

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 614**

51 Int. Cl.:  
**C07C 67/58** (2006.01)  
**C07C 69/33** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09728835 .1**  
96 Fecha de presentación: **31.03.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2274267**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2011**

54 Título: **Extracción de pravastatina**

30 Prioridad:  
**02.04.2008 EP 08103319**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2012**

73 Titular/es:  
**DSM Sinochem Pharmaceuticals Netherlands  
B.V.  
Alexander Fleminglaan 1  
2613 AX Delft, NL**

72 Inventor/es:  
**Bouman, Aad Johannes;  
Pater De, , Robertus Mattheus y  
Wnukowski, Piotr**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

**ES 2 378 614 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).



Se han descrito además otros procesos de aislamiento/purificación en EP 877089, US 2003/199047, US 2004/138294, WO 00/46175 y WO 01/39768 aunque en ninguno de estos métodos se menciona una reducción eficaz de las cantidades de compactina en el producto de pravastatina final.

5 Por consiguiente, se puede mejorar aún más el método de purificación para la pravastatina, más específicamente con respecto a la presencia de la impureza compactina.

### **Descripción detallada de la invención**

10 El primer aspecto de la presente invención es proporcionar un método para purificar la pravastatina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Se ha descubierto que la extracción de una solución que contiene pravastatina y compactina en un disolvente inmiscible en agua con agua o una solución acuosa a un pH comprendido entre 5.0 y 6.5 produce una solución acuosa en la que la proporción de pravastatina:compactina se ha incrementado. La extracción de pravastatina de una fase orgánica a una acuosa a un pH comprendido entre 5.0 y 6.5 no tiene precedentes, ya que la técnica anterior recomienda la realización de este tipo de extracciones a un pH mayor de 7.0, en el que los coeficientes de distribución son favorables, como sería habitual con las extracciones de otros ácidos orgánicos. Es más, sobre la base de la alta similitud entre las estructuras moleculares de la pravastatina y la compactina, no cabría esperar de antemano que hubiera una diferencia significativa entre los coeficientes de distribución. Sin embargo, se descubrió que, utilizando el método de la presente invención, la proporción de pravastatina:compactina se podía incrementar de 3:1 en la mezcla de partida hasta 100:1 después de la extracción.

20 En el contexto de la presente invención, un disolvente inmiscible en agua es un disolvente cuya solubilidad en agua a  $20 \pm 2$  °C es inferior a un 15%, preferentemente inferior a un 10%, más preferentemente inferior a un 8% y aún más preferentemente está comprendida entre un 0.5% y un 5%. Los ejemplos específicos de disolventes inmiscibles en agua que se pueden utilizar en la presente invención incluyen ésteres inmiscibles en agua tales como acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, acetato de *n*-propilo, acetato de isobutilo, acetato de *n*-butilo, isobutirato de isobutilo, acetato de 2-etilhexilo y diacetato de etilenglicol; cetonas inmiscibles en agua tales como cetona etil metílica, cetona isobutil metílica, cetona isoamil metílica, cetona *n*-amil metílica, cetona diisobutílica, ciclohexanona e isoforona; ésteres de éteres inmiscibles en agua tales como 3-etoxipropionato de etilo; hidrocarburos aromáticos inmiscibles en agua tales como tolueno y xileno; halohidrocarburos inmiscibles en agua tales como cloroforno, diclorometano y 1,1,1-tricloroetano; y ésteres de éteres glicólicos inmiscibles en agua tales como acetato de éter monometil propilenglicólico, acetato de éter etilenglicol monoetílico, acetato de éter etilenglicol monobutílico y acetato de éter dietilenglicol monobutílico.

30 El rango de pH para extraer pravastatina de una fase orgánica a una acuosa es de 5.5 a 6.5, más preferentemente de 5.7 a 6.0. Se puede obtener el pH deseado utilizando ácidos y bases con los cuales estará familiarizado un experto y/o que se sabe que son adecuados para extraer la pravastatina tales como, por ejemplo, bases como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio y similares, y, cuando proceda, ácidos tales como HBr, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HClO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> y similares.

