



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 752**

51 Int. Cl.:
C07J 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06807177 .8**

96 Fecha de presentación : **12.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1937707**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **Procedimiento mejorado para la obtención de ácido betulínico.**

30 Prioridad: **12.10.2005 EP 05109482**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.05.2011

73 Titular/es: **BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA
GmbH & Co. KG.
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim, DE**

72 Inventor/es: **Puder, Carsten H.;
Graef, Herbert;
Thumerer, Markus J. y
Heitzmann, Markus**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

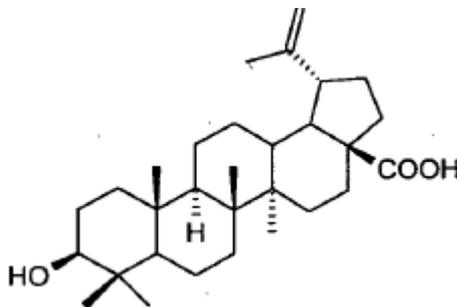
ES 2 358 752 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La invención se refiere a un procedimiento en gran escala para obtener ácido betulínico de gran pureza a partir de corteza de plátano molida. El ácido betulínico es ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28 de la fórmula:



Se sabe que el ácido betulínico presenta una acción contra el desarrollo de células de melanoma (por ejemplo, Pisha et al., Nature Medicine, 1, 1995, 1046 y sigs.) así como contra otras células cancerosas (por ejemplo Sunder et al., Patente de los EE.UU. de América Nº 6,048,847). Además, sus derivados deberían poder utilizarse contra el VIH (por ejemplo Evers et al., J. Med. Chem. 39, 1996, 1056 y sigs.; Soler et al., J. Med.Chem. 39, 1996 y sigs., o Butler, Nat. Prod. Rep., 2005, 22, 162 y sigs. Por lo tanto existe una gran necesidad de ácido betulínico.

Además de su preparación sintética (por ejemplo L. Ruzicka et al., Helv. Chim. Acta, 21, 1938, 1076 y sigs.) es posible obtener ácido betulínico de diversas plantas, en especial árboles, así por ejemplo de la corteza de *Picramnia pentandra* (por ejemplo Herz et al., Phytochemistry 11, 1972, 3061 y sigs.), de la corteza de *Arbustis menziesii* (Robinson et al., Phytochemistry 9, 1970, 907 y sigs.), y de la corteza de *Ziziphus mauritania* (por ejemplo, Pisha et al., Nature Medicine 1, 1995, 1046 y sigs).

A partir de estos materiales de partida es posible aislar el ácido betulínico sólo con dificultad. En cambio, parece tener más perspectivas su obtención de la corteza y/o capa externa del plátano. En el documento DE 197 13 768 se propone un procedimiento para obtener ácido betulínico, en el que se somete a extracción un polvo obtenido de la capa exterior de plátano, mediante un solvente de polaridad media como por ejemplo diclorometano, cloroformo o éter dietílico.

Sin embargo, este procedimiento no es adecuado para una obtención industrial de grandes cantidades de ácido betulínico, ya que deben emplearse volúmenes muy grandes de solvente de polaridad media a efectos de extraer el ácido betulínico (es necesario utilizar 7 litros de diclorometano para procesar 150 g de capa externa de plátano en polvo). Además, una extracción efectuada en una columna de vidrio bajo elevada presión hidrostática no es adecuada para obtener grandes cantidades, y es problemática desde el punto de vista de la seguridad.

Bruckner et al., J. Chem.Soc. 1948, 948-951 describen un procedimiento para la obtención de ácido betulínico de capa externa de plátano, en el que las capas externas molidas se someten a extracción con metanol, se reúne el extracto obtenido y se recristaliza el concentrado en presencia de carbón varias veces a partir de metanol. Sin embargo, el ácido betulínico obtenido de esta manera presenta todavía una pluralidad de impurezas.

