

24



Int. Cl.ª C07D

**451340**

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

RESIDENCIA: 307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS,  
Indiana 46206, Estados Unidos

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR LOS AL  
CALOIDES DE INDOL-DIMERICOS - VINCRIS-  
TINA, DES-N-METILVINBLASTINA Y VINBLAS  
TINA.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 409.225 del 24-10-1973

- IN.-



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar los alcaloides de indol diméricos -vinblastina, des-N-metilvinblastina y vincristina- que comprende extraer hojas de Vinca rosea con ácido, neutralizar la solución ácida, extraer los alcaloides diméricos en un disolvente aromático, someter opcionalmente los alcaloides extraídos a cromatografía de exclusión de gel, precipitar los alcaloides diméricos como sales sulfato y finalmente separar los alcaloides diméricos mediante cromatografía a alta presión.

La vinblastina (vincaleucoblastina o VLB) se aisló mediante extracción de hojas de Vinca rosea con etanol y ácido acético, acidificación del extracto con ácido clorhídrico, extracción de la solución acuosa ácida con benceno seguida por cromatografía de elución de gradiente de pH de los alcaloides extraídos con benceno sobre alúmina. En un procedimiento mejorado para preparar vinblastina y su alcaloide acompañante, la leurosina, las hojas de Vinca rosea se extraen en un sistema disolvente de ácido tartárico-benceno, se neutraliza la capa de benceno, los alcaloides insolubles en la base se extraen en benceno y el extracto de benceno se somete después a un procedimiento de separación cromatográfico en el cual se eluyen sucesivamente la leurosina y la vinblastina. La separación de la vincristina (leurocristina) de otros alcaloides de Vinca diméricos también se logra mediante extracción de hojas de Vinca rosea con una mezcla de benceno y ácido tartárico. Los licores madres eventualmente obtenidos después de la cristalización del sulfato de vinblastina mediante cualquiera de los procedimientos de los dos procedimientos anteriores, se someten a un procedimien-



1 to de extracción con ácido cítrico, primero a un pH de 4,4  
y después a un pH de 7,0. Los alcaloides obtenidos median-  
te evaporación del eluyente de benceno en este pH más ele-  
vado se cromatografían sobre alúmina desactivada y la vin-  
5 cristina se eluye después de la vinrosidina (leurosidina).

De conformidad con otro procedimiento para puri-  
ficar los tres alcaloides anti-cancerosos diméricos princi-  
pales de la Vinca rosea: la vinblastina, la vincristina y  
la leurosina, las hojas de vinca se extraen con metanol acuoso  
10 so y los alcaloides diméricos así extraídos se convierten a  
sales de adición de ácido en solución, preferiblemente a sul-  
fatos. El extracto ácido se extrae después con benceno, de-  
sechándose los extractos bencénicos. La capa ácida se hace  
después alcalina y los alcaloides se extraen en benceno. Es-  
15 te extracto de benceno se evapora a sequedad y los alcaloi-  
des residuales se convierten nuevamente en las sales sulfato  
correspondientes con ácido sulfúrico al 10%. Se obtiene  
una mezcla de los sulfatos cristalinos de los alcaloides 3  
diméricos y éstos se separan mediante cromatografía utilizan-  
20 do cloruro de metileno y cloroformo como los disolventes de  
elución. Alternativamente, las bases alcaloidales se sepa-  
ran mediante cromatografía sin convertirlas primero en sa-  
les sulfato.

Finalmente, se ha descrito un procedimiento en el  
25 cual las hojas de vinca se tratan con hidróxido de amonio y  
después con tolueno. El extracto toluénico se pone en con-  
tacto con ácido clorhídrico, y la mezcla alcaloide restan-  
te se extrae con cloruro de etileno a un pH de 9. Esta frac-  
ción de alcaloide se cromatografía después sobre alúmina neu-  
30 tra. Las fracciones de vinblastina y de leurosina se eluyen



1 con benceno-éter. (No se hace mención del aislamiento de la vincristina en este procedimiento particular).

