

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 601**

51 Int. Cl.:

C07H 17/08 (2006.01)

C12P 17/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2009** **E 09728388 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013** **EP 2271655**

54 Título: **Pentamicina altamente pura**

30 Prioridad:

01.04.2008 EP 08006703

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.02.2014

73 Titular/es:

LUMAVITA AG (100.0%)
Engelgasse 77
4052 Basel, CH

72 Inventor/es:

REUTER, KARL;
MEIER, VIKTOR;
STOLZ, FLORIAN;
KRIMMER, DIETER y
WINNINPS, CEES

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 441 601 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

Pentamicina altamente pura.

5 **Campo de la invención**

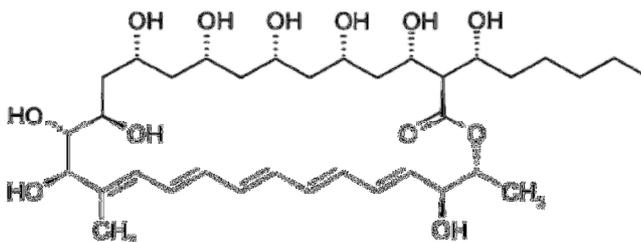
La invención se refiere a la pentamicina altamente pura, a determinados polimorfos y solvatos de pentamicina, a procedimientos para su preparación y a un procedimiento para disminuir la tasa de degradación de pentamicina pura en más del 95%.

10

Antecedentes de la invención

La pentamicina, al igual que la anfotericina B y la nistatina A1, pertenece a la clase de antibióticos macrólidos poliénicos que presentan actividad antifúngica. La pentamicina puede obtenerse de fuentes naturales, por ejemplo puede aislarse de determinadas cepas de *Streptomyces*, como el micelio del actinomiceto *Streptomyces penticus* tal como se describe por S. Umezawa y Y. Tanaka en J. Antibiotics, Ser. A, vol. XI, n.º 1, páginas 26 a 29 (1958), o del *Streptomyces roseo luteus* (NRRL 2776, NCIB 8984) tal como se describe en la patente británica 884711 concedida a Glaxo. Dicha patente se refiere a la producción del antibiótico lagosina que se ha mostrado en el artículo de Pandey *et al.* mencionado a continuación en J. Antibiotics vol. XXXV n.º 8, páginas 988-996 (1982) que es idéntico a fungicromina y cogomicina. Se afirma en dicha patente británica, página 2, columna derecha, líneas 48-49, que la lagosina, tanto como un sólido como en disolución, es sensible a la luz.

La configuración absoluta de pentamicina (= fungicromina) se determinó mediante comparación espectral de los productos de degradación y síntesis parcial por T. Oishi, Pure & Appl. Chem., vol. 61, n.º 3, págs. 427-430 (1989). Según un análisis de rayos X publicado por Y. Igarashi *et al.* en J. Antibiot. vol. 58, n.º 8, págs. 523-525 (2005) pentamicina presenta la siguiente fórmula



Tal como se establece por ejemplo en la página 478, columna izquierda, de un artículo de David R. Worthen *et al.*, Drug Development and Industrial Pharmacy, vol. 27(4), 277-286 (2001) "la producción y purificación de antifúngicos poliénicos se frustran por su inestabilidad química inherente. Los polienos normalmente poseen una o varias funcionalidades estructurales potencialmente inestables, incluyendo hemiacetales, acetales y ésteres hidrolizables, así como sistemas de polieno conjugados vulnerables a la oxidación (19). Por tanto, todos los antifúngicos poliénicos, hasta cierto punto, se someten a inactivación o degradación directa por las condiciones encontradas de manera rutinaria durante su producción y recuperación del cultivo en masa. Las más notable de estas condiciones potencialmente degradativas incluyen humedad, temperatura elevada, oxígeno atmosférico, metales polivalentes y exposición a la luz (19, 20)." Las referencias 19 y 20 mencionadas en dicho artículo son (19) I. M. Teresin, Poliene Antibiotics-Present and Future; University of Tokyo Press: Tokio, 1976; 122-123, y (20) K. Thoma y N. Kubler, Photostability of antifungal agents. 2. Photostability of polyene antibiotics. Pharmazie vol. 52, 294-302 (1997).

El artículo de Worthen mencionado anteriormente continúa afirmando en la página 478, columna izquierda, que "lo que complica adicionalmente la purificación del polieno es el hecho de que prácticamente todos los aislados de polieno en bruto de *Streptomyces* contienen varias isoformas distintas, aunque fisicoquímicamente similares, pudiendo ser sólo una de ellas deseable para la utilización clínica."

