

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 538 394

②1 N° d'enregistrement national :

83 20378

⑤1 Int Cl³ : C 07 H 15/24; B 01 D 15/08.

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 20 décembre 1983.

③0 Priorité IT, 23 décembre 1982, n° 24939 A/82.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 26 du 29 juin 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : Société dite : FARMITALIA CARLO
ERBA SPA. — IT.

⑦2 Inventeur(s) : Ernesto Oppici, Carlo Varesio et Onorino
Giacoma Rosa.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Boettcher.

⑤4 Procédé pour la purification de glycosides anthracycloniques par adsorption sélective sur des résines.

⑤7 Procédé pour la purification de glycosides anthracycloni-
ques par adsorption sélective sur des résines.

Ce procédé consiste à purifier les glycosides par adsorption
sélective sur des résines d'une solution aqueuse légèrement
acide de ces glycosides suivie d'une désadsorption des com-
posés purifiés par une élution à l'aide d'eau acide ou d'un
mélange d'eau et d'un solvant polaire.

L'invention a pour objet un procédé pour la purification de glycosides anthracycloniques par adsorption sélective sur des résines.

La nécessité de disposer d'une méthode
5 hautement spécifique utilisable pour l'obtention de ces glycosides sous forme substantiellement pure résulte principalement de ce que, à la fois pendant les procédés de fabrication par fermentation et les procédés de préparation synthétique, la quantité des impuretés organiques
10 et inorganiques qui sont incluses dans le produit brut est particulièrement élevée avec des valeurs moyennes allant de 12% jusqu'à 25%.

Les méthodes classiques utilisées jusqu'à
présent selon les techniques connues de purification qui
15 comportent l'extraction du produit brut à l'aide de solvants chlorés et des lavages subséquents avec des solutions tampons conduisent à un produit final dans lequel le pourcentage des impuretés, bien qu'il soit considérablement abaissé, se situe dans une gamme allant
20 de 4,5 à 5%.

Bien qu'elle soit jugée généralement acceptable, cette pureté normale a stimulé l'intérêt pour la recherche d'un procédé amélioré de purification permettant
25 d'obtenir un produit final substantiellement pur, quand on tient compte de la sensibilité particulière aux manipulations et aux agents chimiques de la molécule de glycoside. En gardant présent à l'esprit l'usage particulier des glycosides anthracycloniques dans la pratique clinique comme agents antitumoraux, et les difficultés annexes de
30 dosage et de toxicité, l'élimination optimum des impuretés, qui sont généralement fortement toxiques, est une confirmation évidente de l'utilité de l'invention.

Cette dernière, qui permet de parvenir à un produit final contenant des impuretés à un montant maximum
35 de 2%, est essentiellement basée sur un procédé qui prévoit l'adsorption du produit brut sur divers types de résines

dans un environnement acide (pH = 3-5) et une élution subséquente avec de l'eau ou des mélanges d'eau et d'un solvant polaire. Plus particulièrement, le procédé de l'invention comprend une phase dans laquelle le milieu aqueux légèrement acide contenant la substance dissoute soluble dans l'eau est adsorbé sur la résine dispersée en particules comme des granules ou des grains, et un stade ultérieur de désadsorption de la substance qui a été adsorbée pendant la première phase ou passage.

La résine adsorbante peut être contenue dans un conteneur approprié ou récipient ayant substantiellement, dans l'ensemble, l'allure d'une tour ou d'une colonne convenablement remplie de particules de résine. Selon le type des impuretés contenues dans le produit brut, l'éluat fourni par la désadsorption d'une substance à partir d'un premier type de résine peut avantageusement être adsorbé successivement sur une résine d'un type différent à partir de laquelle elle peut être éluee ensuite par une méthode connue.

Selon le présent procédé de purification chromatographique, on emploie des résines adsorbantes de type polymère et à échange d'ions ou de type carboxyméthyl-cellulose ; le choix convenable, la séquence appropriée dans l'emploi des divers types de résine en fonction du produit brut à purifier, l'environnement légèrement acide pendant l'adsorption permettent de parvenir à un haut degré de pureté du produit final, à l'élimination de l'emploi de solvants organiques chlorés et à des rendements excellents pendant la purification.

