

363950

22 F



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C-07</u> <u>A-61</u>
SUBCLASE <u>C</u> <u>B</u>

PATENTE DE INVENCION

=====  
Ref: -m- 77362/T1.

## Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de un derivado de la halogenocolquicina".

=====

*Solicitante* E.MERCK AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente en Frankfurter Strasse 250, 61 Darmstadt, Alemania.

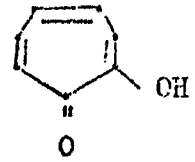
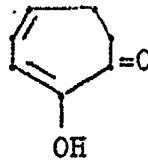
=====

- La colquicina y los derivados de la colquicina se emplean en la terapia humana ante todo como inhibidores de la mitosis. El efecto terapéutico de los compuestos como cancerostáticos se determina mediante en
5. sayos con animales en los ratones. Un criterio impor-





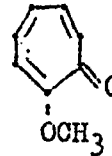
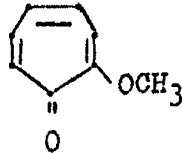
en la que  $\overline{R}$  significa



y ulterior separación del compuesto I del correspondiente compuesto isocolquicínico que asimismo se ha formado de fórmula I, en la que sin embargo está sustituido

5.

por



El compuesto I se emplea especialmente como sustancia activa en preparados farmacéuticos de actividad antimicrobiana o bien citostática, preferentemente cancerostática, especialmente antileucémica y/o contra la gota.

10.

Además se puede emplear el compuesto I también como sustancia activa para la poliploidización de plantas y como sustancia de ensayo para efectos antimicrobianos, citostáticos, mutacionales y/o poliploidizantes en la biología experimental.

15.

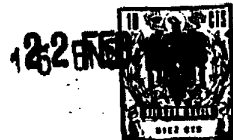
Como agente de metilización se emplea preferentemente el diazometano. La metilación se efectúa en un disolvente que no contenga ningún hidrógeno lábil. Por ejemplo se pueden emplear como disolventes el éter, dioxano, tetrahidrofurano, benceno o cloruro de metileno. El agente de metilación, por ejemplo el diazometano, se emplea aquí en exceso, por ejemplo en un exceso 0,5 molar o mayor. Convenientemente se efectúa la metilación dejando reposar la mezcla a temperatura ambiente.

20.

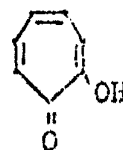
Como producto de partida se puede emplear un compuesto colquicínico II ( $\overline{R} =$  O=C1C=CC(O)C=C1) o un compuesto

25.

colquicínico II ( $\overline{R} =$  O=C1C=CC(O)C=C1) o un compuesto

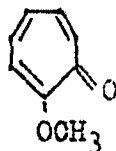


isocolquicínico correspondiente (Fórmula II  $\text{R} =$  )



- o una mezcla de estos compuestos. Los productos de partida se pueden obtener también, por ejemplo, mediante reacción de N-desacetil-14'-desmetil-n-(ó bien iso-)-colquicina con
5. un haluro cloroacético o anhídrido cloroacético.

Después de la primera etapa del procedimiento según la presente invención se obtiene el compuesto I en mezcla con el correspondiente compuesto isocolquicínico (Fórmula I, en la que, sin embargo,



está sustituido por COC(=O)C1=CC=CC(O)=C1 )

10. De esta mezcla se separa el compuesto deseado I debido a la distinta solubilidad en comparación con el correspondiente compuesto isocolquicínico.

Así se puede separar, debido a la distinta solubilidad, por ejemplo, el compuesto I por cristalización en disolventes adecuados del compuesto isocolquicínico.

- 15.

Es ventajoso emplear, para la recristalización disolventes en los cuales el compuesto colquicínico forme un solvato de difícil solubilidad, pero sin embargo el correspondiente compuesto isocolquicínico un solvato de fácil solubilidad. El compuesto colquicínico se precipita en forma de solvato mientras el compuesto isocolquicínico se queda en la lejía madre. De la lejía madre se pueden obtener los últimos restos del derivado colquicínico aún disuelto, por ejemplo, por elaboración cromatográfica. Disolviendo y precipitando

- 20.



el compuesto colquicínico, que en forma cristalina aún contiene disolvente, por ejemplo, cloroformo, se obtiene entonces en metanol el compuesto I libre de disolvente, por ejemplo, libre de cloroformo.

5. La separación se puede realizar también cromatográficamente con agentes de elución adecuados, por ejemplo, hidrocarburos clorados, tales como cloroformo, tetracloruro de carbono, cloruro metilénico, bajo adición de una reducida cantidad de un alcohol inferior, tal como metanol o etanol, en un agente de sorpción adecuado, tal como gel de sílice.

