



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 143**

51 Int. Cl.:
C07D 239/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04812772 .4**

96 Fecha de presentación : **02.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1689723**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54 Título: **Estándar de referencia para caracterización de rosuvastatina.**

30 Prioridad: **02.12.2003 US 526449 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.08.2011

73 Titular/es:
TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES Ltd.
5 Basel Street, P.O. Box 3190
49131 Petah Tiqva, IL

72 Inventor/es: **Finkelstein, Nina**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 364 143 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

Estándar de referencia para caracterización de rosuvastatina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a productos de degradación de rosuvastatina y a su uso como estándar de referencia para el análisis de rosuvastatina.

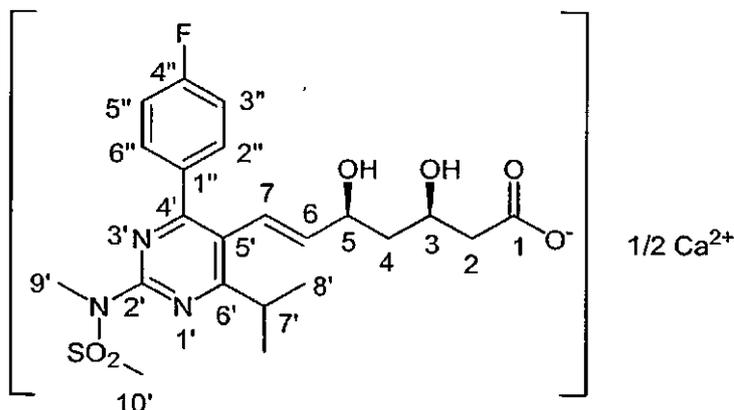
Antecedentes de la invención

10 Las estatinas son actualmente los fármacos terapéuticamente más efectivos disponibles para reducir la concentración de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), en el torrente circulatorio de pacientes con riesgo de enfermedad cardiovascular. Por tanto, las estatinas se usan en el tratamiento de hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia y aterosclerosis. Se ha relacionado un nivel alto de LDL en el torrente circulatorio a la formación de lesiones coronarias que obstruyen el flujo de sangre y que se pueden romper y provocar trombosis. Goodman y Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, página 879 (9ª Ed. 1996).

15 Las estatinas inhiben la biosíntesis del colesterol en seres humanos inhibiendo de forma competitiva la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A ("HMG-CoA") reductasa. La HMG-CoA reductasa cataliza la conversión de HMG a mevalonato, que es la etapa determinante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol. La disminución en la producción de colesterol provoca un incremento en el número de receptores de LDL y la correspondiente reducción en la concentración de partículas de LDL en el torrente sanguíneo. La reducción en el nivel de LDL en el torrente sanguíneo reduce el riesgo de arteriopatía coronaria. J.A.M.A. 1984, 251, 351-74.

20 Las estatinas actualmente disponibles incluyen lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, cerivastatina y atorvastatina. La lovastatina (dada a conocer en la patente de los Estados Unidos N.º 4.231.938) y la simvastatina (dada a conocer en la patente de los Estados Unidos N.º 4.444.784) se administran en forma de lactona. Después de la absorción, el anillo de lactona se abre en el hígado mediante hidrólisis química o enzimática, y se genera el hidroxilácido activo. La pravastatina (dada a conocer en la patente de los Estados Unidos N.º 4.346.227) se administra como la sal de sodio. La fluvastatina (dada a conocer en la patente de los Estados Unidos N.º 4.739.073) y la cerivastatina (dada a conocer en la patente de los Estados Unidos Nos. 5.006.530 y 5.177.080), también administradas como la sal de sodio, son compuestos completamente sintéticos que son en parte estructuralmente distintos de los derivados fúngicos de esta clase que contienen un anillo hexahidronaftaleno. La atorvastatina y dos nuevas "superestatinas", rosuvastatina y pitavastatina, se administran como sales de calcio.

30 La rosuvastatina de calcio (bis (+) 7-[4-(4-fluorofenil)-6-isopropil-2-(N-metil-N-metilsulfonilaminopirimidin)-5-il]-(3R, 5S)-dihidroxi-(E)-6-heptenoato monocálcico) es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, desarrollado por Shionogi para el tratamiento oral una vez al día de la hiperlipidemia (Ann Rep, Shionogi, 1996; Direct communications, Shionogi, 8 de febrero de 1999 y 25 de febrero de 2000). La rosuvastatina cálcica es una superestatina, que puede disminuir el colesterol-LDL y los triglicéridos de forma más efectiva que los fármacos de primera generación. La rosuvastatina cálcica tiene la siguiente fórmula química:



35 La rosuvastatina cálcica se comercializa bajo el nombre CRESTOR para el tratamiento de un mamífero tal como un ser humano. De acuerdo con el fabricante de CRESTOR, se administra en una dosis diaria de desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 40 mg. Para pacientes que requieren reducciones menos agresivas de LDL-C o que tengan factores de predisposición para la miopatía, se recomienda la dosis de 5 mg, mientras que se recomienda la dosis de 10 mg para el paciente promedio, dosis de 20 mg para pacientes con hipercolesterolemia y objetivos lipídicos agresivos (> 190 mg/dl), y la dosis de 40 mg para pacientes que no han respondido a dosis menores.

La patente de los Estados Unidos N.º 5.260.440 da a conocer y reivindica la rosuvastatina, su sal de calcio (2:1) y su forma de lactona. El procedimiento de la patente 440 prepara la rosuvastatina haciendo reaccionar 4-(4-fluorofenil)-6-isopropil-2-(N-metil-N-metilsulfonilamino)-5-pirimidincarbaldéhidó con (3R)-3-(terc-butildimetilsililo)-5-oxo-6-trifenilfosforanilidhexanato de metilo en acetonitrilo bajo reflujo. El grupo sililo se escinde entonces con fluoruro de hidrógeno, seguido de reducción con NaBH₄ y dietilmetoxiborano en THF para obtener un éster metílico de rosuvastatina.

El éster se hidroliza entonces con hidróxido de sodio en etanol a temperatura ambiente, seguido de la retirada de etanol y la adición de éter, para obtener la sal de sodio de rosuvastatina. La sal de sodio se convierte entonces en sal de calcio. La sal de sodio se disuelve en agua y se mantiene bajo una atmósfera de nitrógeno. El cloruro de calcio se añade entonces a la solución, dando como resultado la precipitación de rosuvastatina cálcica (2:1). El procedimiento para la preparación de intermedios dados a conocer en la patente 440 se incorpora en el presente documento por referencia.

La patente de los Estados Unidos N.º 6.316.460 da a conocer una composición farmacéutica de rosuvastatina. Las composiciones farmacéuticas contienen rosuvastatina o su sal y una sal de fosfato tribásica multivalente.

La mezcla de producto de una reacción raramente es un compuesto único suficientemente puro para cumplir con los estándares farmacéuticos. En la mayoría de los casos, estarán presentes productos secundarios y subproductos de la reacción y reactivos complementarios usados en la reacción. En determinadas fases durante el procesamiento de la rosuvastatina contenida en la mezcla de producto en un ingrediente farmacéuticamente activo ("IFA"), se debe analizar la rosuvastatina para determinar su pureza, normalmente por análisis de HPLC o de CG, para determinar si es adecuada para el procesamiento continuo o finalmente para su uso en un producto farmacéutico. No es necesario que la rosuvastatina sea absolutamente pura. La pureza absoluta es un ideal teórico que es inalcanzable. Más bien, hay estándares de pureza destinados a asegurar que un IFA no se fabrique menos seguro para su uso clínico debido a la presencia de impurezas. En los Estados Unidos, las directrices de la Administración para alimentos y fármacos recomendaron que los solicitantes limiten algunas impurezas por debajo del 0,1%.