35 En una realización, el método de la presente invención es particularmente útil para purificar la pravastatina obtenida mediante procesos biotecnológicos, por ejemplo, fermentación para la cual existen métodos alternativos. En un método, la pravastatina se produce en dos fermentaciones secuenciales. En primer lugar, la *Penicillium citrinum* produce compactina y el anillo lactona de esta se hidroliza químicamente con hidróxido sódico. Posteriormente, se introduce en un cultivo de *Streptomyces carbophilus*, que la hidroxila a pravastatina (Metkinen News, marzo de 2000, Metkinen Oy, Finlandia; revisado por Manzoni y Rollini, 2002, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:555-564). En otro método, también se describe un proceso de fermentación de un único paso para la pravastatina en un transformante de *Penicillium chrysogenum* (WO 2007/147827). Por ende, de acuerdo con la presente invención, se puede obtener una solución de pravastatina en un disolvente inmiscible en agua extrayendo un caldo de fermentación acuoso, que se puede obtener, por ejemplo, mediante cualquiera de los procesos de fermentación descritos anteriormente, con dicho disolvente inmiscible en agua preferentemente a un pH bajo tal como de 1 a 5, preferentemente de 2 a 4.5, más preferentemente de 3 a 4. Opcionalmente se eliminan los materiales celulares y otros sólidos antes de la extracción. A continuación, la solución de pravastatina en un disolvente inmiscible en agua obtenida de esta forma se somete a extracción con agua o una solución acuosa de acuerdo con el método de la presente invención.

50 En otra realización, la extracción se puede optimizar aún más llevando a cabo dicha extracción en un modo a contracorriente o de corriente cruzada. Esto suele incrementar el rendimiento de extracción para la pravastatina manteniendo la proporción de pravastatina:compactina a un buen nivel. En un ejemplo, la proporción de pravastatina:compactina era de 3:1 en la mezcla de partida, 45:1 después de una retroextracción, 25:1 después de dos retroextracciones y 17:1 después de tres retroextracciones, pudiendo obtener rendimientos globales de la extracción de hasta un 99%. Cuando se emplean materiales de partida con proporciones de pravastatina:compactina superiores a 3:1, por ejemplo, 5:1, 10:1 o 20:1, con una única retroextracción a la fase acuosa se pueden obtener soluciones acuosas con proporciones de pravastatina:compactina de 50:1, 100:1, 250:1, 500:1 o incluso 1000:1.

El segundo aspecto de la invención describe una composición que comprende pravastatina y compactina, en la que la proporción de pravastatina:compactina es superior a 500:1 tal como 600:1, 700:1, 800:1, 900:1, 1000:1 o valores intermedios. Este tipo de composición se puede obtener de acuerdo con el primer aspecto de la invención, es decir,

purificando un caldo de pravastatina preparado mediante fermentación por extracción en un disolvente inmiscible en agua seguida de retroextracción a una fase acuosa a un pH comprendido entre 5.0 y 7.0.

5 Una realización del segundo aspecto de la invención describe el fármaco activo pravastatina por sí solo o sus sales farmacéuticamente aceptables, especialmente la sal sódica. El método de la presente invención hasta el momento es la primera descripción de la eliminación de la compactina con éxito de mezclas que comprenden tanto pravastatina como compactina. Además, el método es adecuado para utilizarlo a escala industrial. Por lo tanto, se pueden obtener lotes industriales de pravastatina con el método de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención describe una composición que comprende pravastatina sódica y una cantidad de compactina menor o igual al 0.2% en peso de la composición. Preferentemente, la cantidad de compactina es menor del 0.1% en peso de la composición, más preferentemente menor del 0.05% en peso de la composición. El análisis de la pravastatina sódica en la composición es preferentemente mayor o igual al 99.6%, más preferentemente mayor o igual al 99.7%, aún más preferentemente mayor o igual al 99.8% e incluso aún más preferentemente mayor o igual al 99.9% en peso de la composición.

15 En otra realización, la presente invención describe pravastatina sódica de elevada pureza a escala industrial. A diferencia de la técnica anterior, la presente invención proporciona convenientemente lotes de pravastatina sódica superiores a 50 g, preferentemente de 100 g a 10 toneladas, más preferentemente de 500 g a 5 toneladas, aún más preferentemente de 1 kg a 1000 Kg e incluso aún más preferentemente de 10 kg a 100 kg. Los lotes de pravastatina anteriores solo contienen impurezas minoritarias ya que el análisis de la pravastatina sódica es mayor o igual al 99.4%, más preferentemente mayor o igual al 99.6%, aún más preferentemente mayor o igual al 99.7% e incluso aún más preferentemente mayor o igual al 99.8% en peso de la composición y el análisis de la compactina es menor o igual al 0.2%, preferentemente menor o igual al 0.15%, más preferentemente menor o igual al 0.10% y aún más preferentemente menor o igual al 0.15% en peso de la composición.