En el documento WO 03/066659 se revela un procedimiento para la obtención de ácido betulínico a partir de un extracto metanólico de corteza de plátano molida. El rendimiento en forma bruta es del 2,3 % referido a la corteza de plátano utilizada, pero no presenta la pureza deseada, a pesar de que se realiza un paso de purificación adicional que abarca la agitación del extracto con n-hexano.

Por ello el objetivo de la presente invención es el de poner a disposición un procedimiento mejorado para obtener ácido betulínico a partir de corteza de plátano, que también sea adecuado para su empleo en gran escala técnica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha descubierto ahora de manera sorprendente que es posible elevar manifiestamente la producción mediante el procedimiento conforme a la invención. Por otra parte, por el hecho de evitarse el empleo de material de cromatografía es posible mantener reducida la cantidad de desechos.

En correspondencia a ello, la presente invención se basa en un procedimiento mejorado para la obtención de ácido betulínico de alta pureza sometiendo a extracción corteza de plátano y/o capa externa

de plátano, molidas, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo con una mezcla de solventes consistente en toluol y uno o varios alcoholes C₁₋₆.

Se prefiere especialmente una mezcla de solventes consistente en toluol y metanol, etanol, *n*-propanol, 2-propanol, *n*-butanol, *t*-butanol, *n*-pentanol, (+)-2-pentanol o 3-pentanol.

5 Una mezcla de solventes preferida consiste en toluol y dos alcoholes seleccionados del grupo consistente en metanol, etanol, *n*-propanol, 2-propanol, *n*-butanol, *t*-butanol, *n*-pentanol, (+)-2-pentanol o 3-pentanol. Se prefiere especialmente que la mezcla de solventes consista en toluol, metanol y un
10 segundo alcohol (etanol, *n*-propanol, 2-propanol, *n*-butanol, *t*-butanol, *n*-pentanol, (+)-2-pentanol o 3-pentanol), de manera especialmente preferida toluol, metanol y (+)-2-pentanol. Gracias al procedimiento de la invención es posible recuperar muy bien la mezcla de solventes empleada, por lo que la pérdida de solvente durante el proceso del reciclado es reducida, y a tal efecto ha demostrado ser adecuado toluol en una relación con respecto a los alcoholes anteriormente mencionados entre 80:20 y 95:5.

15 Se prefiere especialmente el procedimiento arriba descrito en el que antes de la extracción se humedece la corteza de plátano con agua. Por otra parte esto puede mejorar la trabajabilidad de la corteza de plátano y por otra parte reducir la carga de polvo en el medio ambiente.

El procedimiento recién descrito puede llevarse a cabo de manera continua o como procedimiento discontinuo (de a lotes); se prefiere el procedimiento mencionado arriba en el que la extracción tiene lugar de manera continua.

20 Es preferible que el procedimiento se lleve a cabo la manera continua teniendo la mezcla de solventes un caudal o gasto de 0,2 m³/h a 6 m³/h dentro de un intervalo de tiempo de 2 h a 48 h, preferiblemente de 5 h a 35 h, en especial de 15 h a 25 h. Para ello pueden emplearse instalaciones de extracción de tipo batería de magnitudes y tipos constructivos diversos. Las cantidades diarias promedias de corteza de plátano en polvo para la extracción puede variar entre 500 kilos y 8 toneladas.

25 Se prefiere especialmente el procedimiento mencionado arriba en el que la extracción tiene lugar a una temperatura del 20 a 110 °C, preferiblemente de 40 a 90 °C, de manera especialmente preferida de 50 a 70 °C.

Para obtener el ácido betulínico a partir del extracto bruto se acoplan otros pasos más al procedimiento. Conforme al procedimiento de la invención se llevan a cabo los siguientes pasos consecutivos para aislar el ácido betulínico:

- 30 a) extracción a partir de corteza de plátano en una mezcla de solventes como se define en lo que precede;
- b) remoción de la mezcla de solventes del extracto;
- c) disolución del residuo en un solvente adecuado;
- d) separación del ácido betulínico del material filtrado.