En general, los productos secundarios, subproductos y reactivos complementarios (colectivamente "impurezas") se identifican espectroscópicamente y mediante otros procedimientos físicos y después las impurezas se asocian con una posición de pico en un cromatograma (o un punto sobre una placa de TLC). (Strobel p. 953) (Strobel, H.A.; Heineman, W.R., Chemical Instrumentación: A Systematic Approach, 3ª ed. (Wiley & Sons: Nueva York 1989)). Posteriormente, la impureza se puede identificar por su posición en el cromatograma, que se mide convencionalmente en minutos entre la inyección de la muestra en la columna y la elución del componente particular a través del detector, conocido como el "tiempo de retención". Este periodo de tiempo varía diariamente en base al estado de la instrumentación y a muchos otros factores. Para mitigar el efecto que tales variaciones tiene sobre la identificación cuidadosa de una impureza, los médicos usan el "tiempo de retención relativo" ("TRR") para identificar las impurezas. (Strobel p. 922). El TRR de una impureza es su tiempo de retención dividido por el tiempo de retención de algún marcador de referencia. En teoría, se puede usar la rosuvastatina por sí misma como marcador de referencia, pero como problema principal está presente en una proporción tan inmensa que tiende a saturar la columna, lo que conduce a tiempos de retención irreproducibles, es decir, el máximo del pico que corresponde a la rosuvastatina tiende a desviarse (Strobel, fig. 24.8 (b), p. 879, contiene una ilustración del tipo de pico asimétrico que se observa cuando se sobrecarga una columna). Por tanto, a veces es deseable seleccionar un compuesto alternativo que se añada a, o que esté presente en, la mezcla en una cantidad suficientemente significativa para detectarse y suficientemente baja como para no saturar la columna y para usar ese compuesto como el marcador de referencia.

Los investigadores y desarrolladores en la fabricación de fármacos entienden que un compuesto en un estado relativamente puro se puede usar como un "estándar de referencia" (un "marcador de referencia" es similar a un estándar de referencia, pero se usa para análisis cualitativo) para cuantificar la cantidad del compuesto en una mezcla desconocida. Cuando el compuesto se usa como un "estándar externo," se analiza una solución de una concentración conocida del compuesto por la misma técnica que la mezcla desconocida. (Strobel p. 924, Snyder p. 549) (Snyder, L.R.; Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2ª ed. (John Wiley & Sons: Nueva York 1979)). La cantidad del compuesto en la mezcla se puede determinar comparando la magnitud de la respuesta del detector. Véase también el documento USP 6.333.198, incorporado en el presente documento por referencia.

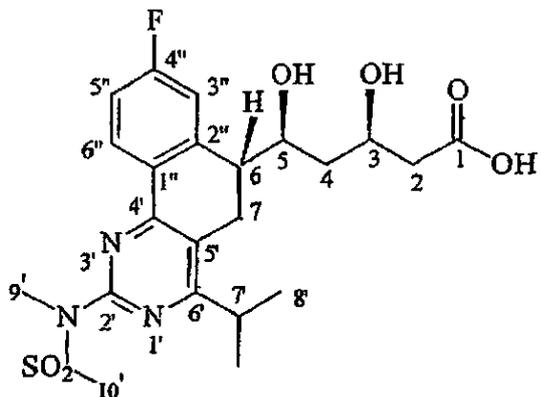
El compuesto estándar de referencia también se puede usar para cuantificar la cantidad de otro compuesto en la mezcla si se ha predeterminado el "factor de respuesta," que compensa las diferencias en la sensibilidad del detector para los dos compuestos. (Strobel p. 894). Para este propósito, el compuesto estándar de referencia se puede añadir directamente a la mezcla, en cuyo caso se denomina un "estándar interno". (Strobel p. 925, Snyder p. 552).

El compuesto estándar de referencia incluso se puede usar como estándar interno cuando la mezcla desconocida contiene algún compuesto estándar de referencia usando una técnica denominada "adición estándar", en la que al menos se preparan dos muestras añadiendo cantidades conocidas y diferentes del estándar interno. (Strobel pp. 391-393, Snyder pp.571, 572). La proporción de respuesta del detector debida al compuesto estándar de referencia que está originalmente en la mezcla se puede determinar mediante la extrapolación de una curva de respuesta del detector frente a la cantidad del compuesto estándar de referencia que se añadió a cada una de las muestras a cero. (Por ejemplo, Strobel, Fig. 11.4, p.392).

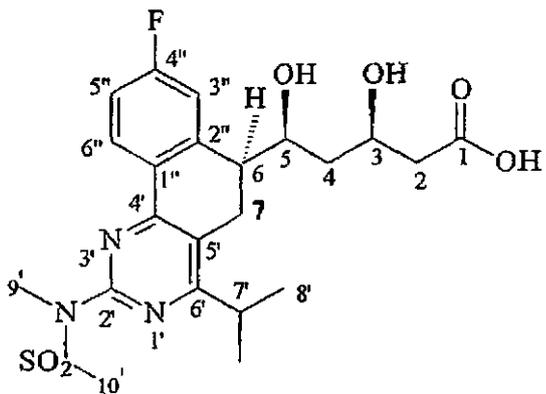
La presente invención proporciona un producto de degradación de rosuvastatina que se puede usar como estándar de referencia para el análisis de rosuvastatina.

Sumario de la invención

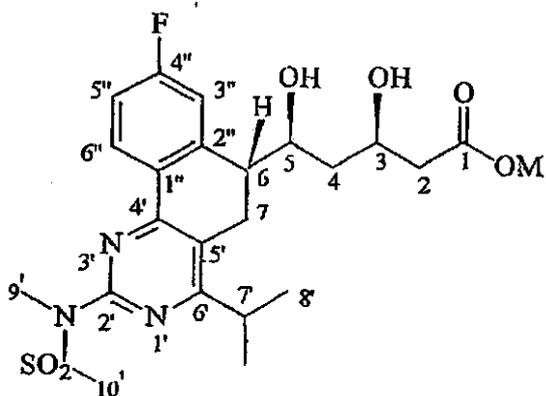
- 5 En un aspecto, la presente invención proporciona un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:



En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:

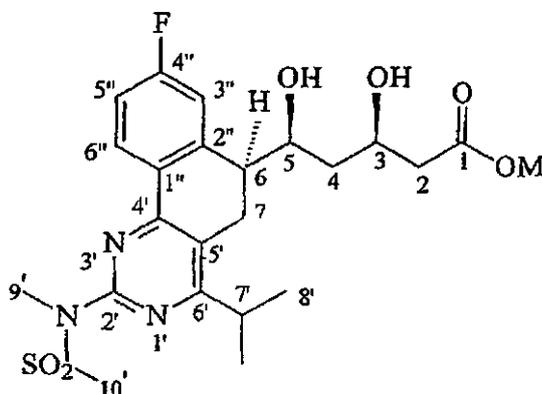


- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:



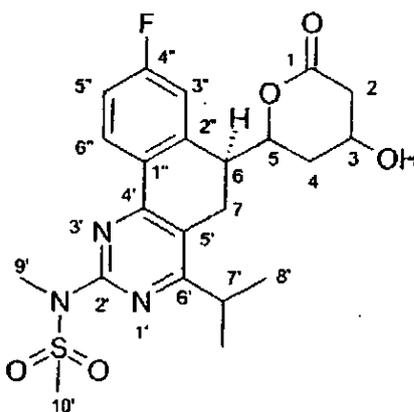
en la que M es un metal alcalino o alcalinotérreo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:

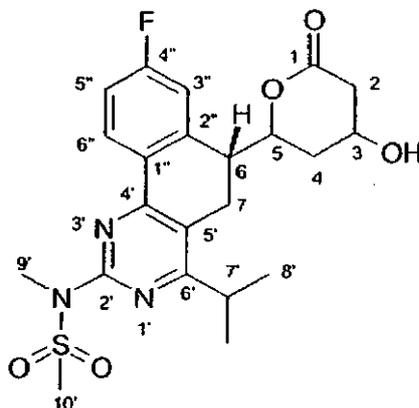


5 en la que M es un metal alcalino o alcalinotérreo. Preferentemente M es calcio. La sal de calcio se puede convertir a forma de lactona combinando acetonitrilo, ácido clorhídrico y la sal de calcio para obtener la lactona; o a ácido libre que comprende disolver la sal de calcio en una mezcla de acetonitrilo y agua, y poner en contacto la sal de calcio con una columna de sílice.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una forma de lactona de un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:



10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una forma de lactona de un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:



15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para convertir la lactona a una sal de calcio que comprende hidrolizar la lactona bajo condiciones básicas acuosas, y haciendo reaccionar la lactona hidrolizada con una fuente de calcio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para convertir la lactona a la forma de ácido libre que comprende hidrolizar la lactona bajo condiciones básicas acuosas para obtener una sal de metal y poner en contacto la sal de metal con una columna de sílice.