On donnera maintenant, sans intention limitative et sans exclure aucune variante, plusieurs exemples de mise en oeuvre du procédé de l'invention.

EXEMPLE 1

Purification de la 4-déméthoxy-daunorubicine

On a fait dissoudre dans 3,6 litres d'une solution à 0,5% d'acétate de sodium 15 g de 4-déméthoxy-

-daunorubicine à l'état brut, ayant un titre de 70,2% et une teneur en impuretés de 18%. La solution a été portée au pH 4,7 par addition d'acide acétique puis adsorbée sur 400 ml de résine Amberlite XAD2^(R) (Rohm et Haas) dans une
5 colonne ayant un diamètre de 2,5 cm. Le produit a été lavé avec 1000 ml d'eau puis élué avec un mélange eau-méthanol (5:1 v/v). Comme premier éluat, on a recueilli 2000 ml d'une solution contenant les aglycones et diverses impuretés.

10 L'éluat a été poursuivie avec un mélange eau-méthanol (1:1 v/v) et on a recueilli une fraction de 4500 ml ; dans la solution, l'éluat contenait la 4-déméthoxy-daunorubicine avec 10% d'impuretés.

L'éluat a été porté au pH 2,8 par addition
15 d'acide chlorhydrique puis concentré sous vide à un volume de 1500 ml. Par addition d'acétate de sodium à cette solution concentrée, le pH a été porté à 4 et la solution légèrement acide a été adsorbée sur 150 ml de résine CM Sepharose C1 6B^(R) (Pharmacia) contenue dans une
20 colonne ayant un diamètre de 2,5 cm, à un débit de 150 ml/h. Après adsorption complète, la colonne a été d'abord lavée à l'aide de 450 ml d'eau puis éluée à l'aide de 0,03% d'acide chlorhydrique.

Le premier éluat de 800 ml, contenant 18%
25 d'impuretés, a été porté au pH 4,7 par addition d'acétate de sodium puis recueilli pour recyclage avec la solution de 4-déméthoxy-daunorubicine brute qui doit être adsorbée sur la résine Amberlite XAD2 pour le premier stade de purification.

30 L'éluat suivant (3500 ml) contenant la 4-déméthoxy-daunorubicine pure, a été concentré sous vide à un volume de 50 ml. On a ajouté 250 ml d'acétone, le précipité obtenu a été recueilli par filtrage, lavé à l'aide d'acétone et séché. On a obtenu la 4-déméthoxy-
35 -daunorubicine ayant un titre de 97% et une teneur en impuretés inférieure à 3%, avec un rendement de 52% calculé sur le produit brut de départ.

EXEMPLE 2Purification de la daunorubicine

On a fait dissoudre dans 4500 ml d'eau 15 g de daunorubicine chlorée ayant un titre de 74,2% et une teneur en impuretés de 8,5%. La solution a été mise au pH 5 par addition d'acétate de sodium et adsorbée sur 400 ml d'une résine S112^(R) Kastell ou sur une résine Amberlite ER180^(R) (Rohm et Haas) dans une colonne ayant un diamètre de 2,5 cm à un débit de 600 ml/h (1,5 b/v).

Le produit a été lavé à l'aide de 1000 ml d'une solution à 1% de chlorure de sodium puis élué avec un mélange eau-éthanol (1:1 v/v).

Les fractions de tête (400 ml) contenant les aglycones en solution ont été éliminées et l'élution a été poursuivie jusqu'à recueillir à nouveau 260 ml d'éluat contenant la daunorubicine pure. Le pH a été ajusté à 2,5 par addition d'acide chlorhydrique dilué, de l'acétone a été ajoutée et le produit a été laissé pour qu'il se cristallise à une température de +5°C pendant 6 heures.