Por lo tanto, no resulta sorprendente que a la pentamicina también se le dieran otros tres nombres, es decir lagosina, fungicromina y cogomicina porque inicialmente se pensaba que eran sustancias diferentes. Tal como afirman R. C. Pandey *et al.*, J. Antibiotics vol. XXXV n.º 8, páginas 988-996 (1982) en el resumen "Se muestra por ... que los tres antibióticos macrólidos poliénicos, fungicromina, lagosina y cogomicina, que se ha descrito anteriormente que presentan algunas diferencias estereoquímicas en uno o más centros, son idénticos en todos los aspectos, incluyendo los aspectos estereoquímicos. Las diferencias observadas antes en sus propiedades se han atribuido ahora a cantidades variables de impurezas que pueden separarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Los tres antibióticos contienen un componente mayoritario y varios componentes minoritarios" (se añade énfasis). En la tabla I en la página 988 de dicho artículo de Pandey, los puntos de fusión, notificados de la bibliografía facilitados para fungicromina, lagosina y cogomicina oscilan entre 190 y 240°C.

El Índice Merck (12ª edición) en la entrada n.º 4312 en la página 727 menciona que el punto de fusión de fungicromina es de 157-162°C (descomposición).

El objeto del artículo de Pandey es la comparación fisicoquímica y biológica de dichos tres antibióticos macrólidos, no proporcionar pentamicina pura en más del 95%. Tal como se afirma en la página 995 del mismo al comienzo de la "Discusión", no fue posible eliminar todos los componentes minoritarios ni siquiera tras purificación de CCD (distribución a contracorriente) repetida. En la tabla 2 en la página 990, se facilita que los puntos de fusión de fungicromina, lagosina y cogomicina así purificados oscilan entre 157 y 165°C. En el segundo párrafo de dicha "Discusión" se afirma con respecto a la HPLC que la separación óptima de fungicromina, lagosina y cogomicina de impurezas se lograba utilizando metanol-agua (60:40) como fase móvil. Cuando se reducía la razón de metanol con respecto a agua, los picos devenían muy anchos y el tiempo de retención aumentaba; un aumento en la razón reducía el tiempo de retención, dificultando la separación. Tal como resulta evidente a partir de la columna derecha de la tabla 2 del artículo de Pandey, el tiempo de retención de fungicromina, lagosina y cogomicina es de 6,00 minutos en una HPLC en las condiciones descritas de manera idéntica en la página 992, líneas 3 y 4, página 990, nota al pie de página 4 a la tabla 2, y el antepenúltimo párrafo en la página 989, es decir utilizando una columna de fase inversa C18 µBondapak (DI 3,9 mm x 30 cm), detector UV (357 nm), sistema de disolventes de metanol - agua (60:40) y velocidad de flujo de 1,5 ml/minuto.

Se ordenó en el contexto de la presente invención un ensayo realizado por una tercera parte en el que se intentó purificar pentamicina en bruto, es decir pura en aproximadamente el 92% en las condiciones descritas en el artículo de Pandey. Una vez que se había evaporado la fracción de eluato que contenía pentamicina y vuelto a examinar en las mismas condiciones de HPLC que se utilizaron anteriormente, sólo se aisló pentamicina con una pureza de aproximadamente el 90%. El cromatograma de HPLC de la pentamicina aislada reveló un 9,5% de una nueva impureza que no estaba presente en la pentamicina en bruto. De acuerdo con este hallazgo está que no se afirma en ninguna parte del artículo de Pandey que la pentamicina se hubiera aislado tras separación por HPLC o que se hubiera cristalizado. Los únicos puntos de fusión (¡que oscilan desde 157 hasta 240°C!) facilitados en el artículo de Pandey son los que provienen de fuentes bibliográficas en la tabla 1 y los que provienen de la distribución a contracorriente en la tabla 2. En conclusión, las condiciones de HPLC dadas a conocer en el artículo de Pandey no pueden utilizarse para obtener pentamicina pura en más del 95% tras el aislamiento.

Debe apreciarse que la pentamicina es una molécula comparativamente grande y estructuralmente complicada que contiene 12 centros asimétricos, de modo que se encuentran 2^{12} (= 4096) estereoisómeros. Además, la pentamicina contiene 5 dobles enlaces que podrían someterse a isomerización cis-trans. La síntesis química total del correcto de los posibles 4096 estereoisómeros se prolongaría años, siendo una invención en sí misma y, desde un punto de vista económico, sería demasiado costosa en comparación con la biosíntesis realizada por las cepas de *Streptomyces* mencionada anteriormente, teniendo en cuenta que la estabilidad de la pentamicina es muy delicada.