## EJEMPLOS

### Análisis de HPLC

25 El análisis de HPLC se basó en cromatografía líquida en fase inversa seguida de detección UV a 238 nm.

Aparato: sistema Dionex HPLC-UV que comprendía una bomba P680, un compartimiento para la columna TCC-100 con termostato, un automuestreador WPS-3000 y un detector UVD340U PDA.

#### Condiciones:

	Columna:	Waters Sunfire C18, 150* 4.6 mm, 3.5 µm	
30	Temp. de la columna:	40 °C	
	Velocidad de flujo:	1.2 mL/min	
	Detección UV:	238 nm	
	Volumen de inyección:	10 µL	
	Temp. de la bandeja de muestras:	5 °C	
35	Fase móvil A:	0.1% de ácido fórmico en metanol-agua purificada Milli-Q (6/4) v/v	
	Fase móvil B:	0.04% de ácido fórmico en acetonitrilo	
	Gradiente:	T= 0 min.	0% de B
		T= 5 min.	0% de B
		T= 15 min.	60% de B
40		T= 16 min.	60% de B
		T= 17 min.	0% de B
		T= 20 min.	0% de B

**Materiales:** agua: agua purificada Milli-Q o de calidad de HPLC; acetonitrilo, calidad de gradiente, n.º de art. 1.00030 de Merck; metanol, calidad de gradiente, n.º de art. 1.06007 de Merck; ácido fórmico, calidad analítica, n.º de art. 1.00264 de Merck.

**Procedimientos:** Fases móviles:

- Fase móvil A: Mezclar 600 mL de metanol, 400 mL de agua purificada Milli-Q y 1 mL de ácido fórmico.
- Fase móvil B: Añadir 0.4 mL de ácido fórmico a 1 litro de acetonitrilo.

## 5 **Medida del pH**

Los valores de pH mencionados en la descripción y las reivindicaciones de la presente solicitud se midieron utilizando un pHímetro estándar Radiometer PHM82 dotado de un electrodo de pH Mettler Toledo Inlab 412 (electrolito 9823). El pHímetro se equilibró a  $20 \pm 1$  °C utilizando un tampón de pH 4.00 de Merck (n.º de art. 1.09435.1000) y un tampón de pH 7.00 de Merck (n.º de art. 1.09439.1000).

## 10 **Ejemplo 1**

**Separación de la pravastatina y la compactina mediante retroextracción discontinua en un único paso con acetato de etilo**

Un caldo obtenido por fermentación del transformante T1.48 de *Penicillium chrysogenum* como se describe en el Ejemplo 4 de WO 2007/147827 (2 litros que contenían 2.5 g/kg de pravastatina y 0.8 g/kg de compactina) se centrifugó y el sobrenadante se dividió en 2 porciones de 800 mL. Se mezclaron una de estas porciones de sobrenadante (800 mL), acetato de etilo (800 mL) y dicalite 448 (20 g), y el pH se ajustó a 4 con ácido sulfúrico 6 N. La mezcla se filtró a través de un filtro de placa Seitz Z-2000. Las fases del filtrado se separaron y la fase orgánica se lavó una vez con agua (400 mL) para obtener un extracto de acetato de etilo (700 mL) que se dividió en ocho porciones de 80 mL y una de 60 mL. Cada porción se mezcló con un volumen idéntico de agua a un pH determinado comprendido entre 4.5 y 8. Después de mezclar, las fases se separaron y se analizaron mediante HPLC. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1 Retroextracción con acetato de etilo

pH	Fase acuosa			Fase orgánica			Coeficiente de distribución		Rendimiento de extracción		
	Vol (mL)	Prava (área)	Comp (área)	Vol (mL)	Prava (área)	Comp (área)	Prava	Comp	Prava (%)	Comp (%)	
4.5	87	14.0	0.0	73	159.9	16.8	0.1	0.0	9.4	0.0	
5	90	32.5	0.0	72	142.1	17.0	0.2	0.0	22.2	0.0	
5.5	88	52.2	0.0	72	120.8	17.2	0.4	0.0	34.6	0.0	
6	88	90.0	0.0	72	76.2	16.7	1.2	0.0	59.1	0.0	
6.25	66	105.3	0.8	51	54.9	16.7	1.9	0.0	71.3	5.7	
6.5	88	123.4	1.5	71	35.2	15.8	3.5	0.1	81.3	10.2	
Comp.	7	89	138.3	3.6	71	13.4	13.1	10.3	0.3	92.8	25.6
Comp.	7.5	90	144.7	7.1	70	5.3	8.8	27.4	0.8	97.2	51.0
Comp.	8	90	147.1	11.0	71	1.6	3.8	94.1	2.9	99.2	78.5

El coeficiente de distribución se define como  $C_{\text{fase acuosa}}/C_{\text{fase orgánica}}$ , donde C representa la concentración del componente en cuestión; Prava = pravastatina; Comp = compactina.