5 Es un objeto de esta invención proveer un procedimiento para la purificación de vincristina, des-N-metilvinblastina y vinblastina empezando con hojas de Vinca rosea cuyo procedimiento origina los alcaloides diméricos deseados en una cantidad mayor y con un grado más elevado de pureza que cualesquiera de los procedimientos previamente descritos.

10 En la realización de los objetos anteriores y de otros, esta invención proporciona un procedimiento para la purificación de alcaloides diméricos de indol que comprende la extracción de hojas de Vinca rosea u otra fuente natural de alcaloides diméricos con ácido acuoso (pH = 3). La  
15 extracción del extracto acuoso con un disolvente inmiscible con el agua, el ajuste del pH del extracto acuoso a 6, la extracción de la capa acuosa ácida con un disolvente inmiscible con el agua, desechándose la capa ácida y la evaporación del disolvente de extracción para producir alcaloides  
20 residuales. En este punto, puede emplearse una etapa de purificación opcional que comprende la cromatografía por exclusión de gel, de los alcaloides, utilizando un sistema tampón de citrato a un pH de 7, seguida por la extracción de los alcaloides diméricos del citrato acuoso con un disolvente inmiscible con el agua para producir bases alcaloidales.  
25 Ya sea que se emplee o no la etapa de filtración con gel, la siguiente etapa en el procedimiento requiere la precipitación de los alcaloides diméricos residuales como sales sulfato, en etanol u otro solvente adecuado, seguida por la purificación cromatográfica (preferiblemente a alta presión)  
30



1 de los alcaloides diméricos ya sea como bases libres o como  
sales sulfato.

5 Para llevar a cabo el procedimiento anterior, las  
hojas de las plantas que contienen alcaloides de vinca cru-  
dos tales como *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*) se extraen  
a un pH  $\approx 3$  utilizando ácido sulfúrico para mantener la aci-  
dez deseada. El disolvente inmiscible con el agua comúnmen-  
te utilizado para extraer la capa acuosa ácida es benceno,  
aunque pueden utilizarse otros disolventes orgánicos inmis-  
cibles con el agua tales como tolueno y similares. Después  
10 de que el pH del extracto acuoso ácido se ha ajustado a apro-  
ximadamente 6 mediante la adición de hidróxido de sodio, hi-  
dróxido de amonio u otra base, los alcaloides diméricos se  
extraen en un disolvente orgánico. El disolvente de re-ex-  
15 tracción es usualmente benceno, aunque nuevamente, pueden -  
emplearse otros disolventes orgánicos inmiscibles con el -  
agua. La etapa de cromatografía por exclusión de gel opcio-  
nal, se lleva a cabo utilizando un gel de dextrano entrelaza-  
do (sephadex G-25 F) en un sistema de tampon de citrato. La  
20 fase móvil es un tampon de citrato de amonio 0,1 molar de un  
pH de 3,0, aunque, como será aparente para aquellos expertos  
en la técnica, pueden utilizarse otros sistemas de tampon a  
un pH de 3, intercambiabilmente con el tampon de citrato en  
el sistema de cromatografía de exclusión de gel. Se emplea  
25 una presión de aproximadamente  $1,05 \text{ kg/cm}^2$  durante la cromatografía de exclusión de gel. En este procedimiento se elu-  
ye primero la fracción de alcaloide dimérico que contiene -  
vincristina, vinblastina, des-n-metil-vinblastina, leurosi-  
na y vinrosidina. Los alcaloides diméricos se extraen del -  
30 tampon de pH=3, ajustando el pH de la solución acuosa a un