La delicada estabilidad de la pentamicina es evidente por ejemplo a partir de R. W. Rickards *et al.*, J. Antibiotics vol. XXIII, n.º 12, páginas 603-611, que describe la autooxidación aérea de lagosina en disolución de metanol mediante un procedimiento de adición de radicales que pueden inhibirse mediante antioxidantes. Según Rickards *et al.* los principales productos de autooxidación primaria de lagosina son determinados epóxidos, mientras que la autooxidación prolongada conduce a productos de oxidación superiores y en última instancia a materiales poliméricos. De pleno acuerdo con las afirmaciones en el artículo de Worthen mencionado anteriormente, Rickards *et al.* afirman en la página 603 que miembros del subgrupo de polieno de los antibióticos macrólidos "como un todo son inestables, y la exposición a ácidos, álcalis, calor, aire o luz, va acompañada por descomposición y pérdida de actividad biológica. En particular, esta sensibilidad al aire y a la luz, que está asociada principalmente con el cromóforo poliénico, crea problemas en el almacenamiento antes de la utilización clínica."

La patente británica 884711 mencionada anteriormente afirma en el ejemplo 1 en la página 8, línea 41, que se obtuvo "lagosina pura". Dicho ejemplo 1 describe la recuperación de lagosina del caldo de fermentación que comprende las etapas de extraer los cortes del caldo de fermentación con butanol, concentrar el extracto, añadir agua, lavar con dietil éter, filtrar, extraer con metanol en un extractor Soxhlet y filtrar, tras lo cual, según la página 8, líneas 33 y 35, de la patente británica, se obtiene lagosina en una pureza de "aproximadamente el 75%". Con el fin de eliminar supuestamente las impurezas, la lagosina pura en el 75%, tal como se describe en la página 8, líneas 34 a 42, se extrae en un extractor Soxhlet con cloroformo, se seca al aire, se extrae con etil éter, se seca al aire y vuelve a extraerse con metanol. Al enfriar el metanol durante la noche se obtiene supuestamente "lagosina pura", pero no se proporciona el punto de fusión.

Para un experto en la materia que lea el fragmento anterior en la patente británica, resulta extremadamente dudoso que mediante los procedimientos descritos anteriormente, pudiera purificarse de hecho adicionalmente la lagosina pura en el 75%. Esto se debe a que el tratamiento con dietil éter y metanol ya se ha efectuado antes sin aumentar la pureza de lagosina por encima del 75%. Por tanto, ¿por qué una repetición de dicho tratamiento aumenta la pureza sustancialmente? Además, se esperaría que las etapas de secar lagosina en aire condujeran a oxidación tal como se describe por Rickards *et al.* (véase anteriormente). Finalmente, la cristalización de pentamicina en bruto en metanol no produce pentamicina pura en más del 95% (incluso con cristalizaciones repetitivas tres veces) tal como se pone de manifiesto por el ejemplo 8 de la presente solicitud. Esto se debe, tal como descubrieron los presentes

inventores, determinadas impurezas cristalizan junto con la pentamicina y, por tanto, no pueden eliminarse mediante cristalización, sino sólo mediante otros medios tal como se describe en la presente invención. Debe tenerse en cuenta que la pentamicina es una molécula comparativamente grande de modo que las impurezas pueden distinguirse de la pentamicina sólo por una diferencia pequeñísima, por ejemplo epoxidación de uno de los cinco
 5 dobles enlaces. Ciertamente, la separación de compuestos que están estructuralmente tan próximos entre sí plantea enormes problemas. Aunque ya podría esperarse a partir de lo anterior que no puede obtenerse lagosina "pura" mediante el procedimiento del ejemplo 1 de la patente británica 884.711, los solicitantes de la presente invención ordenaron que un instituto externo repitiera el procedimiento descrito en dicho ejemplo lo más rigurosamente posible. El resultado se describe en el ejemplo 10 de la presente solicitud. Tal como se esperaba, aunque la pureza
 10 de "aproximadamente el 75%" para el material intermedio podría confirmarse de manera aproximada (encontrado: 67,3%), las etapas de purificación adicionales no produjeron pentamicina "pura", sino sólo pentamicina en una pureza del 70,1%.

La pentamicina era el principio activo en un fármaco registrado en los años 1980 con el nombre comercial Pentacin® en Suiza, pero debido a dificultades en el cumplimiento de las especificaciones del producto registrado para pureza y estabilidad (incluso cuando la formulación comercializada contenía un antioxidante), se retiró del mercado. Según la especificación en los documentos de registro suizos, la pureza de pentamicina era del 95%. Sin embargo, cuando se utilizan los medios de análisis modernos disponibles actualmente, resulta ahora que varias impurezas presentes en pentamicina tal como se registró en el pasado no se habían detectado y que, por tanto, la pureza real de
 15 pentamicina en el pasado era muy inferior al 95%.

La propia pentamicina presenta una parte lipófila y una parte muy hidrófila y por tanto se comporta de manera similar a un tensioactivo. Además es relativamente insoluble en agua y tiende a formar geles, que son casi imposibles de filtrar.
 25

Pese a los esfuerzos exhaustivos, no se pudo aumentar la pureza de pentamicina por encima del 93% durante mucho tiempo. De hecho, el umbral de pureza del 93% pareció ser insuperable hasta la presente invención.