35 Como solvente adecuado en el paso c) se recurre a mezclas de C₁₋₄-cloroalcanos o a ésteres de ácido acético y C₁₋₄-alcoholes. Los cloroalcanos preferidos son diclorometano y cloroformo, los ésteres de ácido acético preferidos son metil éster de ácido acético, metil éster de ácido acético, éster 2-propílico de ácido acético, y los alcoholes preferidos son metanol, etanol y 2-propanol. Se prefiere especialmente una
40 mezcla de diclorometano y metanol en relaciones de 5:1 a 1:2, preferiblemente 3:1 a 1:1, de manera especialmente preferida 2:1 a 1,5:1. En este caso se aplica una cantidad adecuada de solvente o de mezcla de solventes, referida al residuo sólido, Se prefiere una relación de 5 a 30 litros, de manera especialmente preferida de 16 a 20 litros por kilogramo de material sólido. En este caso, la separación del ácido betulínico tiene preferentemente lugar por enfriamiento lento del material filtrado a de -15 a 10 °C, preferiblemente de -10 a 10 °C, de manera especialmente preferible de 0 a 10 °C, dentro de un intervalo
45 de tiempo de 5 a 50 h, preferiblemente de 5 a 20 h, de manera especialmente preferida de 10 a 15 h. Seguidamente es posible separar el ácido betulínico purificado en forma de material sólido mediante procedimientos conocidos de la técnica (filtrado de vacío, centrifugadora, decantador, filtro de presión, secador de filtro, etc.) de la lejía madre, y secárselo. Al respecto, en todos los casos el ácido betulínico así purificado puede todavía contener hasta 10% de solvente.

50 Mediante un segundo paso intermedio es posible aumentar manifiestamente la pureza del ácido betulínico y simplificar la elaboración ulterior. Se prefiere el procedimiento mencionado arriba en el que entre los pasos b) y c) se llevan a cabo los pasos siguientes:

- b1) suspender y disolver el residuo en propanol, butanol o una mezcla de los mismos;
- b2) mezclar con una masa de filtro o de absorción;

b3) filtrar la suspensión; y

b4) separar el ácido betulínico bruto del extracto filtrado.

5 Los pasos b1) a b4) pueden eventualmente llevarse a cabo una sola vez o varias veces. Es preferible que la suspensión en el paso b1) tenga lugar en propanol, en especial en 2-propanol. En este caso puede emplearse el solvente con un volumen de 10 a 50 litros, preferiblemente de 15 a 25 litros, de manera especialmente preferida de 17 a 19 litros por kilogramo del extracto libre de solvente. Es preferible que se reúna el material filtrado del paso b3) antes de la separación en el paso b4), de manera especialmente preferida hasta una dilución de 1:12 a 1:36, hasta obtener el material sólido a formarse o bien previsto. En este caso la separación tiene preferiblemente lugar mediante enfriamiento lento del material filtrado a de -15 a 15 °C, preferiblemente de menos -5 a 15 °C, de manera especialmente preferida de 5 a 15 °C, en un intervalo de tiempo de 5 a 50 h, preferiblemente de 5 a 20 h, de manera especialmente preferible de 10 a 15 h. Seguidamente es posible separar de la leña madre el ácido betulínico bruto en forma sólida mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica (filtro de vacío, centrifugador, decantador, filtro bajo presión, secador de filtro, etc.), y secárselo. En todos los casos, el ácido betulínico bruto así obtenido puede todavía contener hasta 15% de solvente.

Es preferible que la masa de filtro o de absorción arriba descrita consista en carbón activado y/o tierra de infusorios.

20 En este caso pueden emplearse cantidades variables de masa de filtro o de absorción. La persona experta está familiarizada con las cantidades convenientes a ser utilizadas como masa de filtro o de absorción en un paso de purificación.

NOCIONES Y DEFINICIONES

La noción "ácido betulínico", tal como se utiliza en lo que precede y en lo que sigue, abarca tanto ácido betulínico como sus hidratos y solvatos, preferentemente ácido betulínico que ha sido solvatado con de 0,5 a 2 equivalentes de un solvente.