10. En dependencia de la distinta solubilidad del compuesto I deseado, en comparación con el compuesto isocolquicínico, se obtiene también en esta separación cromatográfica el compuesto I puro.

15. Además se puede separar el compuesto I también, por ejemplo, por extracción del correspondiente compuesto isocolquicínico. También aquí se obtiene el compuesto I en forma pura debido a su diferente solubilidad en comparación con el correspondiente compuesto isocolquicínico. La extracción se puede realizar, por ejemplo, también en un sistema de aparatos de distribución con dos líquidos solo parcialmente miscibles entre sí, según el principio de la distribución de Craig. En esta forma de ejecución especial se mueven dos fases líquidas en contracorriente entre sí y se ponen constantemente en equilibrio.

20. El derivado colquicínico de la fórmula I arriba indicada, de eficacia terapéutica, o bien para el tratamiento de las plantas, se presenta en la forma l.

25. Por esta razón es conveniente partir, en el procedi

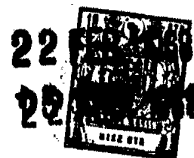
30.

22 FEB 1968  
28

miento de la presente invención, de un compuesto de colquicina y/o isocolquicina II correspondiente que se encuentra en la forma  $l$ . Naturalmente se puede presentar el producto de partida en forma de una mezcla de racematos, debiéndose sin embargo separar ulteriormente en forma convenientemente la forma  $l$  activa de la forma  $d$  aún contenida en el producto del procedimiento. La separación se puede realizar, por ejemplo, mediante tratamiento con ácidos ópticamente activos y separación de las sales, por ejemplo, por vía cromatográfica.

La clorocolquicina de la fórmula I de arriba posee un destacado efecto antimitótico o bien citoestático. El compuesto fué comprobado experimentalmente con animales según el método de H. Lettre, "Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie" (Revista para química fisiológica de Hoppe Seyler) 268, pág. 59 - 76 (1941). El compuesto I muestra en este ensayo una mayor eficacia que la colquicina. Por ejemplo se logra con la N-cloroacetil-desacetil-colquicina en una dosis diaria de respectivamente 5 microgramos, después de una aplicación de cinco días, una proporción de sobrevivientes superior al 60 % bajo curación del tumor. Por el contrario con un tratamiento análogo con colquicina, en igual dosis, no se obtiene ningún efecto curativo. Solamente después de aumentar la dosis diaria a 10 microgramos se logra con la colquicina una curación del tumor y una proporción de sobrevivientes de sólo un 10%.

Especialmente favorable es que la N-cloroacetil-desacetilcolquicina muestra un efecto inhibitor en el tratamiento del tumor Ascites en los ratones resistentes a la colquicina. Además es digno de observar que la N-cloroace-



til-desacetil-colquicina tiene contra el tumor Ascites, en los ratones, una eficacia 100 veces mejor que el 5-fluor-uracilo ya empleado en el ensayo con animales, referido a las mismas cantidades en peso de sustancia activa empleada.

5. El nuevo compuesto según la invención se ha de emplear como cancerostático, especialmente para combatir la leucemia. Además se tiene proyectada su aplicación como terapéutico para la curación de la gota. El nuevo derivado colquicínico se puede emplear en mezcla con los excipientes medicinales usuales para la medicina humana y veterinaria.
10. Como sustancias vehículo pueden citarse aquellos productos orgánicos que son adecuados para aplicación parenteral, enteral o topical y que no reaccionen con el nuevo compuesto, tales como por ejemplo agua, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, fécula, estearato de magnesio, talco, vaselina, colestestina. Para la aplicación parenteral sirven especialmente las soluciones, preferentemente las soluciones oleinosas o acuosas, así como las suspensiones o emulsiones. Para la aplicación enteral son además adecuadas las tabletas o las grageas, para la aplicación topical los ungüentos o cremas, que, en caso dado, estarán esterilizados o mezclados con adyuvantes, tales como agentes de conservación, estabilización o humectación, o sales para regular la presión osmótica o con sustancias tampón. En caso dado se puede combinar el derivado colquicínico de fórmula I también con otras sustancias terapéuticamente activas. La dosis diaria convenientemente empleada de la sustancia activa se encuentra entre unos 0,5 y 10 mg, dándose especial preferencia a un margen entre 2 - 5 mg.
- 15.
- 20.
- 25.
30. En la biología experimental se puede emplear el nuevo



derivado halogenocolquicina según la invención especialmente como reactivo cancerostático y como sustancia comparativa en la investigación experimental del cancer, por ejemplo, en ensayos quimioterapéuticos y en las investigaciones sobre la formación del cancer y metabolismo del cancer.