El problema que ha de resolverse en el contexto de la presente invención es aumentar la pureza de pentamicina por encima del 93%, especialmente por encima del 95%, y llevar a la pentamicina a una forma estable suficiente para permitir su reintroducción en el mercado farmacéutico en Suiza y su registro como fármaco en otros países.
 30

Breve descripción de las figuras

- 35 La figura 1 muestra una fotografía del solvato de pentamicina:morfolina (1:1) en forma de agujas.
 La figura 2 muestra una fotografía del solvato de pentamicina:morfolina (1:1) en forma de escamas.
 40 La figura 3 muestra un diagrama de difracción de polvo del solvato de pentamicina:morfolina (1:1) en forma de agujas.
 La figura 4 muestra un espectro de difracción de rayos X de polvo del solvato de pentamicina:morfolina (1:1) en forma de escamas.
 45 La figura 5 muestra un diagrama de difracción de rayos X de polvo del polimorfo A de pentamicina.
 La figura 6 muestra una fotografía del polimorfo A de pentamicina.
 La figura 7 muestra el diagrama de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del polimorfo A de pentamicina.
 50 La figura 8 muestra la DSC de la pentamicina amorfa.
 La figura 9 muestra un diagrama de difracción de rayos X de polvo de la pentamicina amorfa.
 55 La figura 10 muestra la DSC (arriba) y rayos X (abajo) del polimorfo C de pentamicina.
 La figura 11 muestra un diagrama de difracción de rayos X de polvo (arriba) y DSC de la pentamicina en bruto.
 La figura 12 muestra un cromatograma de líquidos de alta presión (HPLC) de la pentamicina en bruto.
 60 La figura 13 muestra un diagrama de DSC (arriba) y de difracción de rayos X de polvo (abajo) de la pentamicina registrados tras tres cristalizaciones en metanol tal como se describe en J. Antibiotics, ser. A, vol. XI, n.º 1, enero de 1958, págs. 26-29.
 65 La figura 14 muestra una HPLC de la pentamicina registrada tras tres cristalizaciones en metanol tal como se describe en J. Antibiotics, ser. A, vol. XI, n.º 1, enero de 1958, págs. 26-29.

Descripción de la invención

Tras largos e inicialmente infructuosos esfuerzos, en el contexto de la presente solicitud de patente se ha descubierto sorprendentemente cómo puede prepararse pentamicina en una pureza que supera el 93%, especialmente que supera el 96% y estabilizada satisfactoriamente frente a degradación.

Se descubrió en el contexto de la presente invención que determinadas impurezas parecen cristalizar junto con pentamicina en la misma red cristalina de modo que la purificación adicional mediante cristalización demostró ser imposible. Tal como se muestra en el ejemplo 8, incluso tras tres cristalizaciones consecutivas de pentamicina en bruto en metanol, el producto obtenido todavía contiene aproximadamente un 10% de impurezas. Dichas impurezas comprenden compuestos que son estructuralmente muy similares a pentamicina de modo que no pueden eliminarse todas mediante medios convencionales sencillos, por ejemplo diversos epóxidos de pentamicina, derivados de pentamicina en los que un grupo hidroxilo está sustituido por un grupo oxo o se metila a un grupo metoxilo, derivados de pentamicina en los que se reduce un doble enlace a un enlace sencillo, derivados de pentamicina que contienen un anillo de tetrahidropirano y/o, potencialmente, estereoisómeros de pentamicina.

Se ha descubierto que la pentamicina forma determinados solvatos con pequeños heterociclos polares seleccionados de morfolina (razón molar 1:1), N-metilpirrolidona (NMP; razón molar 1:1) y N-etilpirrolidona (NEP), preferiblemente en disolventes alcohólicos como metanol o etanol, y que algunos de estos solvatos, por ejemplo los solvatos con NMP y especialmente morfolina, presentan propiedades útiles, es decir pueden utilizarse sorprendentemente para purificar pentamicina por encima del umbral del 93% cuando se preparan en metanol o etanol, pero según la presente experiencia, no en disolventes no polares, como metil terc-butil éter (MTBE) o tolueno. En la presente memoria, el término "solvato" ha de entenderse que comprende también un cocrystal, puesto que la diferencia entre un solvato y un cocrystal reside meramente en si el pequeño heterociclo polar mencionado anteriormente es líquido o sólido a temperatura ambiente.

Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de pentamicina en una pureza química que supera el 93%, preferiblemente el 95%, más preferiblemente el 96% y todavía más preferiblemente el 97% en peso y a determinados solvatos y polimorfos de pentamicina y a su utilización para purificar y/o estabilizar pentamicina.