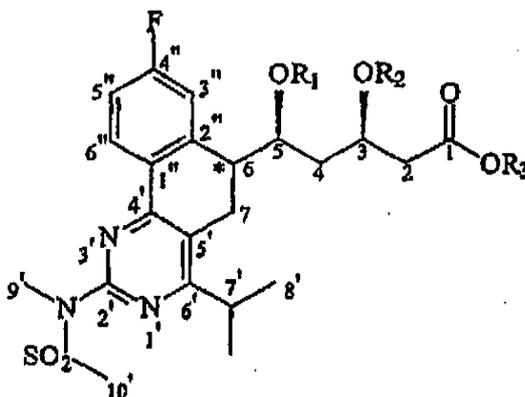
- 5 Preferentemente, el producto de degradación está libre aproximadamente en un 95% del % de área por HPLC de su correspondiente estereoisómero en la posición 6. El producto de degradación de rosuvastatina puede estar aislado o purificado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para analizar una muestra de rosuvastatina que comprende las etapas de:

- a) realizar cromatografía sobre la muestra para obtener datos; y
 10 b) comparar los datos con los datos de cromatografía del producto de degradación.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar el producto de degradación que comprende la etapa de irradiar con luz visible ácido de rosuvastatina, sal de metal alcalino o alcalinotérreo de rosuvastatina o lactona de rosuvastatina.

- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar el tiempo de retención de una columna de cromatografía para rosuvastatina, que comprende las etapas de llevar a cabo una cromatografía con el siguiente compuesto como estándar,



en el que R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno o un grupo protector hidrolizable; R₃ es hidrógeno, un grupo alquilo de C₁ a C₄, o un metal alcalino o alcalinotérreo; o en el que C¹ y C⁵ forman una lactona.

20 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 es un cromatograma de HPLC del compuesto VI.

La figura 2 es un cromatograma de HPLC del compuesto VII.

La figura 3 es un cromatograma de HPLC de una mezcla de rosuvastatina. Compuesto VI y compuesto VII.

Descripción detallada de la invención

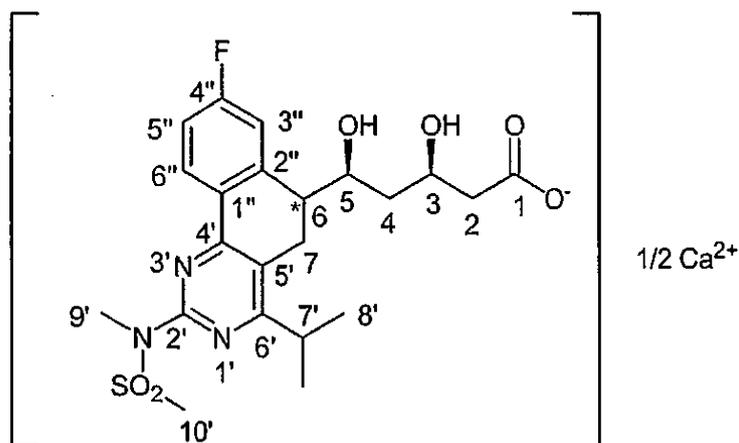
- 25 Como se usa en el presente documento, el término "estándar de referencia" se refiere a un compuesto que se puede usar para análisis tanto cuantitativo como cualitativo de un ingrediente farmacéutico activo. Por ejemplo, el tiempo de retención del compuesto en HPLC permite fijar un tiempo de retención relativo, haciendo posible así el análisis cualitativo. La concentración del compuesto en solución antes de la inyección en una columna HPLC permite la comparación de las áreas bajo los picos en un cromatograma de HPLC, haciendo posible así el análisis cuantitativo.

- 30 Se usa un "marcador de referencia" en el análisis cualitativo para identificar componentes de una mezcla basándose en su posición, por ejemplo, en un cromatograma o sobre una placa de cromatografía en capa fina (TLC) (Strobel, páginas 921, 922, 953). Para este propósito, el compuesto no tiene que añadirse necesariamente a la mezcla si está presente en la mezcla. Un "marcador de referencia" se usa sólo para análisis cualitativo, mientras que un estándar de referencia se puede usar para análisis cuantitativo o cualitativo, o ambos. Por tanto, un marcador de referencia es un subconjunto de un estándar de referencia, y está incluido dentro de la definición de un estándar de referencia.
- 35

Aunque se han descrito en términos generales algunos de los conocimientos de los expertos en la técnica con respecto a los estándares de referencia, hasta este punto, los expertos en la técnica también entienden que la respuesta del detector puede ser, por ejemplo, las alturas de los picos o las áreas integradas de los picos de un

5 cromatograma obtenido, por ejemplo, por detección UV o de índice de refracción, del eluyente de un sistema HPLC o por ejemplo, detección de ionización de llama o detección de conductividad térmica, del eluyente de un cromatógrafo de gas, u otra repuesta del detector, por ejemplo, la absorbencia UV, de puntos en una placa de TLC fluorescente. La posición del estándar de referencia se puede usar para calcular el tiempo de retención relativo para rosuvastatina y otras impurezas.

Cuando la rosuvastatina cálcica se expone a irradiación de luz visible, se obtienen los productos de degradación de rosuvastatina, que se pueden usar como estándar de referencia. Los dos productos de degradación son productos cíclicos diastereoméricos (II) y (III) con la creación de un centro asimétrico adicional en la posición 6 como sigue:



10 Además de la rosuvastatina cálcica, se pueden irradiar otras formas de rosuvastatina, incluyendo la lactona, el ácido libre y las sales, tales como sal de sodio.

La irradiación se puede realizar en solución o en estado sólido. Cuando se irradia una solución, la irradiación se puede realizar a preferentemente desde aproximadamente la temperatura ambiente hasta aproximadamente la temperatura de reflujo. El disolvente orgánico usado para disolución puede ser prótico polar (alcohol C₁ a C₄ tal como metanol o etanol) o bien aprótico (acetonitrilo, tetrahidrofurano) en una mezcla con agua. La irradiación de luz visible de aproximadamente 750 w a aproximadamente 35°C de solución acuosa de acetonitrilo de rosuvastatina cálcica durante aproximadamente 7 horas da una mezcla de compuestos (II) y (III) en la proporción 1:1. Cuando se irradia en el estado sólido, la temperatura es preferentemente desde aproximadamente 20EC hasta aproximadamente 100EC. Un experto en la técnica puede elegir incluso un espectro reducido dentro de estos espectros o una mezcla de distintos espectros. Basándose en la orientación estructural proporcionada en el presente documento de los distintos productos de degradación, un experto en la técnica puede preparar una vía sintética para obtener los productos de degradación.