Le produit a été recueilli par filtration, lavé à l'aide d'acétone et séché sous vide pendant 12 heures.

On a obtenu de la daunorubicine ayant les caractéristiques suivantes déterminées par chromatographie liquide à haute performance : titre 97%, teneur en impuretés 2,6% , avec un rendement de 80% calculé sur le produit brut de départ.

EXEMPLE 3Purification de la 4-déméthoxy-doxorubicine

2000 ml d'une solution aqueuse contenant 10,4 g de 4-déméthoxy-doxorubicine ayant une teneur en impuretés de 14% ont été adsorbés sur 50 ml de résine ER180^(R) (Rohm et Haas) contenus dans une colonne ayant un diamètre de 2,5 cm à un débit de 250 ml/h.

L'éluat, tel que partiellement purifié par adsorption sélective des impuretés, a été adsorbé ensuite sur 200 ml de résine CM Sepharose Cl 6B (pharmacia). Le produit a été élué avec un mélange méthanol 50, eau 50 et

acide chlorhydrique concentré 0,015, on a écarté les fractions de tête (environ 800 ml) contenant les aglycones et d'autres impuretés. On a recueilli 2000 ml de l'éluat comme contenant la substance pure et on l'a concentré sous vide jusqu'à 60 ml. En agitant pendant 3 heures, on a ajouté 300 ml d'acétone. On a filtré pour recueillir le précipité, on l'a lavé avec de l'acétone et séché. On a obtenu 6,5 g de 4-déméthoxy-doxorubicine pure ayant une teneur en impuretés de 3%, avec un rendement théorique de 58,2%.

EXEMPLE 4

Purification de la 4'-désoxy-doxorubicine

On a fait dissoudre dans 2000 ml d'eau et adsorbé sur 300 ml de résine CM Sephadex C25 à un débit de 600 ml/h 15 g de 4'-désoxy-doxorubicine ayant un titre de 69,2% avec une teneur en impuretés organiques de 12% ainsi qu'une impureté en sel minéraux de 12%. Après achèvement de l'adsorption, on a élué la solution avec de l'acide chlorhydrique à 0,03% et on a recueilli une fraction (6500 ml) considérée comme contenant la 4'-désoxy-doxorubicine.

Cet éluat a été porté au pH 3,8 par addition d'une solution d'hydrate de sodium puis adsorbé sur 200 ml de résine S112 Kastel à un débit de 400 ml/h. Le produit a été lavé à l'aide de 600 ml d'eau puis élué avec du méthanol acidifié au pH 2 au moyen d'acide chlorhydrique.

On a recueilli un noyau de 600 ml d'éluat que l'on a concentré sous vide jusqu'à 60 ml. En agitant on a versé lentement la solution concentrée dans 600 ml d'acétone. Le précipité qui s'est formé a été recueilli par filtration puis lavé avec de l'acétone et séché.

On a obtenu de la 4'-désoxy-doxorubicine ayant un titre de 95,8% et une teneur en impuretés de 4,2%, avec un rendement théorique de 61%.

EXEMPLE 5Purification de la 4'-épi-doxorubicine

On a fait dissoudre dans 4000 ml d'eau 15 g de 4'-épi-doxorubicine brute ayant un titre de 75,9% et une teneur en impuretés de 15%.

On a porté la solution au pH 4,8 par addition de formiate de sodium et on l'a fait adsorber sur 400 ml de résine Amberlite IRC 724 contenue dans une colonne ayant un diamètre de 2,5 cm à un débit de 1600 ml/h (4 b/v).

La colonne a été lavée avec 800 ml d'eau puis éluée à l'aide d'un mélange de méthanol 95, d'eau 5 et d'acide chlorhydrique concentré 0,015. On a recueilli un noyau de 4000 ml de l'éluat avec la 4'-épi-doxorubicine contenant encore 10% d'impuretés et une queue de 1500 ml de l'éluat où prédominaient les impuretés.