1      pH de 7,0 con hidróxido de amonio y poniendo en contacto -  
después la solución acuosa de un pH de 7 con un disolvente  
inmiscible con el agua, preferiblemente benceno nuevamente.  
La evaporación del benceno produce un residuo que puede disol  
5      verse en etanol y la leurosina cristalizarse directamente en  
el mismo. La leurosina se separa por decantación y el sobre-  
nadante así obtenido se acidifica a un pH de 4,2 con ácido  
sulfúrico etanólico al 3% para convertir los alcaloides di-  
10      méricos restantes a sus sales sulfato. Las sales de sulfa-  
to mixtas precipitadas se recogen y se convierten en las ba-  
ses alcaloidales libres correspondientes mediante procedi-  
mientos normales, como por ejemplo mediante disolución de -  
las sales en agua, ajustando el pH aproximadamente a 8,0 con  
15      hidróxido de amonio y extrayendo los alcaloides diméricos -  
con un disolvente orgánico inmiscible con el agua, preferi-  
blemente en este punto en el procedimiento el dicloruro de  
metileno. La evaporación del dicloruro de metileno produce  
los alcaloides diméricos mixtos, los cuales se cromatogra-  
fían después a una presión elevada sobre alúmina (actividad  
20      III) utilizando un sistema disolvente de acetato de metilo-  
dicloruro de metileno-agua (48:51:1) como eluyente.

Las presiones de operación empleadas han estado  
en la escala de 10,5-24,5 kg/cm<sup>2</sup>. Según se entenderá por -  
aquellos expertos en la técnica de la cromatografía a pre-  
25      sión elevada, se encuentra disponible el equipo para llevar  
a cabo procedimientos a 280-350 kg/cm<sup>2</sup> y parecen factibles -  
presiones en la escala de 525-560 kg/cm<sup>2</sup>. La separación al-  
caloidal es en general más eficiente a presiones más eleva-  
das. Los procedimientos de cromatografía a presión elevada  
30      se llevan a cabo en equipo de acero inoxidable equipado con



1 accesorios resistentes a la presión.

Los alcaloides se eluyen en el siguiente orden de este procedimiento cromatográfico: leurosina, vinblastina, des-N-metilvinblastina, vindristina y vinrosidina. La identificación del alcaloide dimérico en la fracción de eluyente, se lleva a cabo mediante procedimientos normales conocidos en el arte, tales como cromatografía en capa delgada. La recolección de fracciones que contienen vinblastina, des-N-metilvinblastina o vincristina seguidos por la evaporación del disolvente al vacío y conversión de la vinblastina, des-N-metilvinblastina o vincristina a la sal sulfato correspondiente a un pH de 4,2 con ácido sulfúrico etanólico, completa el procedimiento de separación y de purificación. A continuación se dan ejemplos específicos del procedimiento de esta invención.

Ejemplo 1

Purificación de Vincristina

Se extrajeron tres veces durante períodos de una hora, 10 kg. de hojas de Catharanthus roseus secas, utilizando 32 volúmenes de agua a 50°C. acidificada a un pH de 3,0, mediante la adición de ácido sulfúrico al 30% (p/v) como el medio de extracción. Los extractos acuosos se decantaron del material fibroso, se combinaron y se filtraron. El filtrado se extrajo dos veces con volúmenes iguales de benceno y los extractos de benceno se desecharon. El pH de filtrado se elevó después a un pH de 6,0 mediante la adición de hidróxido de amonio concentrado. La fase acuosa a un pH de 6,0 se extrajo tres veces con volúmenes iguales de benceno. Los extractos bencénicos se combinaron y se concentraron a vacío para producir un residuo de 57 g, de mezcla de alcaloides.



1 cruda (VRA).

5 g. de VRA así obtenida se disolvieron en 250 ml de tampon de citrato de amonio 0,1 molar, de un pH de - 3,0, y el filtrado resultante se cromatografió sobre 600 g. de gel de dextrano entrelazado (sephadex G-25 F) en una columna de vidrio de 5 x 140 cm. Se utilizó tampon de citrato de amonio 0,1 molar (pH = 3,0) como la fase móvil. La columna se reveló bajo una presión superior de 1,05 kg/cm<sup>2</sup> dando un régimen de flujo de efluente en la escala de 10-14 ml. por minuto. Se recogieron las fracciones y se identificaron como conteniendo predominantemente alcaloides monoméricos o diméricos mediante cromatografía en capa delgada. Aquellas fracciones que contienen los alcaloides diméricos se eluyeron primero, e incluyeron, mediante cromatografía en capa delgada vinblastina, vincristina, leurosina y vinrosidina. Las fracciones acuosas que contienen predominantemente estos alcaloides diméricos se combinaron, el pH se ajustó a 7,0 con hidróxido de amonio, y la solución acuosa neutra resultante se extrajo después tres veces con la mitad de su volumen de benceno. Los extractos bencénicos se combinaron y se filtraron a través de sulfato de sodio anhidro. La concentración del filtrado a sequedad al vacío produjo 1,0 g. de mezcla alcaloide dimérica. La mezcla se disolvió en 7,5 volúmenes de etanol anhidro. La leurosina cristalizó en este momento y se separó mediante centrifugación; rendimiento = 157 mg. de leurosina. El sobrenadante se ajustó a un pH de 4,2 con ácido sulfúrico etanólico al 3%. Los sulfatos de los alcaloides diméricos restantes se formaron inmediatamente como agujas, y la cristalización se dejó continuar durante dos días. Los cristales se separaron mediante centrifugación, se lavaron