## 25 **Ejemplo 2**

**Separación de la pravastatina y la compactina mediante retroextracción discontinua en un único paso con cetona isobutil metílica**

Se mezclaron una de las porciones de sobrenadante (800 mL) obtenidas en el Ejemplo 1, cetona isobutil metílica (800 mL) y dicalite 448 (20 g), y el pH se ajustó a 4 con ácido sulfúrico 6 N. La mezcla se filtró a través de un filtro de placa Seitz Z-2000. Las fases del filtrado se separaron y la fase orgánica se lavó una vez con agua (400 mL) para

obtener un extracto de cetona isobutil metilica (750 mL) que se dividió en ocho porciones de 80 mL. Cada porción se mezcló con un volumen idéntico de agua a un pH determinado comprendido entre 4.5 y 8. Después de mezclar, las fases se separaron y se analizaron mediante HPLC. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 Retroextracción con cetona isobutil metilica

	pH	Fase acuosa			Fase orgánica			Coeficiente de distribución		Rendimiento de extracción	
		Vol (mL)	Prava (área)	Comp (área)	Vol (mL)	Prava (área)	Comp (área)	Prava	Comp	Prava (%)	Comp (%)
	4.5	87	25.5	0.0	73	124.8	13.6	0.2	0.0	19.6	0.0
	5	90	28.7	0.0	72	122.2	12.8	0.2	0.0	22.7	0.0
	5.5	88	55.5	0.0	72	91.6	11.6	0.6	0.0	42.5	0.0
	6	88	89.1	0.0	72	63.8	10.6	1.4	0.0	63.0	0.0
	6.5	88	118.4	0.8	71	29.6	11.0	4.0	0.1	83.2	8.5
Comp.	7	89	139.2	2.6	71	11.6	11.7	12.0	0.2	93.8	22.1
Comp.	7.5	90	147.1	6.6	70	3.9	7.6	37.5	0.9	98.0	53.0
Comp.	8	90	152.6	10.9	71	1.8	3.3	83.8	3.3	99.1	80.9

- 5 El coeficiente de distribución se define como  $C_{\text{fase acuosa}}/C_{\text{fase orgánica}}$ , donde C representa la concentración del componente en cuestión; Prava = pravastatina; Comp = compactina.

### Ejemplo 3

#### Separación de la pravastatina y la compactina mediante retroextracción discontinua en varios pasos y en modo de corriente cruzada con acetato de isobutilo a pH 6

- 10 El material de partida para este experimento fue filtrado de caldo obtenido tras la ultrafiltración de caldo obtenido por fermentación del transformante T1.48 de *Penicillium chrysogenum* como se describe en el Ejemplo 4 de WO 2007/147827 utilizando una membrana de polisulfona de 50 nm. El filtrado (2 litros que contenían 1.2 g/L de pravastatina y 0.37 g/L de compactina) se extrajo dos veces con acetato de isobutilo (2 x 1 litro) a pH 4. Para que hubiera una separación clara de las fases, las fases orgánicas se filtraron a través de un filtro de placa Seitz Z-2000.
- 15 Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (500 mL) para obtener un extracto de acetato de isobutilo (1960 mL) que se concentró hasta 100 mL al vacío a  $T < 40$  °C. El concentrado se decoloró utilizando un cartucho relleno de carbón Cuno C55 (1.8 g de carbón; diámetro de la placa de carbón = 18 cm<sup>2</sup>). Tras lavar, se obtuvo una solución transparente (150 mL) que contenía ~12 g/L de pravastatina y 3.8 g/L de compactina. Esta solución se extrajo tres veces con agua (3 x 150 mL) a pH 6. El pH se ajustó con amoníaco al 25%. Las fases acuosas y orgánicas se analizaron por HPLC (Tabla 3). Tal como se puede calcular, después de la segunda retroextracción, el rendimiento de extracción total de la pravastatina en las fases acuosas combinadas fue del 97.6% de pravastatina y, después de la tercera retroextracción, el rendimiento de extracción total de la pravastatina en las fases acuosas combinadas fue del 99.6%. La proporción de pravastatina:compactina fue de 3:1 en la mezcla de partida, 45:1 después de una retroextracción, 25:1 después de dos retroextracciones y 17:1 después de tres retroextracciones.