25 Dentro de los alcances de la invención son adecuadas todas las especies de la familia Platanus. Como plátanos especialmente adecuados han demostrado ser útiles los plátanos americanos u occidentales (*Platanus occidentalis*), los plátanos de levante u orientales (*Platanus orientalis*), los plátanos de Kerr (*Platanus kerrii*), los plátanos mejicanos (*Platanus mexicana*), los plátanos californianos (*Platanus racemosa*) y los plátanos de Arizona (*Platanus wrightii*). Pero también las subespecies de plátanos así como híbridos derivados de especies o bien subespecies como por ejemplo los plátanos de hojas de arce, comunes o bastardos (*Platanus x hispanica / acerifolia*) (híbrido de *P. occidentalis* y *P. orientalis*), son adecuadas como material de partida para la obtención de ácido betulínico.

35 Por el concepto de "C₁₋₄ alcohol" se entienden alcoholes ramificados y sin ramificar con 1 a 4 átomos de carbono y uno o dos grupos hidroxilo. A título de ejemplos se mencionan: metanol, etanol, *n*-propanol, 2-propanol, *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol o *ter*-butanol. Eventualmente, para las moléculas anteriormente mencionadas también se utilizan las abreviaturas MeOH, EtOH, *n*-PrOH, 2-PrOH, *n*-BuOH, *i*-NuOH, *t*-BuOH, etc. A menos que se afirme otra cosa, las definiciones propanol y butanol abarcan todas las formas isómeras concebibles de los radicales correspondientes. Así por ejemplo propanol abarca *n*-propanol y 2-propanol, butanol abarca *iso*-butanol, *sec*-butanol y *ter*-butanol, etc.

40 Por el concepto "C₁₋₄-cloroalcanos" se entienden alcanos ramificados y sin ramificar con 1 a 4 átomos de carbono, en los que uno o varios átomos de cloro están sustituidos. A título de ejemplo se mencionan diclorometano y cloroformo.

EJEMPLO

1A- PREPARACIÓN DE EXTRACTO DE CORTEZA DE PLÁTANO

45 Para la extracción de corteza de plátano en gran escala técnica se emplea una instalación de extracción consistente en tres extractores, un colector de destilado puro, y un vaporizador. Para la alimentación completa de la instalación, en una mezcladora se mezclan por cada extractor 650 kg de corteza de plátano en polvo con 260 litros de agua, y por medio de una cinta transportadora se introducen en el extractor correspondiente. Cada extractor individual se rellena seguidamente con 2,5 m³ de mezcla caliente de toluol/ (+ -)-2-pentanol/metanol (88:7:5). Con un caudal de 2 m³/h, y partiendo del colector de destilado puro, se bombea a través de los tres extractores conectados en serie la mezcla de toluol/ (+ -)-2-pentanol/metanol calentada a 60 °C. Por hora se introducen también desde el sistema 2 m³ de extracto en el vaporizador y allí se reconcentra por separación destilativa de la mezcla de solventes.

55 Mediante un separador de fases el material destilado que se forma se libera del agua separada por destilación, y seguidamente se analiza la fase orgánica mediante cromatografía de gases. En caso necesario se restablece la composición de la fase orgánica mediante adición de metanol o bien de (+-)-2-pentanol, frescos, a 88:7:5 para toluol/(+-)-2-pentanol/metanol. La mezcla de toluol/(+-)-2-

5 pentanol/metanol así reciclada se introduce en el colector de destilado puro y se temple a 60°C. Después de 20 h se interrumpe el proceso de la extracción. La cantidad residual del extracto contenida en los extractores se retira por bombeo y también se reúne en el vaporizador. La cantidad completa de extracto formado se reconcentra hasta un volumen de 1.300 litros. El contenido del extracto total, determinado mediante determinación del residuo, es de 61 g/l.