1974

1 con etanol y se secaron. Se obtuvieron, un rendimiento de  
241 mg. de sales sulfato mixtas de vinblastina y vincristi  
na, más una pequeña cantidad de sulfato de leurosina. Las  
sales se convirtieron en las bases libres correspondientes,  
5 disolviendo las sales en agua, ajustando el pH de la solu-  
ción acuosa a 8,0 con hidróxido de amonio 14 normal, y ex-  
trayendo después las bases insolubles en agua en cloruro de  
metileno. Se filtró el extracto de cloruro de metileno y el  
disolvente se separó mediante evaporación a vacío. El resi-  
10 duo resultante se cromatografió sobre 400 g. de alúmina (Ac-  
tividad III, 200 m<sup>2</sup>/g), utilizando un sistema disolvente de  
acetato de metilo-cloruro de metileno-agua (48:51:1) como -  
el eluyente. La cromatografía se llevó a cabo en una colum-  
na de acero inoxidable de 8 mm. por 7 metros a una presión  
15 de 17,5 - 22,7 kg/cm<sup>2</sup>. La relación de alúmina a carga fue  
de aproximadamente 2000/l. El eluato se revisó a 254 milimi-  
cras, y las fracciones se separaron con base en los máximos  
observados en el perfil ultravioleta. Se identificaron frac-  
ciones que contienen predominantemente leurosina, vinblasti-  
na, des-N-metilvinblastina y vincristina, mediante cromato-  
20 grafía en capa delgada. La concentración a sequedad de las  
facciones combinadas que contienen vincristina, produjo -  
18,7 mg. de alcaloides. El residuo se disolvió en 20 volú-  
menes de etanol anhidro, se separaron los insolubles median-  
25 te centrifugación y el pH del sobrenadante se ajustó a 4,2  
con ácido sulfúrico etanólico al 3% formando de esta manera  
sulfato de vincristina. La mezcla de cristalización se dejó  
reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. El sulfato  
de vincristina se separó después mediante centrifugación y  
30 el centrifugado se lavó con etanol y se secó al vacío. El -



1 peso de la vincristina así obtenida fue de 12,3 mg. (equiva-  
lente a 14,1 mg/kg de hoja extraída). Las propiedades del -  
sulfato de vincristina así obtenido fueron idénticas a aque-  
llas registradas en la literatura.

5 Alternativamente, se disolvieron 10 g. de VRA en  
5 volúmenes de etanol anhidro. El pH de la solución se ajustó  
a 4,2 mediante la adición de ácido sulfúrico etanólico al  
3%. La mezcla de sulfato se sembró a sulfato de vinblastina.  
La mezcla de cristalización se dejó reposar durante 48 ho-  
10 ras, y la mezcla de sulfato de alcaloide dimérico se cose-  
chó mediante centrifugación. El procesado como en el proce-  
dimiento anterior, seguido por la etapa de cromatografía de  
exclusión de gel con cromatografía sobre alúmina desactiva-  
da, a una presión elevada, produjo 20,6 mg. de sulfato de  
15 vincristina equivalente a 11,8 mg/kg de hoja extraída.

La vinblastina, la leurosina, la vinrosidina, la  
des-N-metilvinblastina y otros alcaloides diméricos, se ob-  
tienen en una forma similar, ya sea como la base libre o co-  
mo la sal sulfato, de las fracciones de eluato ricas en el  
20 alcaloide particular obtenido durante la cromatografía a pre-  
sión elevada sobre alúmina desactivada.

