



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8304327**

Nederland

⑲ NL

-
- ⑤4 **Werkwijze voor het zuiveren van anthracyclon-glycosiden door een selectieve absorptie aan harsen.**
- ⑤1 Int.Cl³.: C07H 15/24.
- ⑦1 Aanvrager: Farmitalia Carlo Erba S.p.A. te Milaan, Italië.
- ⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octroobureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8304327.
- ②2 Ingediend 15 december 1983.
- ③2 Voorrang vanaf 23 december 1982.
- ③3 Land van voorrang: Italië (IT).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 2493982 .
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 16 juli 1984.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

VO 5303

Werkwijze voor het zuiveren van anthracyclon-glycosiden door een selectieve absorptie aan harsen.

De uitvinding betreft een werkwijze voor het zuiveren van anthracyclon-glycosiden door een selectieve adsorptie aan harsen.

Er bestaat behoefte aan een zeer specifieke methode voor het verkrijgen van dit soort glycosiden in een zuivere vorm, omdat zowel
5 bij de fermentatie als bij de synthetische bereiding vrij grote hoeveelheden organische en anorganische onzuiverheden in het produkt optreden met een gemiddelde van 12 tot 25 %.

De tot dusver gebruikte conventionele methoden, waarbij het ruwe produkt met gechloreerde oplosmiddelen werd geëxtraheerd en ver-
10 volgens met buffers werd gewassen, leiden tot een eindprodukt, waarvan het percentage onzuiverheden weliswaar sterk is verminderd, maar nog altijd ligt in een traject tussen 4,5 en 5,0 %.

Hoewel dit cijfer vaak aanvaardbaar wordt geacht, moet gezien de specifieke gevoeligheid voor bepaalde handelingen en chemische
15 stoffen van het glycoside-molecuul toch naar een verbeterde zuiveringsmethode worden gestreefd die het mogelijk maakt een nagenoeg zuiver produkt te verkrijgen. Gezien het specifieke gebruik van anthracyclon-glycosiden in de klinische praktijk als anti-tumor middelen en de neven-
20 problemen betreffende dosering en giftigheid is een optimale eliminering van onzuiverheden, die gewoonlijk zeer giftig zijn, van groot belang te achten.

De uitvinding, die het mogelijk maakt een eindprodukt te verkrijgen met een onzuiverheidsgehalte van maximaal 2 %, is in essentie gebaseerd op een werkwijze waarbij het ruwe produkt een adsorptie-be-
25 handeling ondergaat op diverse typen harsen en wel in een zuur milieu (pH = 3 - 5) gevolgd door een eluering met water of mengsels van water met een polair oplosmiddel. Meer in het bijzonder betreft de uitvinding een eerste fase, waarbij een zwak zure waterfase met de in water opgeloste stof op de hars in de vorm van deeltjes als korrels of bol-
30 letjes wordt geadsorbeerd, en een volgende trap waarbij de geadsorbeerde stof weer wordt gedesorbeerd.

De adsorberende hars kan aanwezig zijn in een passende houder of vat, dat over het algemeen de vorm heeft van een toren of een kolom, die op passende wijze gevuld is met harsdeeltjes. Afhankelijk van het
35 type onzuiverheden in het ruwe produkt kan het eluaat verkregen door

8304327

desorptie van de hars, desgewenst opnieuw op een hars van een ander type worden geadsorbeerd, waarvan het volgens een bekende methode weer kan worden geëluëerd.

5 Bij de onderhavige chromatografische zuiverings-methode werd gebruik gemaakt van adsorberende harsen van het polymere-en ionen-
uitwisselende type of van het carboxymethylcellulose type: een juiste selectie, een passende volgorde in het gebruik van de diverse typen harsen naar gelang van het te zuiveren ruwe produkt, en het zwakzure milieu tijdens de adsorptie maken het mogelijk een bijzonder zuiver
10 eindprodukt te verkrijgen, waardoor kan worden afgezien van het gebruik van gechlorideerde organische oplosmiddelen en toch een voortreffelijke opbrengst na zuivering kan worden verkregen.

De volgende voorbeelden lichten de uitvinding nader toe.

Voorbeeld I.

