

409803



Int. Cl.<sup>2</sup>: C07G//A61K

409803

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

## PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR R.T.

RESIDENCIA: GYOMROI UT 21.-BUDAPEST X.- HUNARIA

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO SEMISINTETICO PARA -  
LA PREPARACION DE VINCRISTINA.

Prioridad: Patente ..... n.º ..... del .....

ML.

409803

- 2 -



1           Esta invención se refiere a un procedimiento semi-sintético para la preparación de vincristina.

5           Los alcaloides citostáticos de la Vinca rosea L. (Catharantus roseus G. Don), es decir la vimblastina y la vincristina, son conocidos desde hace unos 10 años y, basándose en las investigaciones clínicas, han demostrado ser los quimioterápicos citostáticos más eficaces. En primer lugar, son mejores los resultados conseguidos con la vincristina, ya que este compuesto ha ejercido una acción salvadora de vidas en la leucemia aguda de los niños (Haggard, M. E.: Vincristine therapy for acute leukemia in children; Cancer Chemother, Reports, 52, 477, 1968).

10

15           Como es sabido, la vincristina se encuentra presente solo en pequeña cantidad en el complicadísimo espectro alcaloide de la Vinca rosea L. No más del 0,1 % de vincristina puede ser separada de la mezcla alcaloide total que contiene alrededor de 70 clases de alcaloides, lo que significa un rendimiento de unos 3 a 5 mg de vincristina calculado para 1 kg de droga seca. Los procedimientos descritos en la memoria de la patente estadounidense nº 3.205.220 y en la memoria de la patente húngara nº 160.967 hacen posible la separación de vincristina en la cantidad antes mencionada.

20

25           Debido a la incalculable importancia terapéutica de la vincristina, se han realizado y están en marcha diversas investigaciones en todo el mundo para su preparación en cantidades mayores y a precios de coste más bajos.

30           Como es sabido, la N-desmetil-vimblastina, el producto de descomposición común de vimblastina y vincristina, puede ser formilada por procedimientos conocidos para dar vincristina (memoria de la patente estadounidense número



1 3.354.163). En esta memoria se menciona que la vimblastina  
puede ser oxidada a N-desmetil-vimblastina en un proceso de  
oxidación biológica, utilizando un enzima peroxidasa en pre-  
sencia de peróxido de hidrógeno y el producto desmetilado, a  
5 su vez, puede ser formilado de forma conocida para dar vin-  
cristina. Sin embargo, esta memoria no da ningún ejemplo de  
esta síntesis y no puede deducirse ninguna otra directriz  
relativa a la oxidación biológica de la vimblastina y al ren-  
dimiento del producto.

10 Investigando la oxidación de la vimblastina hemos  
encontrado, inesperadamente, que si la vimblastina o una  
sal de adición de ácido de la misma, preferiblemente el sul-  
fato, es oxidada con ácido crómico o con sus sales a tempe-  
raturas bajas, el grupo N-metilo de la vimblastina puede  
15 ser convertido directamente en un grupo formilo.

Esta oxidación selectiva está en contraposición  
con la descripción de la memoria de la patente estadouniden-  
se nº 3.354.163 y no ha sido prevista por ningún experto en  
la técnica, ya que la molécula de vimblastina contiene va-  
rios grupos que son mucho más sensibles a la oxidación que  
20 el grupo N-metilo.

Por consiguiente, esta invención se refiere a un  
proceso semisintético para la preparación de vincristina, en  
el que la vimblastina o una sal de la misma, preferiblemente  
25 el sulfato, es oxidada con ácido crómico o con una de sus sa-  
les a temperatura baja, la mezcla de reacción se neutraliza  
o alcaliniza y el producto se separa de la misma por extra-  
cción, se evapora el extracto a sequedad, el residuo seco es  
opcionalmente formilado, la vincristina y también opcional-  
30 mente la N-desmetil-vimblastina son aisladas del producto y



1 el producto o productos son opcionalmente convertidos en  
sus sales, preferiblemente en sulfatos. Las sales pueden  
ser purificadas por recristalización, si es necesario.