Se realizó un alto número de experimentos de cristalización en los que se disolvió pentamicina por ejemplo en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y N-metilpirrolidona (NMP). A la disolución así obtenida se añadieron entonces antidisolventes hasta que se produjo la cristalización, significando antidisolventes, disolventes en los que pentamicina es considerablemente menos soluble, como metanol, etanol, isopropanol, acetona, acetato de etilo o acetonitrilo. También se sometieron a prueba las cristalizaciones de pentamicina disuelta en un alto volumen de antidisolventes, como metanol.

Durante el transcurso de dichos experimentos de cristalización se descubrió que la pentamicina forma solvatos con morfolina y N-metilpirrolidona, pero no con DMSO, y que dichos solvatos pueden utilizarse sorprendentemente para reducir las impurezas cocrystalizando con pentamicina a modo de recristalización repetida de dichos solvatos.

Un procedimiento de eliminación de las impurezas que cocrystalizan con pentamicina es preparar y cristalizar de manera sucesiva un solvato de pentamicina con morfolina que cristaliza en primer lugar en forma de agujas (véase la figura 1), a continuación transformar el solvato de morfolina polimórfico en forma de agujas en un solvato de morfolina que cristaliza en forma de escamas (véase la figura 2) y a continuación eliminar la morfolina. En comparación con el solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas, el solvato en forma de agujas es menos adecuado para la purificación. Según la experiencia experimental (todavía limitada) obtenida hasta el momento, no puede purificarse por encima de un umbral muy superior al 93% mediante recristalizaciones. Por tanto, el solvato en forma de agujas se transforma lo antes posible en el solvato en forma de escamas, por ejemplo, mediante la adición de cristales simiente del solvato en forma de escamas. La preparación sucesiva de los solvatos de morfolina en forma de agujas y de escamas puede realizarse en una sola etapa. La preparación de los solvatos de morfolina se lleva a cabo preferiblemente bajo gas de protección, como nitrógeno, protegido de la luz y en presencia de un antioxidante, como hidroxianisol butilado (BHA) o, preferiblemente, hidroxitolueno butilado (BHT), es decir 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol. La cristalización se lleva a cabo preferiblemente en disolventes polares adecuados, como un alcohol adecuado, por ejemplo un alcohol adecuado, por ejemplo etanol o lo más preferiblemente metanol. Con alcoholes más largos y disolventes no polares, por ejemplo tolueno, MTBE, etc. casi no se logra efecto de purificación. La morfolina como único disolvente tampoco es ventajosa, porque la solubilidad de pentamicina es demasiado alta en morfolina. La purificación mediante formación del solvato de morfolina en forma de escamas se repite tantas veces como sea necesario para obtener la pureza deseada.

El aumento de la cantidad de morfolina con respecto a pentamicina en el sistema de disolventes acelera la transformación del polimorfo en forma de agujas en el polimorfo en forma de escamas. Tal como se afirmó anteriormente, dicha transformación también puede acelerarse añadiendo cristales simiente del polimorfo en forma de escamas.

La invención se refiere a un procedimiento de purificación de pentamicina en bruto a través de la formación de su solvato de morfolina en forma de escamas (razón molar 1:1 de pentamicina y morfolina) agitando una mezcla de pentamicina en bruto, un alcohol adecuado, como especialmente un alcohol inferior, como etanol o, preferiblemente metanol, morfolina, y un antioxidante adecuado, como BHT, a una temperatura preferiblemente entre 5 y 50°C, preferiblemente a temperatura ambiente, ventajosamente bajo un gas protector, como nitrógeno, hasta que el solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas ha cristalizado, aislándolo, por ejemplo mediante filtración y lavando con un alcohol inferior, como metanol y, si se desea, purificando adicionalmente el solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas obtenido repitiendo el procedimiento anterior una o más veces utilizando el solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas obtenido en lugar de la pentamicina en bruto.

La invención se refiere también a un procedimiento de purificación de pentamicina en bruto a través de la formación de su solvato de NMP agitando una mezcla de pentamicina en bruto, un alcohol adecuado, como especialmente un alcohol inferior, como etanol o, preferiblemente metanol, N-metilpirrolidona (NMP), y un antioxidante adecuado, como BHT, a una temperatura preferiblemente entre aproximadamente 5 y 50°C, preferiblemente a temperatura ambiente, ventajosamente bajo un gas protector, como nitrógeno, hasta que el solvato de NMP ha cristalizado, aislándolo, por ejemplo mediante filtración y lavando con un alcohol inferior, como metanol, y, si se desea, purificando adicionalmente el solvato de NMP obtenido repitiendo el procedimiento anterior.

Mediante el procedimiento anterior utilizando el solvato de NMP, puede eliminarse una de dos impurezas que cocrystalizan con pentamicina, es decir la impureza (imp) a un tiempo de retención relativo (trr) de 1,54 (en el sistema de HPLC descrito en la presente memoria), mientras que la otra impureza a trr de 0,83 sólo puede reducirse hasta un nivel del 3,3%.