En otra realización, se obtiene la correspondiente lactona, irradiando la forma de lactona de rosuvastatina o bien preparando la lactona a partir de los compuestos II y III para obtener los correspondientes compuestos IV y V que se pueden usar como estándar de referencia. El compuesto IV tiene el siguiente RMN-¹H (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,24, 1,34, 1,68, 2,47, 2,53, 2,64, 3,15, 3,35, 3,46, 3,56, 3,60, 4,28, 4,45, 6,99, 7,14, 8,31; RMN-¹³C (75MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,87, 21,26, 23,29, 31,41, 33,26, 34,03, 38,23, 42,07, 43,00, 62,23, 74,53, 115,61, 116,08 (J=26Hz), 116,25 (J=22Hz), 129,08, 128,91 (J=9Hz), 139,28 (J=8Hz), 157,64, 157,86, 163,96 (J=253Hz), 169,47, 174,48; FAB+m/z (MH⁺): 464. El compuesto V tiene el siguiente RMN-¹H (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,24, 1,29, 1,52, 1,70, 2,58, 3,02, 3,21, 3,27, 3,41, 3,55, 3,60, 4,26, 4,78, 7,05, 7,12, 8,34; FAB+m/z (MH⁺): 464.

30 La preparación de los correspondientes compuestos de lactona IV y V a partir del compuesto II y III incluye disolver el compuesto II y III en un disolvente adecuado y formar un anillo de lactona, por ejemplo, con ácido clorhídrico acuoso. Se pueden usar otros ácidos para formar una lactona. Un disolvente adecuado para la preparación de la lactona a partir del compuesto II o III es diclorometano, cloroformo, acetonitrilo o tetrahidrofurano. Preferentemente, el disolvente adecuado es acetonitrilo. Para recuperar el producto, el disolvente se puede retirar mediante cualquier procedimiento convencional, tal como evaporación. Los compuestos IV y V obtenidos se puede separa mediante procedimientos tales como cromatografía en columna y cristalización.

La preparación de los correspondientes compuestos de lactona IV y V a partir de lactona de rosuvastatina también se pueden realizar mediante irradiación de luz visible en los mismos disolventes. Las características de irradiación como se describen anteriormente. Los compuestos de lactona IV y V se pueden hidrolizar con una cantidad equivalente de una base acuosa tal como hidróxido de sodio o de calcio para obtener las sales correspondientes en presencia de un disolvente. Preferentemente, el disolvente es acetonitrilo. En una realización, las lactonas se hidrolizan con una solución acuosa de hidróxido de sodio en acetonitrilo, seguido de la retirada de acetonitrilo y la adición de una fuente de calcio tal como cloruro de calcio.

Las formas de lactona IV y V se pueden hidrolizar con una base para obtener sales y posteriormente convertirse en las formas de ácido VI y VII, respectivamente, que se pueden usar como estándar de referencia. La conversión de las lactonas a sales se puede llevar a cabo usando una solución acuosa básica. En una realización, la lactona se disuelve en una mezcla de acetonitrilo y una solución de NaOH acuosa. Después, se retira el acetonitrilo y se añade una fuente de calcio, tal como cloruro de calcio para precipitar la sal de calcio.

Las formas de ácido se obtienen después de purificar los productos de sal mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (como se describe en el ejemplo 1). Se cree que la acidez de la columna de sílice es responsable de la conversión. El compuesto VI tiene el siguiente RMN-¹H (600MHz, CDCl₃+CD₃OD 5:1) δ (ppm): 1,25, 1,33, 1,39, 1,58, 2,22, 2,80, 2,89, 3,36, 3,52, 3,58, 3,61, 3,95, 7,01, 7,09, 8,26; RMN-¹³C (150MHz, CDCl₃+CD₃OD 5:1) δ (ppm): 21,14, 21,31, 23,32, 31,56, 33,47, 40,15, 42,16, 42,97, 44,62, 68,99, 71,45, 115,17 (J=21Hz), 116,32 (J=22Hz), 117,77, 128,87 (J=9Hz), 129,20, 142,34 (J=8Hz), 157,71, 158,57, 164,26 (J=251Hz), 174,30; Cl+m/z (MH⁺): 482. El compuesto VII tiene el siguiente RMN-¹H (600MHz, CDCl₃+CD₃OD 5:1) δ (ppm): 1,24, 1,31, 1,43, 2,25, 2,95, 3,05, 3,19, 3,30, 3,56, 3,60, 3,85, 4,03, 7,02, 7,08, 7,31; RMN-¹³C (150MHz, CDCl₃+CD₃OD 5:1) δ (ppm): 21,15, 21,23, 22,98, 31,22, 33,36, 38,83, 42,08, 43,45, 68,82, 73,86, 114,95 (J=21Hz), 116,31 (J=21Hz), 117,41, 128,56 (J=8Hz), 128,91, 142,02 (J=8Hz), 157,58, 158,45, 164,28 (J=252Hz), 173,19, 178; Cl+m/z(MH⁺): 482.

Las distintas formas del producto de degradación se pueden purificar de modo que sólo esté presente un estereoisómero. El estereoisómero R en la posición 6 está libre preferentemente al menos aproximadamente en un 95% del estereoisómero S por % de área por HPLC. En cambio, el estereoisómero S en la posición 6 está preferentemente libre al menos aproximadamente en un 95% del estereoisómero R por % de área por HPLC. LA purificación se puede realizar mediante cromatografía en columna, TLC, HPLC u otro procedimiento de purificación conocido.

Instrumentos

Para la cromatografía, se puede usar óxido de aluminio o, preferentemente, gel de sílice para el empaquetado. Como para el eluyente, se pueden usar diferentes disolventes orgánicos o mezclas de los mismos. Se prefiere acetato de etilo.

Los compuestos II y III, aislados como los correspondientes ácidos (VI y VII), lactonas (IV y V) se pueden investigar con RMN-¹H, RMN-¹³C, COSY RMN y análisis espectroscópicos de masa para determinar sus estructuras.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de productos de degradación de rosuvastatina mediante irradiación de rosuvastatina (sal de Ca).

1. Se disolvió rosuvastatina (sal de Ca) (4,0 g) en una mezcla de acetonitrilo-agua (380 ml - 140 ml) y se irradió con luz visible (750 w, 35°C) durante 7 horas. Se evaporaron a vacío el acetonitrilo y el agua.

2. Se disolvió el sólido obtenido en 40 ml de acetonitrilo y se añadieron 40 ml de ácido clorhídrico 1 N. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante toda una noche. Después de la evaporación de acetonitrilo y agua, y de secar a vacío, se separaron los productos obtenidos mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente hexano-acetato de etilo 1:2), dando lactona IV (0,8 g) y lactona V (0,6 g). TLC sobre gel de sílice, eluyente hexano-acetato de etilo (1:2) R_f= 0,30 para el compuesto IV, R_f= 0,25 para el compuesto V.

Compuesto IV

Número de átomo	RMN- ¹ H (CDCl ₃)	RMN- ¹³ C (CDCl ₃)	J(Hz)
	Δ	Δ	
1		169,47	
2	2,53, 2,64	38,23	
3	4,28	62,23	
4	1,68	34,03	
5	4,45	74,53	
6	3,15	43,00	
7	2,47,3,46	23,29	
2'		157,64	

(CONT)			
Número de átomo	RMN- ¹ H (CDCl ₃)	RMN- ¹³ C (CDCl ₃)	
	Δ	Δ	J(Hz)
4'		157,86	
5'		115,61	
6'		174,48	
7'	3,35	31,41	
8'	1,24, 1,34	21,36, 20,87	
9'	3,60	33,26	
10'	3,56	42,07	
1"		129,08	
2"		139,28	8
3"	6,99	116,25	22
4"		163,96	253
5"	7,14	116,08	26
6"	8,31	128,91	9

Compuesto V

Número de átomo	RMN- ¹ H (CDCl ₃)
	Δ
2	2,58
3	4,26
4	1,52, 1,70
5	4,78
6	3,41
7	3,02, 3,21
7'	3,27
8'	1,24, 1,29
9'	3,60
10'	3,55
3"	7,05
4"	
5"	7,12
6"	8,34

3. Se disolvió la lactona IV (0,8 g) en acetonitrilo, y se añadió hidróxido de sodio acuoso 1 N (4 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante toda una noche. Después de la evaporación de acetonitrilo y agua, y de secar a vacío,

se purificó el producto obtenido mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente diclorometano-metanol 65 ml: 10 ml), dando el compuesto VI puro (0,4 g).