15 Zuivering van 4-demethoxy-daunorubicine.

15,0 gram 4-demethoxy-daunorubicine in ruwe vorm met een titer van 70,2 % en een gehalte aan onzuiverheden van 18 % werd opgelost in 3,6 liter van een oplossing van 0,5 % natriumacetaat. Deze oplossing werd met azijnzuur op pH 4,7 gebracht en geadsorbeerd op 400 cm³
20 Amberlite XAD2 (Rohm en Haas) in een kolom met een diameter van 2,5 cm. Het produkt werd gewassen met 1000 cm³ water en vervolgens geëluëerd met een mengsel van water/methanol (5 : 1 volumina). Als een eerste eluaat werd 2000 cm³ oplossing met agluconen en diverse onzuiverheden opgevangen.

25 Bij verder elueren met een mengsel van water/methanol (1 : 1) werd een fractie van 4500 cm³ opgevangen: dit eluaat bevatte in oplossing het 4-demethoxy-daunorubicine tezamen met 10 % onzuiverheden.

Dit eluaat werd met zoutzuur op pH 2,8 gebracht en vervolgens in vacuo geconcentreerd tot een volume van 1500 cm³. Door een toevoeging
30 van natriumacetaat aan de geconcentreerde oplossing, werd de pH op 4,0 gebracht en deze zwakzure oplossing geadsorbeerd op 150 cm³ CM Sepharose C1 6B (Pharmacia) in een kolom met een diameter van 2,5 cm waarbij een stroomsnelheid van 150 cm³/uur werd aangehouden. Nadat alles was geadsorbeerd, werd de kolom eerst uitgewassen met 450 cm³ water en daarna
35 geëluëerd met 0,03 % zoutzuur.

De eerste 800 cm³ eluaat met 18 % onzuiverheden werden door een toevoeging van natriumacetaat op pH 4,7 gebracht en gerecirculeerd naar

8304327

de oplossing van het ruwe 4-demethoxy-daunorubicine, bestemd voor adsorptie op de Amberlite XAD2 harsen voor de eerste zuiveringstrap.

Het volgende eluaat (3500 cm³) met zuiver 4-demethoxy-daunorubicine werd in een vacuum geconcentreerd tot een volume van 50 cm³,
5 waarna 250 cm³ aceton werd toegevoegd, het verkregen neerslag afgefiltreerd, met aceton gewassen en gedroogd. Met een opbrengst van 52 %, berekend op het ruwe uitgangsprodukt, werd een 4-demethoxy-daunorubicine verkregen met een titer van 97 % en een gehalte aan onzuiverheden van minder dan 3 %.

Voorbeeld II.

10 Zuivering van daunorubicine.

15 15,0 gram gechlloreerde daunorubicine met een titer van 74,2 % en een gehalte aan onzuiverheden van 8,5 % werd opgelost in 4500 cm³ water. Deze oplossing werd met natriumacetaat op pH 5,0 gebracht en ge-adsorbeerd aan 400 cm³ S112 Kastell hars of op Amberlite ER180 van Rohm en Haas, en wel in een kolom met een diameter van 2,5 cm en bij een stroomsnelheid van 600 cm³/uur.

Het produkt werd hierna gewassen met 1000 cm³ van een oplossing van 1 % natriumchloride en daarna geëluëerd met een mengsel van water/ethanol (1 : 1).

20 De kopfractie van 400 cm³ met de agluconen in oplossing werd verwijderd daarna verder geëluëerd en 260 cm³ eluaat met zuiver daunorubicine opgevangen. De pH werd op 2,5 ingesteld door een toevoeging van verdund zoutzuur, aceton toegevoegd en men liet het produkt kristalliseren gedurende 6 uren bij een temperatuur van +5°C. Dit produkt werd afgefiltreerd, met aceton gewassen en 12 uren in vacuo gedroogd.

25 Met een opbrengst van 80 %, berekend op onzuiver uitgangsmateriaal werd een daunorubicine verkregen met de volgende eigenschappen, bepaald via HPLC: titer 97 %, gehalte aan onzuiverheden 2,6 %.

Voorbeeld III.

Zuivering van 4-demethoxy-doxorubicine.