La morfolina y la NMP se eliminan de los respectivos solvatos de pentamicina agitando los solvatos durante varias horas en metanol o preferiblemente etanol, por ejemplo a una temperatura entre 0°C y +50°C, preferiblemente a temperatura ambiente, filtrando los cristales obtenidos, lavándolos con metanol o preferiblemente etanol y, si se desea, repitiendo el procedimiento hasta que el producto obtenido comprenda menos del 0,1% de morfolina o NMP.

La morfolina o la NMP residuales pueden eliminarse mediante cristalización en DMSO/etanol o DMSO/metanol, por lo que se obtiene el polimorfo A de pentamicina.

Se descubrió que la pentamicina existe en una forma amorfa (véanse la figura 8 y la figura 9) y varias otras formas además de la forma A, a continuación en la presente memoria denominadas polimorfos B a E. En comparación con los otros polimorfos, el polimorfo A se distingue en la difracción de rayos X de polvo por líneas en los siguientes ángulos 2θ (\pm aproximadamente $0,2^\circ$): 2,28, 7,38 y 20,16, el polimorfo B da lugar a líneas en 9,54, 21,28 y 22,32, el polimorfo C presenta una línea característica en 7,04, el polimorfo D presenta una línea característica en 2,58, el polimorfo E presenta una línea característica, aunque no muy intensa, en 3,32, y la pentamicina en bruto (véanse la figura 11 y la figura 12) muestra líneas características en 8,84 y 13,14. Cuando se comparan los ángulos 2θ mencionados anteriormente (\pm aproximadamente $0,2^\circ$): 2,28, 7,38 y 20,16 para el polimorfo A con los valores correspondientes en el ejemplo 7, es decir 2,22, 7,29 y 20,17, la pequeña discrepancia es evidente. Se debe a que las cifras respectivas proceden de mediciones diferentes. Las diferencias, sin embargo, están completamente comprendidas dentro del error experimental aceptado internacionalmente para ángulos 2θ de $\pm 0,2^\circ$.

El polimorfo A cristaliza por ejemplo en una disolución de pentamicina en dimetilsulfóxido (DMSO) tras añadir acetato de etilo.

La pentamicina amorfa se obtiene por ejemplo a partir de una disolución de pentamicina en dimetilsulfóxido (DMSO) tras añadir acetonitrilo.

El polimorfo B cristaliza en metanol/cloroformo.

El polimorfo C (véase la figura 10) se obtiene añadiendo metanol a una disolución de pentamicina en dimetilformamida a 60°C, añadiendo etanol y enfriando hasta 0°C.

El polimorfo E cristaliza en dimetilsulfóxido/acetonitrilo.

El polimorfo A parece ser el polimorfo más termodinámicamente estable. Su diagrama de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (representado en la figura 7) muestra una única señal. En comparación con el mismo, los diagramas de DSC de los otros polimorfos cristalinos muestran más de una señal (véase por ejemplo la DSC del polimorfo C en la figura 10), indicando por tanto transiciones hacia otras formas polimórficas cuando se aumenta gradualmente la temperatura. La calidad más sorprendente y bastante imprevisible del polimorfo A puro es su estabilidad en la exposición al aire (véase el ejemplo 9) que es bastante en comparación con todas las formas de pentamicina pura conocidas hasta el momento.

Las formas altamente puras de pentamicina de la presente invención, como especialmente el polimorfo A de pentamicina en una pureza química que supera el 95%, pueden utilizarse en un procedimiento de tratamiento de animales de sangre caliente, incluyendo preferiblemente mamíferos y especialmente seres humanos, por ejemplo en forma de formulaciones farmacéuticas para utilización tópica, por ejemplo supositorios vaginales, para tratar infecciones vaginales y de la mucosa producidas por *Candida*, especialmente *Candida albicans*, y *Trichomonas vaginalis*.

Dichas formulaciones farmacéuticas para utilización tópica, por ejemplo supositorios vaginales, comprenden por ejemplo pentamicina en una concentración del 0,1 al 5% en peso, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables y contienen desde 3 mg hasta 150 mg de pentamicina por unidad de dosificación, es decir supositorio. Los supositorios vaginales se suministran por ejemplo a mujeres de aproximadamente 60 kg de peso corporal 1-2 veces al día.