Le noyau de l'éluat a été concentré jusqu'à 1500 ml, porté au pH 4,8 par addition de formiate de sodium et adsorbé sur 250 ml de résine carboxyméthylcellulose^(R) Wathman contenue dans une colonne ayant un diamètre de 2,5 cm, à un débit de 500 ml/h (2 b.v.).

Après achèvement de l'adsorption, on a lavé le produit à l'aide d'un mélange d'éthanol 99,3, d'eau 0,7 et d'acide chlorhydrique concentré 0,015 et on a élué avec un mélange d'éthanol 90, d'eau 10 et d'acide chlorhydrique concentré 0,05, pour recueillir 3200 ml d'un noyau de l'éluat.

L'éluat a été concentré sous vide jusqu'à 60 ml et le produit a été précipité par addition de 300 ml d'acétone.

On a obtenu 6,9 g de 4'-épi-doxorubicine ayant un titre de 91,2% et une teneur en impuretés de 3%; rendement = 55,3%.

EXEMPLE 6Purification de la doxorubicine

(a) On a fait dissoudre 70 g de doxorubicine dans 28 litres d'eau. On a porté le pH à 3,7-4,5 par addition

d'un tampon et on a adsorbé la solution sur 2 litres de résine S112 Kastell ^(R) contenue dans une colonne ayant un diamètre de 6 cm. On a élué le produit avec un mélange de 35 litres d'eau et de 15 litres de méthanol.

5 L'éluat (40 l) a été concentré sous vide jusqu'à 0,5 litre et le produit a été cristallisé par addition d'un mélange de 1 litre d'éthanol et de 4,5 litres d'acétone, avec agitation à une température de +5°C pendant 3 heures.

10 Le produit a été recueilli par filtration, lavé avec 1 litre d'acétone et séché sous vide à +40°C pendant 5 heures.

On a obtenu 56 g de doxorubicine monopurifiée (I).

15 (b) On a fait dissoudre dans 24 litres d'eau et porté au pH 4 par addition d'un tampon 80 g de la doxorubicine monopurifiée (I) telle qu'obtenue par le procédé (a).

20 La solution a été adsorbée sur une colonne ayant un diamètre de 12 cm et contenant 1,6 litre de résine carboxyméthylcellulose Wathman.

L'effluent de la colonne a été éliminé.

25 Après lavage à l'aide de 3,2 litres d'eau, le produit a été élué avec 55 litres d'eau portée au pH 2,5 par addition d'acide chlorhydrique.

On a recueilli 46 litres d'éluat et on l'a concentré sous vide à un volume de 0,6 litre puis on a laissé le produit se cristalliser par addition précautionneuse d'un mélange isopropanol - acétone 1:3.

30 On a filtré pour recueillir le produit, on l'a lavé avec 1 litre d'acétone et on l'a séché à +40°C pendant 4 heures.

On a obtenu 65 g de doxorubicine ayant un titre de 98,5% et une teneur en impuretés de 1,5%.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la purification de glycosides anthracycloniques caractérisé en ce qu'elle est effectuée par adsorption sélective sur des résines de la solution aqueuse du produit brut.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la solution contenant le produit brut à purifier est portée à un pH allant de 3 à 5 avant l'opération d'adsorption sur la résine.
3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les résines utilisées pour l'adsorption sont choisies dans le groupe comprenant les résines adsorbantes de type polymère et échangeuses d'ions ou du type carboxyméthylcellulose.
4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'adsorption sur résine de la solution contenant le produit brut à purifier est exécutée sur un type seulement de résine ou, en fonction de la nature des impuretés, sur différents types de résine utilisés selon une séquence convenable déterminée.
5. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la substance purifiée est désadsorbée de la résine.
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la désadsorption de la substance purifiée de la résine est effectuée par élution au moyen d'eau légèrement acide ou au moyen d'un mélange d'eau et d'un solvant polaire.
7. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'on effectue la purification par adsorption sélective sur des résines à la fois pour des glycosides anthracycloniques obtenus par fermentation et pour des composés synthétiques semblables.