Compuesto VI (ácido correspondiente del compuesto IV)

(CONT)			
Número de átomo	RMN- ¹ H (CDCl ₃ +CD ₃ O D 5:1)	RMN- ¹³ C (CDCl ₃ +CD ₃ OD 5:1)	
	Δ	Δ	J (Hz)
1			
2	2,22	42,97	
3	3,95	68,99	
4	1,39/1,58	40,15	
5	3,58	71,45	
6	2,89	44,62	
7	2,80/3,52	23,32	
2'		157,71	
4'		158,57	
5'		117,77	
6'		174,30	
7'	3,36	31,56	
8'	1,25/1,33	21,14/21,31	
9'	3,61	33,47	
10'	3,58	42,16	
1"		129,20	
2"		142,34	8
3"	7,01	116,32	22
4"		164,26	251
5"	7,09	115,17	21
6"	8,26	128,87	9

4. De forma análoga, se obtuvo el compuesto VII (0,3 g) a partir de lactona V.

5 **Compuesto VII** (ácido correspondiente del compuesto V)

Número de átomo	RMN- ¹ H (CDCl ₃ +CD ₃ OD 5:1)	RMN- ¹³ C, (CDCl ₃ +CD ₃ OD 5:1)	
	Δ	Δ	J(Hz)
1		178	
2	2,25	42,08	
3	4,03	68,82	
4	1,43	38,83	

(CONT)			
Número de átomo	RMN- ¹ H (CDCl ₃ +CD ₃ OD 5:1)	RMN- ¹³ C, (CDCl ₃ +CD ₃ OD 5:1)	
	Δ	Δ	J(Hz)
5	3,85	73,86	
6	3,05	43,45	
7	2,95/3,19	22,98	
2'		157,58	
4'		158,45	
5'		117,41	
6'		173,19	
7'	3,30	31,22	
8'	1,24/1,31	21,15/21,23	
9'	3,60	33,36	
10'	3,56	42,08	
1"		128,91	
2"		142,02	8
3"	7,02	116,31	21
4"		164,28	252
5"	7,08	114,95	21
6"	8,31	128,56	8

Ejemplo 2. Preparación de productos de degradación de rosuvastatina mediante irradiación de lactona de rosuvastatina

- 5 Se disolvió lactona de rosuvastatina (2,0 g) en 200 ml de acetonitrilo se irradió con luz visible (750 w, 35°C) durante 7 horas. Después de la evaporación del acetonitrilo, y de secar a vacío, se separaron los productos obtenidos mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente hexano-acetato de etilo 1:2), dando lactona IV (1,1g) y lactona V (0,6 g).
- 10 Se disolvió la lactona IV (1,0 g) en 5 ml de acetonitrilo y se añadieron 2 ml de NaOH acuoso 1 N. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de la evaporación de acetonitrilo, se añadió 1 ml de CaCl₂ acuoso 2 N y se agitó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado y se secó a vacío dando el compuesto II.
3. De forma análoga, se obtuvo el compuesto III a partir de lactona V.

Ejemplo 3. Determinación del perfil de impureza de HPLC de rosuvastatina cálcica

Se determina la pureza de los compuestos IV, V, VI y VII mediante análisis por HPLC.

15 **HPLC**

Columna: C18

Eluyente: Gradiente de tampón formato y acetonitrilo

Flujo: 1 ml/min

Detector: 245 nm

Volumen de muestra: 10 μ l

Diluyente: Acetonitrilo: Agua = 50:50

La composición de fase móvil y la velocidad de flujo se pueden variar para lograr la idoneidad requerida del sistema.

5 **Preparación de muestra**

Se pesan aproximadamente 10 mg de muestra de rosuvastatina cálcica en un matraz volumétrico ámbar de 20 ml. Se disuelve la muestra con 10 ml de acetonitrilo y se diluye hasta un volumen con agua.

Preparación estándar

10 Se pesan aproximadamente 10 mg de cada compuesto IV, V, VI y VII en un matraz volumétrico ámbar de 20 ml, se disuelven con 10 ml de acetonitrilo y se diluyen hasta un volumen con agua. Se diluye 1 ml de solución preparada hasta 100 ml con diluyente.

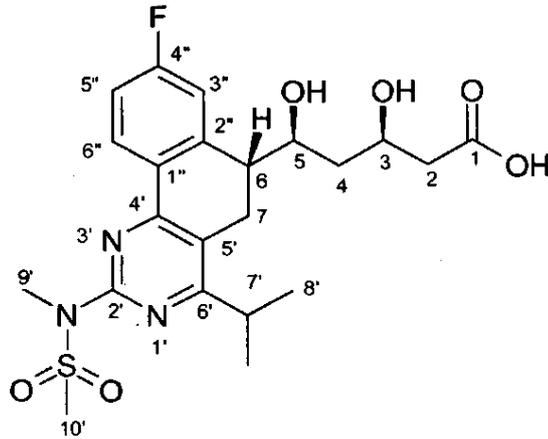
Procedimiento

15 Se inyectan las soluciones de muestra recién preparadas en el cromatógrafo, y se continúa el cromatograma de la muestra hasta el final del gradiente. Se determinan las áreas para cada pico en cada solución usando un integrador adecuado.

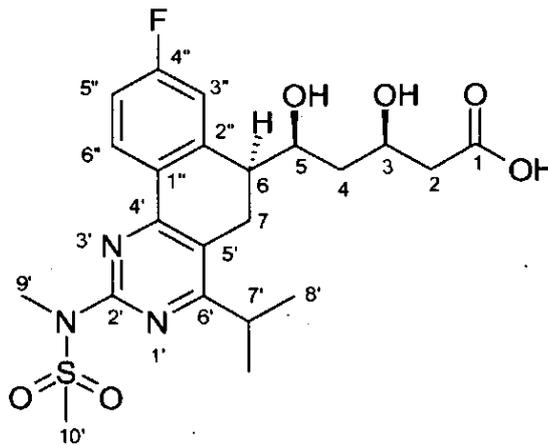
Los ejemplos se exponen para ayudar a entender la invención pero no se pretende que limiten, y no deberían interpretarse para limitar, su alcance de cualquier modo. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales.

REIVINDICACIONES

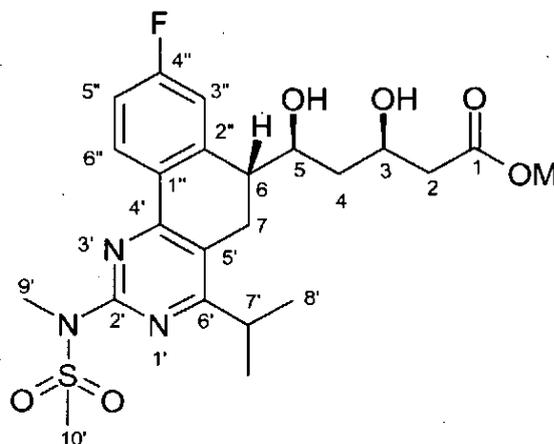
1. Un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:



- 5 2. Un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:

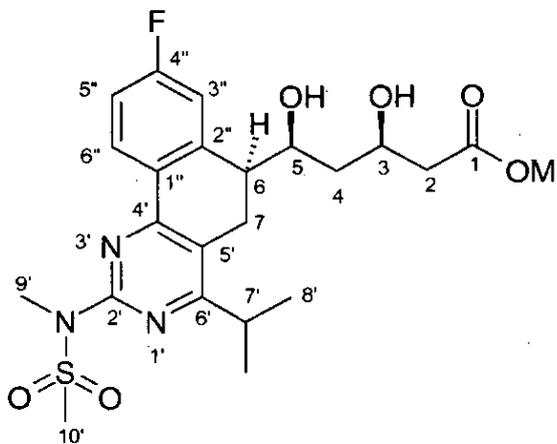


3. Un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:



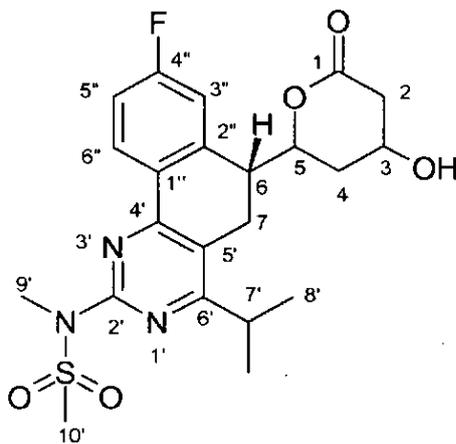
en la que M es un metal alcalino o alcalinotérreo.