5 De acuerdo con la invención, se procede de la forma  
siguiente: la vimblastina o su sal, preferiblemente el  
sulfato, se disuelve en un disolvente orgánico o mezcla de  
disolventes, preferiblemente en una mezcla de ácido acético  
glacial y acetona, se enfría la mezcla a una temperatura  
10 inferior a 0°C, preferiblemente entre -30° y -90°C, se  
añade a la solución de vimblastina, agitando intensamente  
y enfriando, una solución orgánica, preferiblemente una solución  
en anhídrido acético, de ácido crómico o de una sal  
de ácido crómico, previamente enfriada a la temperatura de  
la solución de vimblastina y después la mezcla de reacción  
15 se deja en reposo durante un máximo de 15 minutos, preferi-  
blemente durante 8 minutos. A continuación se agrega a la  
mezcla, con precaución, hidróxido amónico a una temperatura  
comprendida entre -40 y -50°C con objeto de ajustar el  
pH entre 8 y 9, la mezcla se diluye con agua y la mezcla  
20 acuosa se extrae en varias veces con un disolvente orgánico,  
preferiblemente con cloruro de metileno, hasta que se consigue  
una reacción negativa de alcaloide. Se combinan los  
extractos, se lavan con agua, se secan y evaporan a sequedad  
bajo presión reducida. La base vincristina cruda amorfa  
25 obtenida, conteniendo N-desmetil-vimblastina como impureza,  
es purificada por cromatografía utilizando una columna de  
óxido de aluminio humedecida con benceno. La vincristina  
cruda se disuelve en benceno y la solución se pasa por la  
columna. La elución se realiza con mezclas 2:1 y 1:1 de ben-  
30 ceno y cloroformo. Los alcaloides presentes en las fraccio-



1 nes individuales son identificados por cromatografía en pa-  
pel o en capa fina y se combinan las fracciones que contie-  
nen vincristina o N-desmetil-vimblastina, respectivamente.  
5 Las fracciones combinadas se evaporan a sequedad. La vin-  
cristina y la N-desmetil-vimblastina así obtenidas, respec-  
tivamente, son convertidas opcionalmente en sus sales, pre-  
feriblemente en los sulfatos. Las sales pueden ser purifica-  
das por recristalización si es necesario.

10 De acuerdo con un método especialmente preferido de  
la invención, el residuo seco que contiene vincristina, ob-  
tenido cuando se trata la mezcla de reacción después del  
proceso de oxidación, es formilado con una mezcla de ácido  
fórmico y anhídrido acético. En esta reacción, la N-desme-  
til-vimblastina presente en el residuo seco como impureza  
15 se convierte en vincristina. Después la mezcla de reacción  
se neutraliza, se extrae con cloruro de metileno, se combi-  
nan los extractos, se lavan con agua y se evaporan a seque-  
dad bajo presión reducida para dar vincristina como residuo  
seco. El producto así obtenido se purifica por cromatogra-  
20 fía y se convierte en una sal, preferiblemente en el sulfa-  
to, si así se desea. La sal puede ser purificada por recris-  
talización si es necesario.

25 La invención es elucidada además mediante los si-  
guientes ejemplos no limitativos.

#### EJEMPLO 1

30 Se disuelven 10 g (0,011 moles) de sulfato de vim-  
blastina en 2200 ml de acetona y a la solución se añaden  
500 ml de ácido acético glacial. La mezcla se enfría a  
-60°C. Al mismo tiempo se disuelven 4,96 g (0,0494 moles)  
de ácido crómico en 1860 ml de anhídrido acético, la solu-