#### Ejemplo 2

#### Purificación de Vinblastina

25 Se combinaron fracciones del procedimiento cromatográfico a presión elevada, con alúmina, del ejemplo 1, que se identificaron conteniendo predominantemente vinblastina, mediante cromatografía en capa delgada, y las fracciones combinadas se concentraron a sequedad a vacío. Los alcaloides diméricos residuales resultantes que consisten esencialmente de vinblastina y algo de leurosina residual se disolvie-

30



1 ron en una mezcla disolvente de metanol-etanol. La leurosina  
na es insoluble en esta mezcla y precipita. Después de la -  
separación de la leurosina mediante centrifugación se decan  
5 tó el sobrenadante que contiene vinblastina. El pH de la so  
lución se ajustó a la escala de pH = 4-5 mediante la adición  
de ácido sulfúrico etanólico, convirtiendo la vinblastina y  
otros alcaloides presentes, a las sales sulfato correspon-  
dientes. Las sales sulfato se recogieron, el filtrado se de  
10 sechó y después los sulfatos se reconvirtieron a sus bases  
libres respectivas en la forma usual. La recromatografía de  
las bases libres sobre alúmina (actividad III en una rela-  
ción en peso de alúmina a carga de 60:1 utilizando benceno-  
cloroformo como la fase móvil, produjo fracciones que contie  
15 nen vinblastina (según se identifica mediante la cromatogra-  
fía en capa delgada) y no otros alcaloides diméricos. Las -  
fracciones que contienen vinblastina se combinaron y el di-  
solvente se separó de las mismas, a vacío. La recristaliza-  
ción de la vinblastina residual en metanol produjo vinblas-  
tina purificada que a su vez se disolvió en etanol y se con  
20 virtió a la sal sulfato correspondiente mediante tratamien-  
to con ácido sulfúrico etanólico. El sulfato de vinblastina  
así preparado fue un material de mancha individual mediante  
cromatografía en capa delgada.

25 Ejemplo 3

Conversión de Des-N-metilvinblastina-Vincristina

Se procesaron 270 kg. de hojas de Catharanthus  
roseus secas, de conformidad con el procedimiento del ejem-  
plo 1. Las fracciones que se identificaron como conteniendo  
des-N-metilvinblastina mediante cromatografía en capa delga  
30 da se separaron en la etapa de cromatografía de líquidos, de



1 presión elevada y se concentraron bajo vacío a sequedad. Utilizando el método descrito en la Patente de los Estados Unidos 3,354,163 de Gorman, se convirtieron 7,73 g. de des-N-metilvinblastina cruda así obtenida a vincristina, a temperatura ambiente, mediante la adición a una solución que contiene 927 ml. de ácido fórmico al 98% y 154 ml. de anhídrido acético. Después de que se complete la reacción, según se confirmó mediante cromatografía en capa delgada, la mezcla de reacción se concentró bajo vacío a un jarabe. El concentrado se disolvió en 100 volúmenes de agua y los alcaloides se convirtieron a sus bases libres mediante extracción de la solución acuosa a un pH de 5,8 tres veces, con cloruro de metileno. La concentración de los extractos de cloruro de metileno combinados, bajo vacío, produjeron y 7,84 g. de base libre de vincristina. La base libre se purificó adicionalmente mediante cromatografía de líquido, a presión elevada (14-21 kg/cm<sup>2</sup>) en una columna de acero inoxidable de 2,5 cm. por 730 cm. utilizando 3200 g. de absorbente de alúmina neutra de actividad III-IV y acetato de etilo cloruro de metileno-agua (25:75:0.4), como fase móvil. La vincristina obtenida después de concentración a sequedad de las fracciones identificadas como conteniendo predominantemente vincristina, ascendió a 2,64 g. Este material se cristalizó dos veces en etanol, se recromatografió utilizando una fase móvil de acetato de metilo-cloruro de metileno-agua (48:51:1), cristalizó en metanol y se convirtió en sulfato en etanol para producir 1,4 g. de sulfato de vincristina (equivalente a 5,3 - mg. por kg. de hoja extraída).