25 Tabla 3 Retroextracción en modo de corriente cruzada con acetato de isobutilo a pH 6

Extracción	Fase acuosa			Fase orgánica			Coeficiente de distribución		Rendimiento de extracción	
	Vol (mL)	Prava (área)	Comp (área)	Vol (mL)	Prava (área)	Comp (área)	Prava	Comp	Prava (%)	Comp (%)
1. <sup>a</sup>	150	188.6	4.2	150	39.1	67.8	4.8	0.06	82.8	5.8
2. <sup>a</sup>	155	40.3	4.9	145	6.8	70.2	5.9	0.07	86.3	7.0
3. <sup>a</sup>	150	6.5	4.7	145	1.2	67.6	5.2	0.07	84.4	6.8

El coeficiente de distribución se define como  $C_{\text{fase acuosa}}/C_{\text{fase orgánica}}$ , donde C representa la concentración del componente en cuestión; Prava = pravastatina; Comp = compactina.

**Ejemplo 4****Separación de la pravastatina y la compactina mediante retroextracción discontinua en varios pasos y en modo de corriente cruzada con acetato de etilo a pH 5.9**

5 El material de partida para este experimento fue filtrado de caldo obtenido tras la ultrafiltración de caldo obtenido por fermentación del transformante T1.48 de *Penicillium chrysogenum* como se describe en el Ejemplo 4 de WO 2007/147827 utilizando una membrana de polisulfona de 50 nm. El filtrado (5.25 litros que contenían 1.2 g/L de pravastatina y 0.37 g/L de compactina) se extrajo dos veces con acetato de etilo (2 x 2.5 litros) a pH 4. Para que hubiera una separación clara de las fases, las fases orgánicas se filtraron a través de un filtro de placa Seitz Z-2000. Los rendimientos de extracción fueron del 90.6% y del 8.3%, respectivamente, de modo que el rendimiento de extracción global fue del 98.9%.

10 Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (2.5 litros) para obtener un extracto de acetato de etilo (4.65 litros, rendimiento del paso de lavado del 97%) que se concentró hasta 250 mL al vacío a  $T < 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  para obtener una solución transparente que contenía ~25 g/L de pravastatina. Esta solución se extrajo tres veces con agua (3 x 250 mL) a pH 5.9. El pH se ajustó con hidróxido de sodio 4 N. Las fases acuosas y orgánicas se analizaron por HPLC (Tabla 4). Tal como se puede calcular, después de la segunda retroextracción, el rendimiento de extracción total de la pravastatina en las fases acuosas combinadas fue del 91% de pravastatina y, después de la tercera retroextracción, el rendimiento de extracción total de la pravastatina en las fases acuosas combinadas fue del 96%. La proporción de pravastatina:compactina fue de 3:1 en la mezcla de partida, 26:1 después de una retroextracción, 19:1 después de dos retroextracciones y 17:1 después de tres retroextracciones.

20 Tabla 4 Retroextracción en modo de corriente cruzada con acetato de etilo a pH 5.9

Extracción	Fase acuosa			Fase orgánica			Coeficiente de distribución		Rendimiento de extracción
	Vol (mL)	Prava (área)	Comp (área)	Vol (mL)	Prava (área)	Comp (área)	Prava	Comp	Prava (%)
1. <sup>a</sup>	280	51.3	2.0	225	34.2	26.5	1.5	0.08	65.1
2. <sup>a</sup>	280	20.7	1.7	195	11.0	27.5	1.9	0.06	73.0
3. <sup>a</sup>	275	4.5	0.8	165	6.4	31.1	0.7	0.03	53.9

El coeficiente de distribución se define como  $C_{\text{fase acuosa}}/C_{\text{fase orgánica}}$ , donde C representa la concentración del componente en cuestión; Prava = pravastatina; Comp = compactina.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para purificar la pravastatina que comprende extraer una solución que comprende pravastatina en un disolvente inmiscible en agua con agua o una solución acuosa, caracterizado por que dicha extracción se lleva a cabo a un pH comprendido entre 5.0 y 6.5 y por que dicho disolvente inmiscible en agua es una acetato o una cetona.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además aislar la pravastatina de la fase acuosa obtenida después de dicha extracción.
- 10 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde dicho pH está comprendido entre 5.5 y 6.5.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho acetato se selecciona entre la lista compuesta por acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de metilo y acetato de propilo, y dicha cetona es cetona isobutil metílica.
- 15 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde dicha extracción se lleva a cabo en un modo a contracorriente o en un modo de corriente cruzada.