409803



1 ción se enfría a  $-60^{\circ}\text{C}$  y se añade gota a gota a la solución  
de sulfato de vimblastina con intensa agitación. Al cabo de  
8 minutos de agitación, se añaden gota a gota a la mezcla de  
5 reacción 4400 ml de hidróxido amónico concentrado, a una tem-  
peratura de  $-40$  a  $-50^{\circ}\text{C}$ , para ajustar el pH a 8. Durante es-  
te proceso, la temperatura de la solución no puede pasar de  
 $+50^{\circ}\text{C}$ . La mezcla alcalina obtenida se diluye con 10 litros  
de agua y se extrae con cloruro de metileno hasta que se  
10 consigue una reacción negativa de alcaloide. Los extractos  
en cloruro de metileno se combinan y se lavan dos veces con  
3000 ml de agua cada vez con objeto de separar el acetato  
amónico formado en el proceso de neutralización. La solución  
en cloruro de metileno se seca y evapora a sequedad bajo pres-  
sión reducida. Se obtienen 8,5 g de vincristina cruda amor-  
15 fa, conteniendo N-desmetil-vimblastina como impureza. La  
vincristina cruda amorfa obtenida se disuelve en 30 ml de  
benceno y la solución se pasa por una columna de óxido de  
aluminio humedecida con benceno. La elución se comienza con  
1300 ml de benceno, después se utiliza como agente eluyente  
20 5500 ml de una mezcla 2:1 de benceno y cloroformo y la elu-  
ción se termina con 4250 ml de una mezcla 1:1 de benceno y  
cloroformo. El efluente se recoge en fracciones de 250 ml.  
Las fracciones individuales se someten a cromatografía en  
25 papel o en capa fina. La impureza N-desmetil-vimblastina,  
formada en la oxidación como subproducto, puede ser eluida  
con la mezcla 2:1 de benceno y cloroformo, mientras que la  
vincristina aparece en la mezcla 1:1 de benceno y cloroformo.  
30 Las fracciones que contienen los mismos alcaloides, de-  
terminadas por cromatografía en papel o en capa fina, se  
combinan y evaporan a sequedad bajo presión reducida. Se ob-

409803



1 tienen 5,9 g de vincristina amorfa, así como 2,7 g de N-desmetil-vimblastina amorfa.

5 La N-desmetil-vimblastina amorfa se disuelve en 27 ml de etanol seco y el pH de la solución se ajusta a 4,0 con solución etanólica de ácido sulfúrico al 1 %, para precipitar sulfato de N-desmetil-vimblastina en forma cristalina. Los 2,5 g obtenidos de sulfato de N-desmetil-vimblastina se disuelven en 15 ml de metanol y a la solución se añaden 10 60 ml de etanol seco. La mezcla se deja en reposo durante una hora a la temperatura ambiente y después se filtra el sulfato de N-desmetil-vimblastina cristalino separado. Se obtienen 2,2 g (0,0024 moles) de sulfato de N-desmetil-vimblastina. Rendimiento: 20 %.

15 La base es liberada de una muestra del sulfato de N-desmetil-vimblastina obtenido y la base libre se identifica sobre los siguientes datos:

P.f. 212-215°C (Boetius).

$[\alpha]_D^{20} = +15,8^\circ$  (c = 1, en cloroformo).

20 La N-desmetil-vimblastina, formada en la oxidación de vimblastina, o una sal de la misma puede ser formulada por procedimientos conocidos para dar vincristina o una sal de ésta.

25 Los 5,9 g obtenidos de vincristina amorfa se disuelven en 60 ml de etanol seco y la solución se acidula con solución metanólica de ácido sulfúrico al 1 % hasta pH 4,0 para dar sulfato de vincristina cristalino. Los 5,6 g obtenidos de sulfato de vincristina se disuelven en 30 ml de metanol y a la solución se añaden 120 ml de etanol seco. La mezcla se deja en reposo a la temperatura ambiente durante una 30



409803

1 hora y el sulfato de vincristina cristalino separado se filtra.

Se obtienen 5,2 g (0,0055 moles) de sulfato de vincristina. Rendimiento: 50 %.

5  $[\alpha]_D^{20} = +11$  a  $+12^\circ$  (c = 1, en agua).

$R_f = 0,30$  (aparece con un intenso color azul).

10 El producto se identifica basándose en su espectro infrarrojo, que contiene una banda de absorción muy intensa a  $5,94 \mu$ , en comparación con el espectro infrarrojo de la vimblastina.