4. Un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:

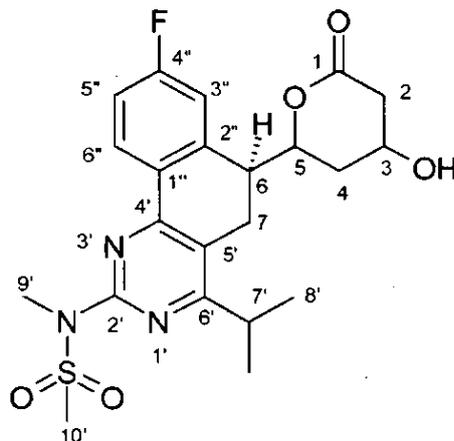


en la que M es un metal alcalino o alcalinotérreo.

5. El producto de degradación de rosuvastatina de la reivindicación 3 ó 4, en el que M es calcio.
6. Un procedimiento para convertir la sal de calcio de la reivindicación 5 a la forma de lactona que comprende combinar acetonitrilo, ácido clorhídrico y la sal de calcio para obtener la lactona.
7. Un procedimiento para convertir la sal de calcio de la reivindicación 5 a un ácido libre que comprende disolver la sal de calcio en una mezcla de acetonitrilo y agua para obtener una solución, y poner en contacto la solución con una columna de sílice.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además aislar el ácido libre de la columna de sílice.
9. Una forma de lactona de un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:

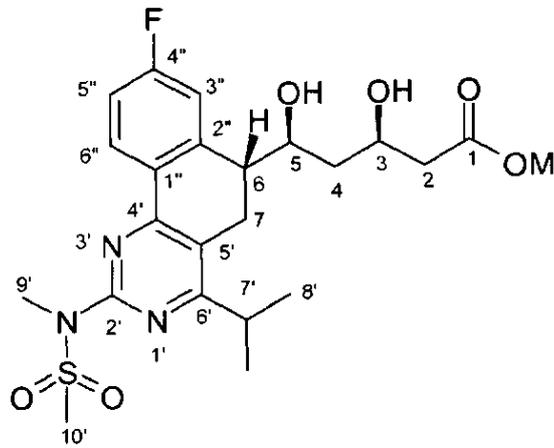


10. Una forma de lactona de un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:

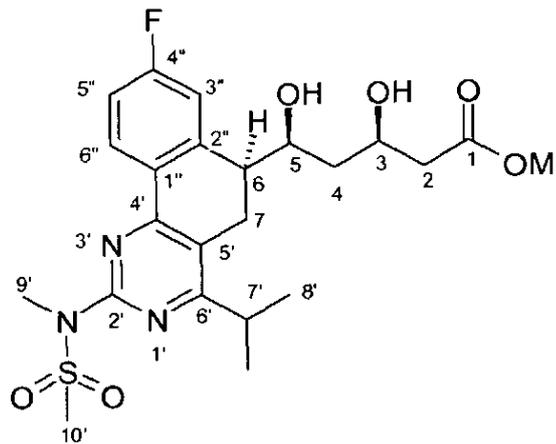


11. Un procedimiento para convertir la lactona de la reivindicación 9 ó 10 a una sal de calcio que comprende hidrolizar la lactona bajo condiciones básicas acuosas, y hacer reaccionar la lactona hidrolizada con una fuente de calcio.
- 5 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que se combina una solución acuosa básica con una solución de la lactona en acetonitrilo, seguido de la retirada de acetonitrilo y la adición de una fuente de calcio, y la recuperación de la sal de calcio.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el procedimiento comprende disolver la lactona en una mezcla de acetonitrilo e hidróxido de sodio acuoso, evaporar el acetonitrilo, añadir cloruro de calcio al agua restante para precipitar la sal de calcio.
- 10 14. Un procedimiento para convertir la lactona de la reivindicación 9 ó 10 a la forma de ácido libre que comprende hidrolizar la lactona bajo condiciones básicas acuosas para obtener una sal y poner en contacto la sal con una columna de sílice para obtener el ácido libre.
- 15 15. El producto de degradación de rosuvastatina de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 9 ó 10, en el que el producto de degradación está libre aproximadamente en un 95% del % de área por HPLC de su correspondiente estereoisómero en la posición 6.
16. El producto de degradación de rosuvastatina de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 9 ó 10, en el que el producto de degradación de rosuvastatina está aislado o purificado.
17. Un procedimiento para analizar una muestra de rosuvastatina que comprende las etapas de:
- a) realizar cromatografía sobre la muestra para obtener datos; y
- 20 b) comparar los datos con los datos de cromatografía del producto de degradación de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 9 ó 10.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- (a) preparar una solución de rosuvastatina que contiene el producto de degradación;
- (b) someter la solución a una cromatografía líquida de alta presión para obtener un cromatograma; y
- 25 (c) comparar un pico obtenido en el cromatograma con un pico que resulta del producto de degradación.
19. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- (a) preparar una solución de rosuvastatina que contiene el producto de degradación;
- (b) someter la solución a una cromatografía en capa fina para obtener un cromatograma; y
- 30 (c) comparar una banda o punto obtenido en el cromatograma con un pico o banda que resulta del producto de degradación.
20. Un procedimiento para preparar el producto de degradación de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 9 ó 10, que comprende la etapa de irradiar con luz visible ácido de rosuvastatina, sal alcalina o de metal alcalinotérreo de rosuvastatina o lactona de rosuvastatina.

21. Un procedimiento para la preparación del compuesto:



o

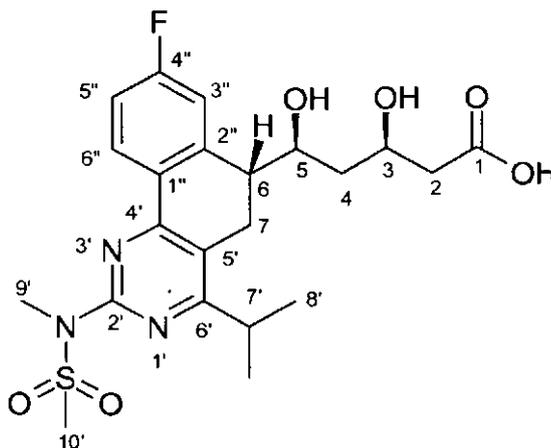


5 en el que M es calcio, que comprende irradiar con luz visible la rosuvastatina cálcica en solución en una mezcla de un disolvente orgánico y agua.

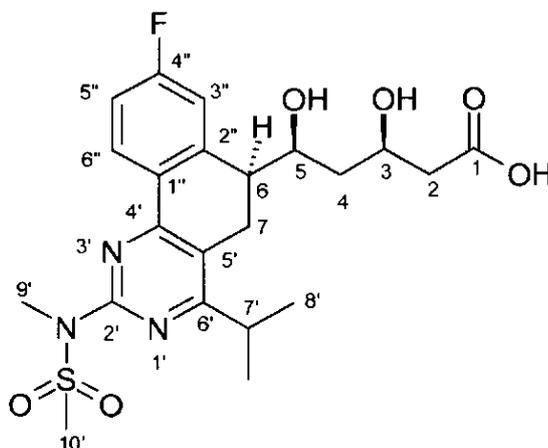
22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el disolvente orgánico es acetonitrilo.

23. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que la radiación de luz visible es de aproximadamente 750 w a aproximadamente 35°C.

10 24. Un procedimiento de preparación de la forma de lactona del compuesto

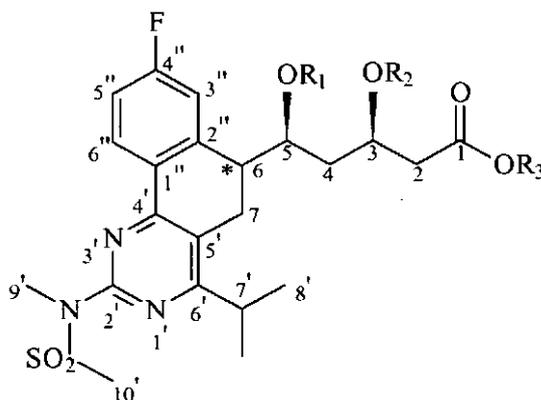


o



que comprende irradiar con luz visible lactona de rosuvastatina en un disolvente.

- 5 **25.** El procedimiento de la reivindicación 24, en el que la radiación de luz visible es de aproximadamente 20°C a aproximadamente 100°C.
- 26.** El procedimiento de la reivindicación 24, en el que el disolvente es acetonitrilo.
- 27.** Un procedimiento para determinar el tiempo de retención de una columna de cromatografía para rosuvastatina, que comprende las etapas de llevar a cabo una cromatografía con el siguiente compuesto como estándar,



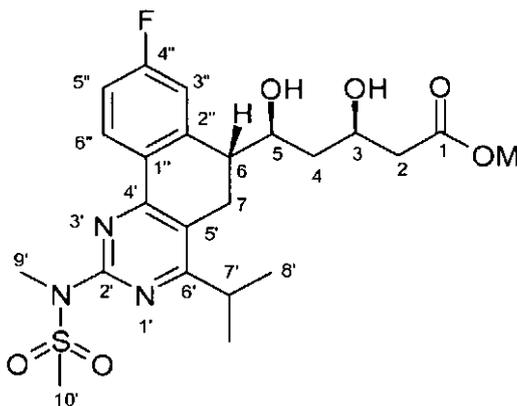
10

en el que R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno o un grupo protector hidrolizable; R₃ es hidrógeno, un grupo alquilo de C₁ a C₄, o un metal alcalino o alcalinotérreo; o en el que C₁ y C₅ forman una lactona.

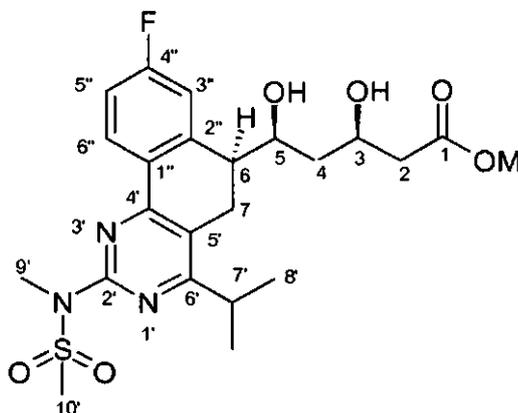
28. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que el estándar de referencia es un marcador de referencia.
29. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que el estándar es el producto de degradación de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 9 ó 10.
30. Un procedimiento para preparar el producto de degradación de rosuvastatina de la reivindicación 1 ó 2 que comprende las etapas de:

5

(a) irradiar con luz visible rosuvastatina cálcica en una mezcla de un disolvente orgánico y agua para obtener el producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura



o



10

en la que M es calcio;

(b) recuperar el producto obtenido en la etapa (a);

(c) disolver el compuesto obtenido en la etapa (b) en un disolvente adecuado y combinar la solución con ácido clorhídrico acuoso;

15

(d) recuperar el producto de la etapa (c);

(e) hidrolizar el producto recuperado en la etapa (d) bajo condiciones básicas acuosas y hacer reaccionar el producto hidrolizado con una fuente de calcio para precipitar un sólido;

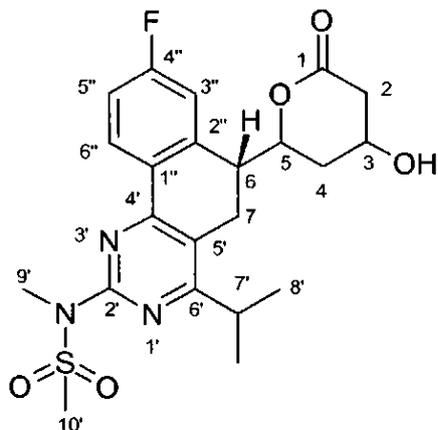
(f) recuperar el sólido precipitado en la etapa (e); y

20

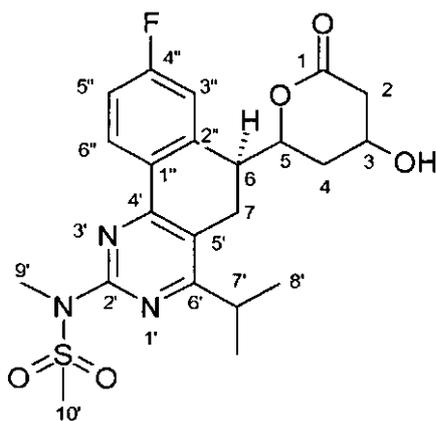
(g) disolver el producto recuperado en la etapa (f) en una mezcla de acetonitrilo y agua, y poner en contacto la solución con una columna de sílice para obtener un ácido libre.

31. Un procedimiento para preparar el producto de degradación de rosuvastatina de la reivindicación 1 ó 2 que comprende las etapas de:

(a) irradiar con luz visible lactona de rosuvastatina en una mezcla de un disolvente orgánico y agua para obtener el producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura



o



5

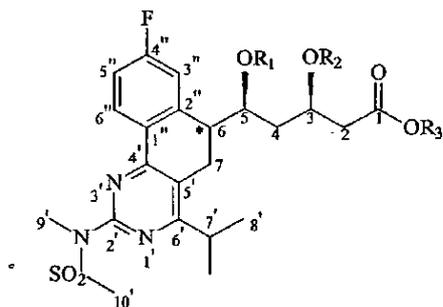
(b) recuperar el producto obtenido en la etapa (a);

(c) hidrolizar el producto recuperado en la etapa (b) bajo condiciones básicas acuosas y hacer reaccionar el producto hidrolizado con una fuente de calcio para precipitar un sólido;

(d) recuperar el sólido precipitado en la etapa (c); y

10 (e) disolver el producto recuperado en la etapa (d) en una mezcla de acetonitrilo y agua, y poner en contacto la solución con una columna de sílice para obtener un ácido libre.