Resumiendo, la presente invención se refiere a la pentamicina en una pureza química que supera el 96%, preferiblemente en una pureza química que supera el 97%, especialmente en forma de polimorfo A en una pureza química que supera el 96%, preferiblemente el 97%, caracterizada por los siguientes valores de 2 theta, \pm aproximadamente $0,2^\circ$, de las líneas más intensas en el espectro de difracción de rayos X de polvo, proporcionándose las intensidades relativas sólo como indicación aproximada:

ángulo 2 theta	intensidad relativa						
2,22	100	7,29	33	9,25	15	19,78	51
20,17	52	20,62	25	21,24	17		

La presente invención se refiere además a pentamicina en forma de un solvato adecuado para purificación de pentamicina con un compuesto heterocíclico de bajo peso molecular seleccionado de N-metilpirrolidona, N-etilpirrolidona y preferiblemente morfolina, como el solvato de morfolina en forma de agujas, o preferiblemente el solvato de morfolina en forma de escamas, especialmente a tal solvato en una pureza química que supera el 95%, el 96%, o preferiblemente el 97%, especialmente el solvato de morfolina en forma de escamas que presenta los siguientes valores de 2 theta, \pm aproximadamente $0,2^\circ$, de las líneas más intensas en el espectro de difracción de rayos X de polvo, proporcionándose las intensidades relativas sólo como indicación aproximada:

Ángulo 2 theta	Intensidad relativa	Ángulo 2 theta	Intensidad relativa	Ángulo 2 theta	Intensidad relativa
9,73	41,5	21,49	68,5	28,95	12,0
10,29	17,1	22,08	16,5	29,33	12,2
12,99	14,0	22,47	26,9	30,32	10,8
15,04	24,7	23,02	24,5	34,02	10,1
16,01	15,1	24,06	13,4	35,24	12,1
17,29	19,3	25,21	10,7	35,81	11,5
18,29	18,2	25,91	16,0	36,37	10,7
19,26	28,0	26,55	18,5	37,42	13,1
20,03	92,3	27,79	12,7	37,91	12,6
20,67	100,00	28,09	12,7	39,39	14,1

La presente invención se refiere además a la utilización de los solvatos de pentamicina mencionados anteriormente para la purificación química de pentamicina.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la purificación de pentamicina hasta más del 95% transformando la pentamicina en una pureza química inferior al 93% en un solvato adecuado, especialmente uno de los solvatos mencionados anteriormente, purificando dicho solvato mediante cristalización y liberando la pentamicina del solvato, por ejemplo mediante agitación prolongada en un alcohol C₁₋₅, llevándose a cabo dicho procedimiento de purificación, si se desea, en presencia de un antioxidante adecuado, como preferiblemente 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para disminuir significativamente la tasa de degradación de pentamicina en una pureza química que supera el 95% transformándola en la forma de su polimorfo A, especialmente a tal procedimiento en el que la transformación en el polimorfo A se efectúa cristalizándola en una disolución de pentamicina pura en más del 95% en dimeilsulfóxido tras añadir acetato de etilo.

Descripción detallada de los experimentos

Los espectros de rayos X de polvo se registran en un difractómetro Miniflex de Rigaku (radiación K α de cobre, intervalo de registro 2-40° [2 Theta], anchura de paso 0,02° [2 Theta], intervalo de registro 0,0083° [2 Theta], recipiente de detector: silicio). El error experimental en los ángulos 2 Theta registrados es de aproximadamente

$\pm 0,2^\circ$. El error experimental en las intensidades relativas es alto. Por tanto, las intensidades relativas deben entenderse sólo como indicativas de manera aproximada.

5 Los siguientes ejemplos ilustran la invención. La abreviatura “trr” significa “tiempo de retención relativo”, es decir la razón entre el tiempo de retención neto de una impureza y el de una pentamicina en HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución). El término “trr imp” utilizado en los ejemplos significa el tiempo de retención de una impureza con respecto a pentamicina, es decir el trr de pentamicina es 1,00. Tiempos de retención relativos por debajo de 1,00 significan que la impureza se eluye antes que pentamicina, tiempos de retención relativos mayores de 1,00 significan que la impureza se eluye tras pentamicina. Por ejemplo “trr imp = 0,83: 8,0%” significa que hay una impureza en la cantidad del 8% a un tiempo de retención relativo de 0,83. Como es habitual en HPLC, los porcentajes de los compuestos detectados se expresan como porcentaje de área que refleja el área de la señal respectiva, es decir en el anterior ejemplo, el 8,0% son porcentaje de área.

15 La cromatografía de HPLC descrita en la presente memoria se lleva a cabo utilizando un sistema Agilent (marca comercial) 1100 o equivalente. La fase móvil comprende disoluciones A y B, siendo la disolución A agua:acetonitrilo:ácido trifluoroacético en la razón 650:350:0.01 (v:v:v), siendo la disolución B acetonitrilo:2-propanol:ácido trifluoroacético en la razón 750:250:0,01 (v:v:v).

20 La muestra que va a analizarse se disuelve en acetonitrilo:agua:tetrahidrofurano en la razón 1:1:2 (v:v:v) a lo que se añade el 0,1% (p:v) de BHT en acetonitrilo:agua:tetrahidrofurano en la razón 1:1:2 (v:v:v) y se somete a prueba en una concentración final de 0,6 mg/ml.