30 En resumen, la patente de invención que se solicita recaerá sobre las siguientes:



1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar los alcaloides de indol-diméricos -vincristina, des-N-metilvinblastina y vinblastina - caracterizado por las siguientes etapas:

5

a) extraer una fuente de planta de dichos alcaloides con ácido;

b) elevar el pH de la solución ácida de la etapa a) y extraer los alcaloides diméricos en un disolvente orgánico inmiscible con el agua;

10

c) someter opcionalmente los alcaloides diméricos extraídos de la etapa b) a cromatografía de exclusión de gel;

d) disolver los alcaloides diméricos extraídos de la etapa b) o de la etapa c) en un alcohol inferior;

15

e) separar opcionalmente cualesquiera alcaloides precipitados de la solución alcohólica de la etapa d);

f) convertir los alcaloides de la etapa d) o de la etapa e) a las sales sulfato y aislar las sales sulfato del alcaloide, precipitadas;

20

g) convertir opcionalmente las sales sulfato aisladas a las bases libres correspondientes;

h) someter las sales sulfato del alcaloide de la etapa f) o las bases libres del alcaloide de la etapa g) a cromatografía a presión elevada sobre alúmina; y

25

i) recoger las fracciones cromatográficas que contienen vincristina, des-N-metilvinblastina y vinblastina separadas, purificadas, substancialmente exentos de otros alcaloides de la vinca diméricos y exentos de uno hacia otro.

30

2. El procedimiento de la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de extracción a) se logra extrayen-



1974

1 do dicha fuente de planta de dichos alcaloides con ácido -  
acuoso a un pH  $\approx 3$ , extraer la solución ácida así obtenida  
con un disolvente orgánico inmiscible con el agua y separar  
la capa acuosa-ácida de la capa orgánica.

5 3. El procedimiento de la reivindicación 2, ca-  
racterizado porque dicha fuente de plantas de dichos alca-  
loides son hojas de vinca.

10 4. El procedimiento de cualquiera de las reivin-  
dicaciones 1 a 3, caracterizado porque la elevación del pH  
y la etapa de extracción b) se logran mediante el ajuste -  
del pH de la solución ácida a un pH  $\approx 6$  mediante la adición  
de base, extrayendo la capa de un pH  $\approx 6$  con un disolvente  
orgánico inmiscible con el agua, desechando la capa acuosa  
y separando y evaporando el disolvente del extracto orgáni-  
co.

15 5. El procedimiento de la reivindicación 4, ca-  
racterizado porque el disolvente orgánico inmiscible con el  
agua es el benceno.

20 6. El procedimiento de cualquiera de las reivin-  
dicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa de cromato-  
grafía c) se logra sometiendo los alcaloides extraídos a cro-  
matografía de exclusión de gel en un tampon acuoso de un pH  
= 7, extrayendo los alcaloides de indol diméricos de las frac-  
ciones de eluato de tampon acuoso que se determina que los  
25 contienen, mediante procedimientos analíticos normales, con  
un disolvente orgánico inmiscible con el agua, separando los  
extractos y evaporando de los mismos, el disolvente de ex-  
tracción.

30 7. El procedimiento de cualquiera de las reivin-  
dicaciones 1 a 6, caracterizado porque la etapa de conver-



1974

1      sión f) se logra ajustando el pH del filtrado a un pH  $\approx$  4,2  
mediante la adición de ácido sulfúrico etanólico y separando las sales de sulfato de alcaloide de indol diméricas, -  
cristalinas, precipitadas, así formadas.

5                      8. Se reivindica por último como objeto sobre  
el que ha de recaer la patente de invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR LOS ALCALOIDES DE INDOL-  
DIMERICOS - VINCRISTINA, DES-N-METILVINBLASTINA Y VINBLASTI-  
NA.

10                    Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente memoria descriptiva que consta de quince páginas me-  
canografiadas.

Madrid, 24 de Octubre de 1.974

BERNARDO UNGRIA  
P.P.

15

20

25

*pg*

30