5. Además se puede emplear para el diagnóstico de enfermedades hereditarias en el análisis de cromosomas. Otro campo de aplicación es la investigación de los virus, especialmente en el estudio del mecanismo de la multiplicación de los virus.
10. Además se puede emplear el compuesto como veneno mitótico en la biología experimental (microbiología, botánica, zoología).

Finalmente se puede utilizar el compuesto de fórmula I para poliploidización o bien modificación de la mitosis, o bien para lograr variaciones mutacionales en plantas.

15. Convenientemente se aplica en esta aplicación el compuesto I, en caso dado en solución o sobre un soporte, sobre la semilla de la planta. Una solución del compuesto I se puede inyectar también en la flor de la planta o infundir en el tallo de las plantas. Otra posibilidad consiste en impregnar las tierras de cultivo con el compuesto I, preferentemente en solución o suspensión acuosas.
- 20.

Para la poliploidización de las plantas se emplea el nuevo derivado halogenocolquicínico, según la presente invención, preferentemente en soluciones en una concentración de aproximadamente 0,01 hasta 0,2 %. Especialmente importante es el aumento logrado en el rendimiento de las plantas útiles por poliploidización.

- 25.
- A. Ejemplos para la obtención de los derivados halogenocolquicínicos según la presente invención.
- 30.



Ejemplo 1

- Una solución de 0,88 g de cloruro cloroacetílico en 10 cc de benceno absoluto o cloruro metilénico se vierte a una mezcla de 1,55 g de desacetilcolquiceína en 40 cc de benceno absoluto o cloruro metilénico y 0,96 g de carbonato sódico. La mezcla se deja estar bajo agitación, durante la noche a temperatura ambiente. Después se vierte la mezcla en 25 cc de agua y la fase acuosa se acidifica con ácido clorhídrico. Se separa la fase acuosa y a continuación se agita con agua, después con solución al 5 % de bicarbonato sódico y finalmente de nuevo con agua. Después de separar y secar sobre sulfato sódico suministra la fase orgánica, al evaporar, un residuo que se recristaliza en metanol/éter. Se obtienen así 0,805 g de clorocolquiceína (42% de la teoría), p.f. 204-206°C.
- 5.
- 10.
- 15.

- Una solución de 1,21 g de clorocolquiceína en 50 cc de cloruro metilénico se trata con un exceso de diazometano en cloruro metilénico. La solución se filtra tan pronto como no de ningún color más con solución de FeCl<sub>3</sub>. A continuación se evapora el disolvente. El residuo ( 1,28 g) se disuelve en cloroformo y se vierte en una columna cubierta con 30 g de gel de sílice. La columna se eluye con cloroformo y 1 % de metanol en cloroformo. Las fracciones centrales se cristalizan conjuntamente en metanol/éter. Rendimiento: 0,44 g de clorocolquiceína (Fórmula I; R<sup>1</sup>=-CO-CH<sub>2</sub>Cl, R<sup>2</sup>= OCH<sub>3</sub>), Rendimiento: 32 % de la teoría; p.f. 204-206°C.
- 20.
- 25.

Ejemplo 2

- Una solución de 57 g de cloruro cloroacetílico y 600 cc de cloruro metilénico absoluto benceno se gotea a una mezcla de 100 g de desacetilcolquiceína, 2,6 l de cloruro
- 30.



- metilénico absoluto o benceno y 61,6 g de carbonato sódico anhidro y se agita durante la noche a temperatura ambiente. Después se vierten lentamente 1,6 l de agua y después de agitar durante 30 minutos se separa la fase acuosa.
5. La capa cloruro metilénica se agita aún cinco veces, cada una, con 1 litro de solución al 5 % de sosa. Los extractos reunidos y filtrados se neutralizan bajo refrigeración con hielo con ácido clorhídrico al 25 % a un pH de 7 y se extrae una vez con 1 litro y tres veces cada una con 0,5 litros de cloruro metilénico o benceno. Los extractos cloruro metilénicos o bien bencénicos se lavan una vez con poca agua, se seca con sulfato sódico, se filtra y después se concentra por evaporación hasta comenzar la cristalización. Después de reposar en frío se obtiene la clorocolquiceina
10. de p.f. 192°C. Rendimiento: 78 g (64 % de la teoría).
15. La solución de 78 g de clorocolquiceina se trata en 25 veces su cantidad de cloruro metilénico con un exceso de diazometano en cloruro metilénico. Tan pronto como la solución no dé ninguna reacción con cloruro de hierro se evapora y el residuo (aproximadamente 80 g de mezcla de clorocolquicina/cloroisocolquicina) se disuelve en 160 cc de cloroformo. Al reposar cristalizan 32 g de clorocolquicina con 0,5 moles de cristal de cloroformo que se aspiran y al recrystalizar en doble cantidad de metanol suministran 22 g
20. de producto libre de cristal del disolvente de p.f. 211°C. De la lejía madre metanólica concentrada por evaporación cristalizan aún 4 g de clorocolquicina con el mismo punto de fusión de 211°C. Rendimiento total: 26 g (32 % de la teoría).
25. Aunque aún se pueden obtener pequeñas cantidades de
- 30.