15 Los exámenes cromatográficos en capa fina se realizaron sobre adsorbente "óxido de aluminio G Merck". Como agente eluyente se utilizó cloroformo conteniendo 0,5 % de metanol, mientras que el revelado se efectuó con ácido fosfórico concentrado conteniendo 1 % de sulfato amónico cérico.

#### EJEMPLO 2

20 Se disuelven 5 g (0,0055 moles) de sulfato de vimblastina en 1100 ml de acetona y después se añaden a la solución 250 ml de ácido acético glacial al 99,5 % (destilado de ácido crómico y no conteniendo sustancias oxidables). La mezcla se enfría a  $-60^\circ\text{C}$ . Al mismo tiempo se disuelven 2,48 g (0,0297 moles) de ácido crómico en 930 ml de anhídrido acético, la solución se enfría a  $-60^\circ\text{C}$  y se agrega a la solución de sulfato de vimblastina con agitación. La mezcla de reacción se agita durante 8 minutos, después el pH de la mezcla se ajusta a 9,0 mediante la adición gota a gota de hidróxido amónico concentrado a una temperatura de  $-40$  a  $-50^\circ\text{C}$ . Durante este proceso, la temperatura de la mezcla no puede pasar de  $+50^\circ\text{C}$ . La mezcla alcalina se diluye con 5000 ml de

25

30

409803

- 9 -



1 agua y se extrae tres veces con 1000 ml cada vez de cloruro  
de metileno hasta que se consigue una reacción negativa del  
alcaloide. Las fases de cloruro de metileno se combinan y  
lavan dos veces con 1500 ml de agua cada vez, con objeto de  
5 separar el acetato amónico formado en el proceso de neutra-  
lización. La solución en cloruro de metileno se seca y eva-  
pora a sequedad bajo presión reducida. El residuo se disuel-  
ve en una mezcla de 75 ml de ácido fórmico concentrado y  
12,5 ml de anhídrido acético y la mezcla se deja en reposo  
10 a la temperatura ambiente durante 5 minutos. La solución áci-  
da se diluye con agua hasta tres veces su volumen, se alcali-  
niza (pH = 9) con hidróxido amónico concentrado enfriando  
y el alcaloide se extrae tres veces con 100 ml cada vez de  
cloruro de metileno. Las soluciones en cloruro de metileno  
15 se combinan, secan y evaporan a sequedad bajo presión redu-  
cida. El residuo seco que contiene vincristina se disuelve  
en 20 ml de benceno y la solución se pasa por una columna  
de óxido de aluminio con un grado de actividad IV-V, hume-  
decida con benceno. La elución se inicia con 500 ml de ben-  
20 ceno y después se utiliza como agente eluyente 1000 ml de  
una mezcla 9:1 de benceno y cloroformo, 700 ml de una mezcla  
8,5:1,5 de benceno y cloroformo y 2300 ml de una mezcla 8:2  
de benceno y cloroformo. La elución se termina con una mez-  
25 cla 1:1 de benceno y cloroformo. El efluente se recoge en  
fracciones de 250 ml. El benceno y las mezclas 9:1 y 8,5:1,5  
de benceno y cloroformo sirven para separar las sustancias  
adsorbidas; el alcaloide aparece por primera vez en las  
fracciones obtenidas en la primera porción de la mezcla 8:2  
30 de benceno y cloroformo. Estas fracciones se combinan y eva-

409803

- 10 -



1 poran a sequedad bajo presión reducida, dando un subproducto  
to en una proporción del 5 al 10 % calculado sobre el peso  
de sulfato de vincristina final. Este subproducto se forma  
durante el proceso de oxidación. La vincristina aparece por  
5 primera vez con la segunda porción de la mezcla 8:2 de ben-  
ceno y cloroformo y la elución de vincristina termina con  
la mezcla 1:1 de benceno y cloroformo. Las fracciones que  
contienen vincristina, determinadas por cromatografía en  
papel y en capa fina, se combinan y evaporan a sequedad ba-  
10 jo presión reducida. Los 3,8 g obtenidos de residuo seco se  
disuelven en 40 ml de etanol seco y la solución se acidu-  
la a pH 4,0 con solución etanólica de ácido sulfúrico al 1%.  
La vincristina se separa en forma de su sulfato. El precipi-  
tado separado se filtra, se disuelve en 30 ml de metanol y  
15 a la solución se añaden 120 ml de etanol seco. Al cabo de  
una hora de reposo, el sulfato de vincristina se separa en  
forma cristalina. El producto se filtra, se lava y seca. Se  
obtienen 3,5 g (0,0039 moles) de sulfato de vincristina.  
Rendimiento: 70 %. Las constantes físicas del producto son  
20 idénticas a las del Ejemplo 1.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita  
deberá recaer sobre las siguientes:

