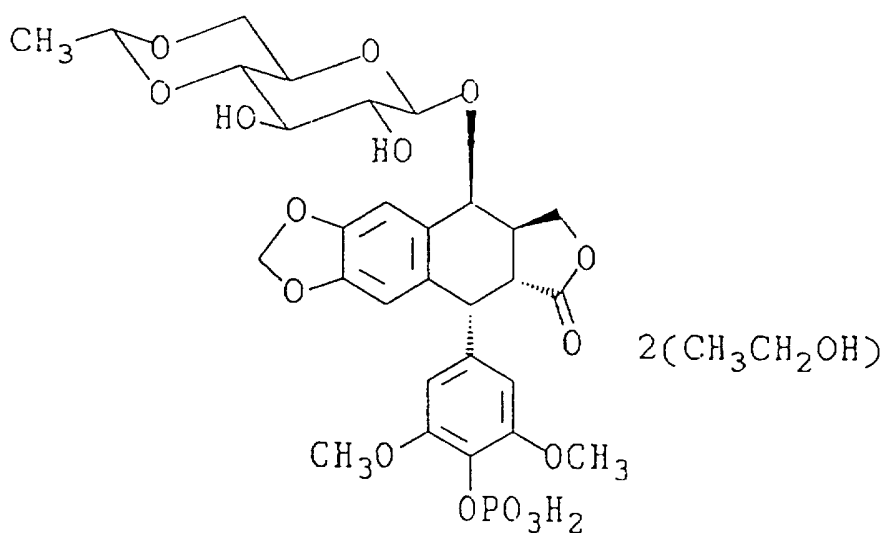


2. ábra



I : R = H

II : R = Na



(III)

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Gyurcsenő Philipp Clarisse osztályvezető
Állami Nyomda Rt. ☎ 260-0451 Fax: 260-3632
E-mail: allami.nyomda@lang.hu – Internet: <http://www.lang.hu/allami.nyomda>