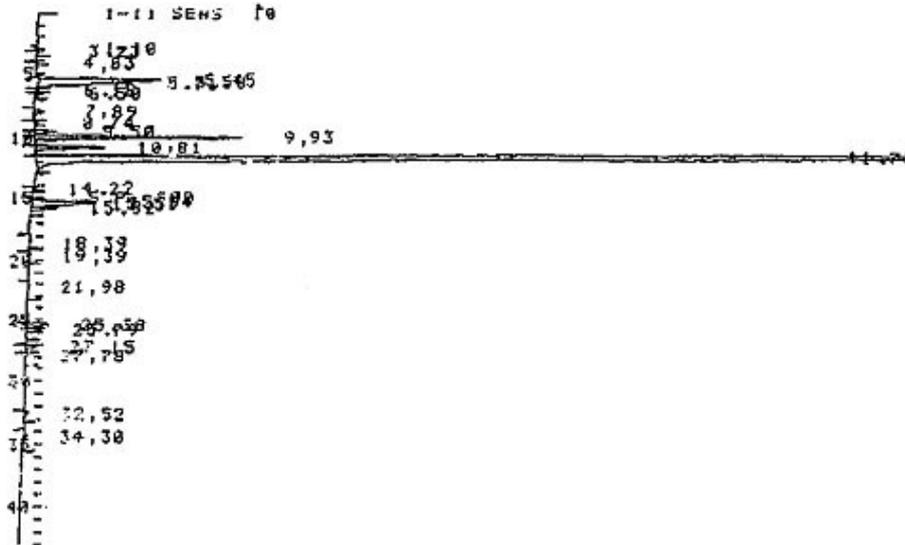
32. Un producto de degradación de rosuvastatina que tiene la siguiente estructura:



15 en el que R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno o un grupo protector hidrolizable; R₃ es hidrógeno, un grupo alquilo de C₁ a C₄, o un metal alcalino o alcalinotérreo, o en el que C¹ y C⁵ forman una lactona.

33. El producto de degradación de rosuvastatina de la reivindicación 32, en el que R_1 y R_2 son independientemente hidrógeno.
34. El producto de degradación de rosuvastatina de la reivindicación 32 o reivindicación 33, en el que R_3 es metilo.

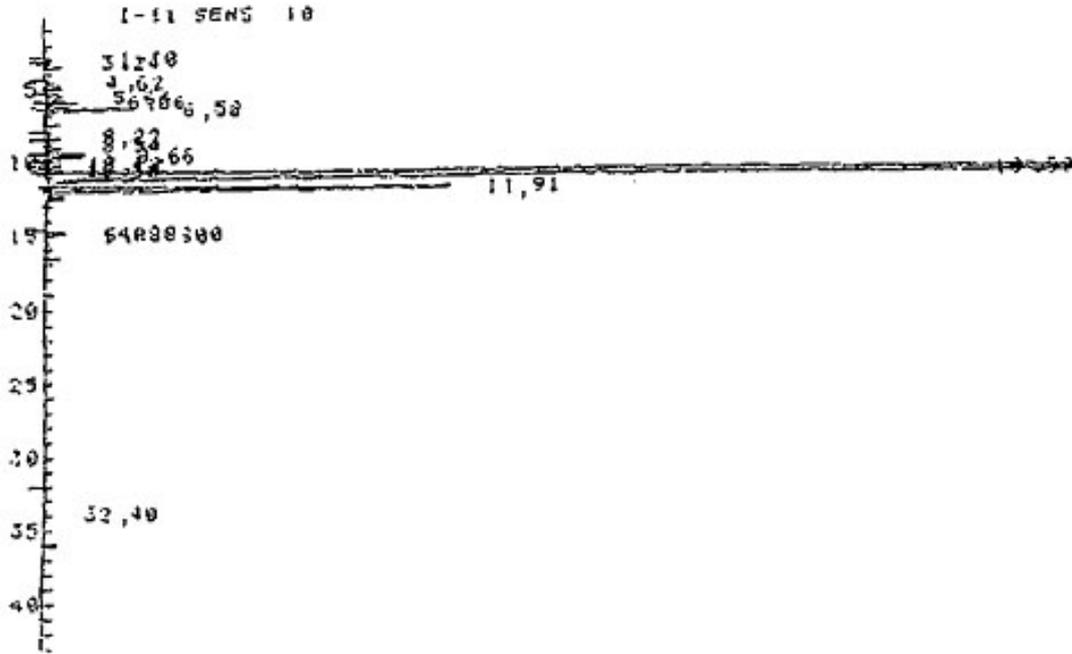
Figura 1. Cromatograma de HPLC del compuesto VI



0-2500

PROCED.: ROSUVASTATINA ETIQ.:			11 CH: 1	
ARCH: 0 PROC.CÁLCULO: % AREA			TABLA: 0	CONC: ÁREA
N.º	TA	ÁREA	PESO	CONC
1	3,23	1420	259	0,042
2	4,03	881	112	0,026
3	5,45	36038	4611	1,060
4	5,59	34647	4260	1,019
5	5,71	36498	3199	1,074
6	6,18	711	90	0,021
7	7,50	5533	363	0,104
8	7,89	5746	271	0,169
9	8,74	4156	186	0,122
10	9,50	9231	910	0,272
11	9,93	81270	7883	2,391
12	10,81	30805	2695	0,906
13	11,70	3045458	202006	89,606
14	14,22	1604	169	0,047
15	15,34	30955	1471	0,911
16	15,51	20458	1902	0,602
17	15,82	12988	1044	0,370
18	18,59	2461	95	0,072
19	19,51	2994	124	0,088
20	21,98	1153	54	0,034
21	25,59	12415	809	0,365
22	25,79	10204	608	0,300
23	27,15	7179	489	0,211
24	27,78	2020	133	0,059
25	32,52	2250	200	0,066
26	34,38	2036	192	0,060
TOTL		3396703	325245	100,000
R. PICO :		0		

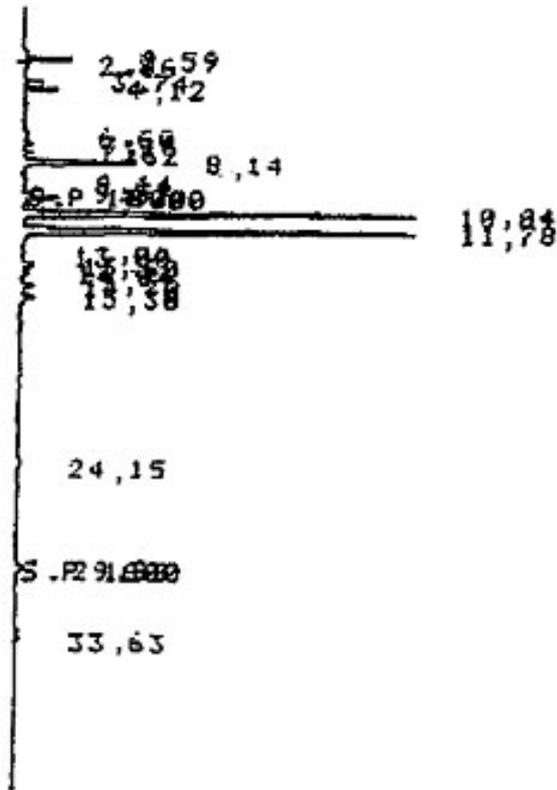
Figura 2. Cromatograma de HPLC del compuesto VII



0-2500

PROCED.: ROSUVASTATINA		ETIQ.: 12		CH: 1	
ARCH.: 0		PROC.CÁLCULO: % ÁREA		TABLA: 0	
CONC.: ÁREA					
N.º	TA	ÁREA	PESO	CONC.	
1	3,24	382	139	0,012	
2	4,62	2379	382	0,027	
3	5,64	10481	497	0,336	
4	6,06	8915	1923	0,288	
5	6,58	23886	787	0,804	
6	8,22	7226	188	0,184	
7	8,94	2690	174	0,087	
8	9,66	12439	1322	0,484	
9	10,12	1914	196	0,062	
10	10,58	1902	171	0,062	
11	10,91	2871899	281993	92,854	
12	11,91	137161	13418	4,436	
13	14,88	5918	633	0,247	
14	32,40	5465	74	0,177	
TOTAL		3092849	305156	100,000	
R.PICO :		0			

Figura 3. Rpsuvastatina, compuesto VI, compuesto VII



0

>: ROSUVASTATINA ETIQ.: 12 CH: 1

0 PROCED. CÁLC.: %ÁREA TABLA: 0 CONC.: ÁREA

TA	ÁREA	CONC.	BC
2,59	18433	3,611	BB
4,12	10307	2,117	BB
8,14	53524	10,485	VB
10,00	20230	3,965	BB
10,84	199132	39,808	BB
11,78	208366	40,917	BB
	519492	100,000	
R.F	10000		