30 2000 cm³ van een waterige oplossing met daarin 10,4 gram 4-demethoxy-doxorubicine met een gehalte aan onzuiverheden van 14 % werd ge-adsorbeerd op 50 cm³ ER180 van Rohm en Haas in een kolom met een diameter van 2,5 cm bij een stroomsnelheid van 250 cm³/uur.

35 Het eluaat, gedeeltelijk gezuiverd door een selectieve adsorptie van de onzuiverheden, werd vervolgens geadsorbeerd op 200 cm³ CM Sepha-

8304327

rose C1 6B van Pharmacia. Het produkt werd vervolgens geëlueerd met een mengsel van methanol en water (1 : 1) met daarin 0,015 % geconcentreerd zoutzuur, waarbij de kopfractie van circa 800 cm³ met de agluconen en andere onzuiverheden werd weggeworpen. Vervolgens werd 2000 cm³ eluaat opgevangen dat de zuivere stof bevatte, en dit in vacuo geconcentreerd tot 60 cm³. Onder 3 uur roeren werd 300 cm³ aceton toegevoegd, het opgetreden neerslag afgefiltreerd, met aceton gewassen en gedroogd. In een opbrengst van 58,2 % van de theoretische werd 6,5 gram zuiver 4-demethoxy-doxorubicine verkregen met een gehalte aan onzuiverheden van 3 %.

Voorbeeld IV.

Zuivering van 4'-desoxy-doxorubicine.

15,0 gram 4'-desoxy-doxorubicine met een titer van 69,2 % en een gehalte aan organische onzuiverheden van 12 % alsmede een gehalte aan anorganische zouten van eveneens 12 % werd opgelost in 2000 cm³ water en geadsorbeerd op 300 cm³ CM Sephadex C25 en wel met een stroomsnelheid van 600 cm³/uur. Nadat alles was geadsorbeerd werd geëlueerd met 0,03 % zoutzuur en een fractie van 6500 cm³ met daarin 4'-desoxy-doxorubicine verkregen.

20 Dit eluaat werd op pH 3,8 gebracht door toevoeging van een oplossing van natronloog, geadsorbeerd op 200 cm³ S112 Kastel hars met een stroomsnelheid van 400 cm³/uur en deze hars gewassen met 600 cm³ water waarna werd geëlueerd met methanol aangezuurd op pH 2,0 met zoutzuur.

600 cm³ kerneluaat werd aldus verkregen, dat in vacuo werd geconcentreerd tot 60 cm³. Onder roeren werd deze oplossing langzaam uitgegoten in 600 cm³ aceton en het daarbij gevormde neerslag afgefiltreerd, met aceton gewassen en gedroogd.

In een opbrengst van 61 % van de theoretische werd 4'-desoxy-doxorubicine verkregen met een titer van 95,8 % en een gehalte aan onzuiverheden van 4,2 %.

Voorbeeld V.

Zuivering van 4'-epi-doxorubicine.

15,0 gram onzuiver 4'-epi-doxorubicine met een titer van 75,9 % en een onzuiverheidsgehalte van 15 %, werd opgelost in 4000 cm³ water.

35 Deze oplossing werd met natriumformiaat op pH 4,8 gebracht en deze oplossing geadsorbeerd op 400 cm³ Amberlite IRC 724 in een kolom met een diameter van 2,5 cm en bij een stroomsnelheid van 1600 cm³/uur.

8304327

De kolom werd uitgewassen met 800 cm³ water en vervolgens geelueerd met een mengsel van 95 dln methanol op 5 dln water en 0,015 dln geconcentreerd zoutzuur. 4000 cm³ van een kerneluaat werd opgevangen met daarin 4'-epi-doxorubicine dat nog altijd 10 % onzuiverheden bevatte, alsmede 1500 cm³ van een sloteluaat, dat in hoofdzaak onzuiverheden bevatte.