#### REIVINDICACIONES

25 1.- Un procedimiento semisintético para la preparación  
de vincristina en el que la vimblastina o una sal de la mis-  
ma, preferiblemente el sulfato, es oxidada con ácido crómi-  
co o con una de sus sales a temperatura baja, la mezcla de  
reacción es neutralizada o alcalinizada y el producto es se-  
parado por extracción, el extracto es evaporado a sequedad,  
30 el residuo seco es opcionalmente formilado, la vincristina

ME  
30



409803

1 y opcionalmente también la N-desmetil-vimblastina son aisla  
das del producto y el producto o productos son opcionalmen-  
te convertidos en sus sales, preferiblemente en los sulfatos.

5 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el  
que la oxidación se lleva a cabo en un disolvente orgánico  
o en una mezcla de disolventes, preferiblemente en una mez-  
cla 4:1 de acetona y ácido acético glacial.

10 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el  
que la oxidación se lleva a cabo con ácido crómico o una -  
sal del mismo, disuelto en un disolvente orgánico o en una  
mezcla de disolventes, preferiblemente en anhídrido acético.

15 4.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindi-  
caciones 1 a 3, en el que la oxidación se lleva a cabo a -  
una temperatura inferior a 0°C, preferiblemente entre -30°C  
y -90°C.

20 5.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindi-  
caciones 1 a 4, en el que después de la oxidación, el pH de  
la mezcla es ajustado a 7-9 con solución concentrada de hidró-  
xido amónico, durante cuya operación la temperatura de la -  
solución se mantiene en +50°C como máximo.

6.- Un procedimiento según la reivindicación 5, en el  
que la mezclaneutra o alcalina se extrae con un disolven-  
te orgánico o una mezcla de disolventes, preferiblemente -  
con cloruro de metileno.

25 7.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindi-  
caciones 1 a 6, en el que el residuo seco es formilado con  
una mezcla de ácido fórmico y anhídrido acético.

30 mfe  
8.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindi-  
caciones 1 a 6, en el que la vincristina y la N-desmetil-  
vimblastina, opcionalmente formada como subproducto, son -

409803



1 aisladas por separación cromatográfica.

5 9.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8, en el que la separación cromatográfica se lleva a cabo sobre una columna de óxido de aluminio, el residuo seco se transfiere a la columna en solución bencénica, la elución se realiza con benceno y con una mezcla - 2:1 de benceno y cloroformo y los efluyentes que contienen productos idénticos se combinan y evaporan a sequedad.

10 10.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la vincristina es aislada del residuo seco formilado por separación cromatográfica.

15 11.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 10, en el que la separación cromatográfica se lleva a cabo sobre una columna de óxido de aluminio, el residuo seco se transfiere a la columna en solución bencénica, la elución se realiza en benceno y mezclas de benceno-cloroformo según la secuencia 2:1, 8,5:1,5, 8:2 y 1:1 y las fracciones que contienen vincristina se evaporan a sequedad.

20 12.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la formación de sal se consigue agregando ácido sulfúrico, preferiblemente solución etanólica de ácido sulfúrico al 1 %, a la solución etanólica del residuo seco obtenido cuando se evapora el eluato o eluatos a sequedad.

25 13.- Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN - PROCEDIMIENTO SEMISINTETICO PARA LA PREPARACION DE VINCRISTINA.

*me*



409803

1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva, que consta de trece páginas mecanografiadas.

5

Madrid, 19 de diciembre 1.972

BERNARDO UNGRIA  
p.p.

10

15

20

25

30