1B- OBTENCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO BRUTO

10 1.300 litros del extracto obtenido según el Ejemplo 1A se bombean desde el vaporizador a un conjunto de aparatos de destilación, se evaporan allí hasta sequedad, y se suspende el residuo en 560 litros de 2-propanol. Se evapora nuevamente hasta sequedad, y seguidamente se calienta el residuo de la destilación con 1.430 litros de 2-propanol bajo reflujo y presión normal durante 30 minutos. Se mezcla la suspensión con 11 kg de tierra de infusorios y 24 kg de carbón activado, se filtra en caliente en un filtro de presión en un cristizador, y se enjuaga el conjunto de aparatos de destilación y el filtro de presión con 20 litros de 2-propanol. De la solución 2-propanólica se retiran por destilación 240 litros de 2-propanol, y seguidamente se deja enfriar el contenido del cristizador durante la noche a 10 °C. La suspensión así originada se separa por aspiración mediante un filtro de vacío, se lava el material sólido con 48 litros de 2-propanol y seguidamente se seca a 55 °C en el armario de secado por vacío. Es posible recuperar el 2-propanol por destilación.

15 Se obtiene 43,4 kg de ácido betulínico bruto. Punto de fusión 309-310 °C; contenido de ácido betulínico (HPLC-UV): 83,9 %; contenido de 2-propanol (¹H RMN); 10,5 %.

20 1B- OBTENCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO PURO

25 Se calientan bajo reflujo 43,4 kg de ácido betulínico bruto obtenido de acuerdo con el Ejemplo 1B en un conjunto de aparatos de destilación junto con 930 l de diclorometano y 325 l de metanol, y se disuelven. Se deja enfriar a 30°C y se añade una suspensión de 22 kg de carbón activado y 11 kg de tierra de infusorios en 65 litros de metanol. El contenido del aparato se calienta nuevamente hasta ebullición, se filtra en caliente sobre un filtro de presión en un cristizador y se enjuaga el conjunto de aparatos de destilación y filtro de presión con 50 ml de diclorometano. Del material filtrado se retiran por destilación 630 litros bajo presión normal, y seguidamente se enfría el contenido del aparato durante la noche a 5 °C. El material sólido así obtenido se separa mediante un centrifugador, se rocía con 44 litros de metanol a 5 °C y seguidamente se seca a 50°C en un armario de secado bajo vacío. Se obtiene 28,9

30 de ácido betulínico en estado puro. Punto de fusión 308 – 310 °C; contenido de ácido betulínico (HPLC-UV), 93,8 %; contenido de diclorometano (¹H RMN): 2,1 %; contenido de metanol (¹H RMN): 2,3 %.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la obtención de ácido betulínico de elevada pureza mediante extracción a partir de corteza y/o capa externa de plátano, molidas, caracterizado porque se llevan a cabo los siguientes pasos consecutivos para aislar el ácido betulínico:

- 5 a) extracción a partir de corteza de plátano en una mezcla de solventes consistente en toluol y uno o varios C₁₋₄-alcoholes con una relación entre toluol y los alcoholes mencionados entre 80:20 y 95:5;
- b) remoción de la mezcla de solventes del extracto;
- c) disolución del residuo en un solvente adecuado;
- d) separación de ácido betulínico del material filtrado.
- 10 2.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1, caracterizado porque antes de la extracción se humedece la corteza de plátano con agua.
- 3.- Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque se efectúa la extracción de manera continua.
- 15 4.- Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se efectúa la extracción a una temperatura de 20 a 110 °C.
- 5.- Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque entre los pasos b) y c) se llevan a cabo los pasos siguientes:
- b1) suspender y disolver el residuo en propanol, butanol o una mezcla de los mismos;
- b2) mezclar con una masa de filtro o de absorción;
- 20 b3) filtrar la suspensión;
- b4) separar el ácido betulínico bruto del extracto filtrado.
- 6.- Procedimiento conforme a la reivindicación 5, caracterizado porque la masa de filtro o absorción consiste en carbón activado o en tierra de infusorios.