Het kerneluaat werd geconcentreerd tot 1500 cm³, met natriumformiaat op pH 4,8 gebracht en geadsorbeerd op 250 cm³ carboxymethylcellulose in een kolom met een diameter van 2,5 cm bij een stroomsnelheid van 500 cm³/uur. Nadat alles was geadsorbeerd, werd de kolom gewassen met een mengsel van 99,3 % ethanol, 0,7 % water en 0,015 % geconcentreerd zoutzuur, waarna geelueerd werd met een mengsel van 90 % ethanol, 10 % water en 0,05 % geconcentreerd zoutzuur, waarbij 3200 cm³ van een kerneluaat werd opgevangen.

Dit eluaat werd in vacuo geconcentreerd tot 60 cm³ en het produkt neergeslagen door een toevoeging van 300 cm³ aceton.

Aldus werd 6,9 gram 4'-epi-doxorubicine verkregen met een titer van 91,2 % en een gehalte aan onzuiverheden van 3 %; De opbrengst bedroeg 55,3 %.

20 Voorbeeld VI.

Zuivering van doxorubicine.

(a) 70 gram doxorubicine werd opgelost in 28 liter water. De pH werd met een buffer op 3,7 - 4,5 gebracht en deze oplossing geadsorbeerd op 2 liter S112 Kastell hars in een kolom met een diameter van 6 cm. Het produkt werd geelueerd met een mengsel van 35 liter water en 15 liter methanol.

40 liter eluaat werd in vacuum geconcentreerd tot 0,5 liter en het produkt gekristalliseerd door een toevoeging van een mengsel van 1 liter ethanol en 4,5 liter aceton waarbij 3 uren bij +5°C werd geroerd.

Het produkt werd afgefiltreerd, gewassen met 0,0 liter aceton en in vacuum gedurende 5 uren bij +40°C gedroogd.

Verkregen werd aldus 56,0 gram halfgezuiverd doxorubicine (I)

(b) 80,0 gram halfgezuiverd doxorubicine (I), verkregen volgens (a) werd opgelost in 24 liter water en met een buffer op pH 4,0 gebracht.

Deze oplossing werd geadsorbeerd op een kolom met een diameter van 12 cm en met daarin 1,6 liter carboxymethylcellulose van Wathman.

8304327

Het effluent van de kolom werd verwijderd; vervolgens werd de kolom gewassen met 3,2 liter water en pas hierna het produkt geëluëerd met 55 liter water met pH 2,5, aangezuurd door een toevoeging van zoutzuur.

5 46 liter eluaat werd opgevangen en in vacuum geconcentreerd tot een volume van 0,6 liter waarna men het produkt liet kristalliseren door een voorzichtige toevoeging van een mengsel van isopropanol en aceton (1 : 3).

10 Het gevormde produkt werd afgefiltreerd, met 1 liter aceton gewassen en 4 uren bij +40°C gedroogd. Aldus werd 65 gram doxorubicine verkregen met een titer van 98,5 % en een gehalte aan onzuiverheden van 1,5 %.

8304327

C O N C L U S I E S:

1. Werkwijze voor het zuiveren van anthracyclon-glycosiden, met het kenmerk, dat de zuivering wordt uitgevoerd door een selectieve adsorptie op harsen van een waterige oplossing van het onzuivere produkt.
- 5 2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de oplossing met het ruwe, te zuiveren produkt op een pH van 3 tot 5 wordt gebracht, alvorens dit op de hars wordt geadsorbeerd.
3. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de voor de adsorptie gebruikte harsen zijn gekozen uit de polymere- en de inonen-
10 uitwisselende adsorptieharsen enerzijds en carboxymethylcellulose anderzijds.
4. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de adsorptie op de hars van de oplossing van het te zuiveren ruwe produkt kan worden uitgevoerd door slechts een type hars te gebruiken of, afhankelijk van
15 de aard van de onzuiverheden, verschillende typen hars, in het laatste geval in een passende volgorde.
5. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de gezuiverde verbinding na adsorptie weer van de hars wordt gedesorbeerd.
6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat de desorptie
20 van de gezuiverde verbinding van de hars wordt uitgevoerd door elueren met zwakzuur reagerend water of een mengsel van water met een polair oplosmiddel.
7. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de zuivering door een selectieve adsorptie op harsen zowel wordt gebruikt voor anthracyclon-glycosiden die verkregen zijn door een fermentatie als
25 voor verbindingen die synthetisch zijn bereid.

8304327