22 FEB



cloroconquicina de las leñas madre clorofórmicas y meta-  
nólicas por cromatografía de columna en gel de sílice con  
cloroformo como eluyente, es más conveniente hidrolizar el  
residuo de evaporación de las leñas con 100 veces su can-  
5. tidad de ácido clorhídrico 1-N y emplear la desacetilcolqui-  
ceina así obtenida de nuevo en la cloroacetilización.

B. Ejemplos de preparados farmacéuticos.

Ejemplo 1: Ungüento

10. Cada vez 100 mg de desacetil-N-(cloro-acetil)-colqui-  
cina se incorporan en una mezcla de  
2 % de alcohol de cera de lana  
1 % de alcohol cetílico  
15 % de aceite de parafina viscoso  
82 % de vaselina blanca.

15. Ejemplo 2: Ampollas - solución inyectable

- 2 mg de desacetil-N-(cloroacetil)-colquicina se di-  
suelven primeramente en poca agua y después se completan  
junto con 18,055 mg de dihidrogenofosfato sódico, 0,225 mg  
de hidrogenofosfato disódico y 2 mg de alcohol bencílico  
20. con agua a un volumen de 2 cc.

Ejemplo 3: Tabletas

- 5 mg de desacetil-N-(cloroacetil)-colquicina se ela-  
boran con 70 mg de lactosa bajo empleo de un mucílago de  
metilcelulosa a un granulado, a continuación se completa  
25. con un 10 % de fécula y 10 % de talco a un peso de 100 mg/  
tableta y se prensa a tabletas en la forma usual.

C. Ejemplo para un agente según la presente invención para  
la poliploidización de plantas.

30. Desacetil-N-cloroacetil-colquicina se disuelven en  
agua en una concentración de 0,02 %.

22 FEB

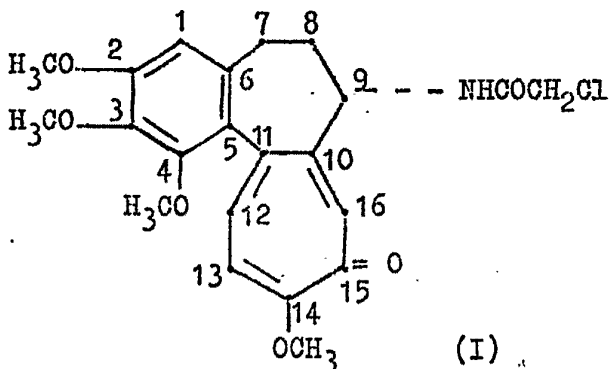


- 1 cc de esta solución se infunde, un mes antes de empezar el florecimiento, en el tallo de plantas de judías (*Vicia faba*) en el transcurso de un día. Las semillas se recogen después de madurar y se emplean para determinar el grado de poliploidización así como el ulterior cultivo.
- 5.

- NOTA -

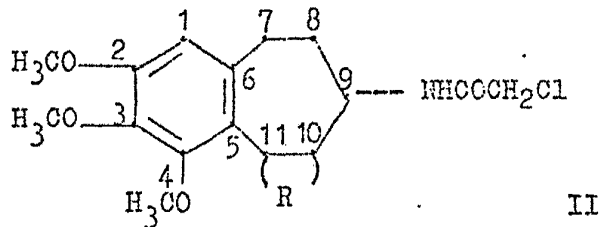
- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Alemania, con fecha 23 de febrero de 1968, bajo el número P 16 95 547.8, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN DERIVADO DE HALOGENOCOLQUICINA"; caracterizándose por lo siguiente:
- 10.
- 15.
- 20.

1ª.- "Procedimiento para la obtención de un derivado de halogenocolquicina", de fórmula I

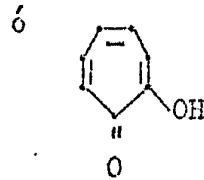
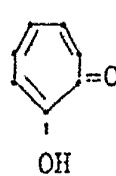




caracterizado porque se metila una desmetilcolquicina de fórmula II



en la que  $\underbrace{\hspace{1cm}}$  significa



5. y a continuación se separa el compuesto I obtenido del correspondiente isocolquicínico que, asimismo se ha formado.

2ª.- "Procedimiento para la obtención de un derivado de halogenocolquicina", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

10. Esta Memoria consta de 13 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid

15 ENE. 1971

E. MERCK AKTIENGESELLSCHAFT

A. GOMEZ ACEBO Y MOJER

a. d. Firmado: F. Hernández Ruiz