25 La HPLC se realiza en una columna Atlantis (marca comercial) de Waters, dC₁₈, RP, 250 x 4,6 mm, 5 μ m. Las columnas Atlantis dC₁₈ son una línea a base de sílice de columnas C₁₈ de fase inversa unidas de manera disfuncional. Se utilizan los siguientes parámetros:

Gradiente:

Tiempo [minutos]	Disolución A [% en volumen]	Disolución B [% en volumen]
0	100	0
6	100	0
10	77	23
16	77	23
17	40	60
22	40	60
23	100	0
30	100	0

30 Velocidad de flujo: 1,0 ml/min.
Temperatura: 40°C
Detección: 320 nm
Volumen de inyección: 5 μ l

35 Ejemplos

Ejemplo 1: solvato de pentamicina-morfolina en forma de agujas

40 A una mezcla de metanol (1,75 g) y morfolina (0,75 g) se le añaden hidroxitolueno butilado (BHT; 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) (4 mg) y pentamicina en bruto (500 mg; pureza química: 80,6%); contenido en pentamicina: 80%; trr imp = 0,83: 8,0%; trr imp = 1,54: 7,0%). El cromatograma de HPLC de la pentamicina en bruto muestra 2 picos principales producidos por impurezas. El primero presenta un tiempo de retención relativo (trr) de 0,83. Este pico consiste en (al menos) 2 impurezas diferentes con el mismo tiempo de retención. La cantidad total de estas 2 impurezas juntas es del 8%. La segunda impureza principal presenta un trr de 1,54 y la cantidad de esta impureza en el material de partida es del 7%.

45 Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 3 días. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 1 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-morfolina en forma de agujas (362 mg; pureza química: 86,2%; contenido en pentamicina: 75%; contenido en morfolina: 10%; trr imp = 0,83: 5,3%; trr imp = 1,54: 6,5%).

50 Tal como resulta evidente a partir de lo anterior, la cantidad de ambas impurezas a trr 0,83 y trr 1,54 se reduce en el solvato de pentamicina-morfolina en forma de agujas en comparación con la pentamicina en bruto utilizada como material de partida.

55

Ejemplo 2: solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (razón molar 1:1)

A una mezcla de metanol (1,5 g) y morfolina (1 g) se le añaden BHT (4 mg) y pentamicina en bruto (500 mg; pureza química: 80,6%; contenido en pentamicina: 80%; trr imp = 0,83: 8,0%; trr imp = 1,54: 7,0%). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 3 días. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 1 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (327 mg; pureza química: 90,9%; contenido en pentamicina: 82%; trr imp = 0,83: 4,3%; trr imp = 1,54: 3,0%) que contiene pentamicina y morfolina en una razón molar 1:1.

Nota: Tras un tiempo de agitación de 30 minutos se observa principalmente el polimorfo en forma de agujas al microscopio. Tras un tiempo de agitación de 3 días, la forma del cristal cambia a una forma de "escama".

Tal como resulta evidente a partir de lo anterior, la cantidad de ambas impurezas a trr 0,83 y trr 1,54 se reduce adicionalmente en el solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas en comparación tanto con la pentamicina en bruto utilizada como material de partida como con el polimorfo en forma de agujas descrito en el ejemplo 1.

En la figura 3 se representa el espectro de difracción de rayos X de polvo del polimorfo en forma de agujas del solvato de pentamicina-morfolina (razón molar 1:1).

Ejemplo 3: preparación del solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas utilizando cristales simiente

A una mezcla de metanol (11,52 g) y morfolina (7,68 g) se le añaden BHT (10 mg) y pentamicina en bruto (4,0 g; pureza química: 80,6%; contenido en pentamicina: 80%; trr imp = 0,83: 8,0%; trr imp = 1,54: 7,0%). Se siembra la mezcla con cristales simiente del solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (12 mg; polimorfo en escamas) y se agita a temperatura ambiente durante 10 h. Se añade entonces otra parte de la pentamicina en bruto (2,4 g) se añade y se agita la mezcla durante la noche. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (3 veces 3 ml) y se secan a presión reducida para producir pentamicina. (5,46 g; pureza química: 89,2%; contenido en pentamicina: 82%; trr imp = 0,83: 4,9%; trr imp = 1,54: 4,0%; rendimiento corregido por el contenido: 78%; rendimiento de teoría: 87%).

Ejemplo 4: purificación del solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas

A una mezcla de metanol (20,6 g) y morfolina (13,7 g) se le añaden BHT (4 mg) y solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (4,75 g; pureza química: 89,2%; contenido en pentamicina: 81%; trr imp = 0,83: 4,9%; trr imp = 1,54: 4,0%). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 2 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas purificado (3,45 g). Se añade una parte de este material (3,39 g) a una mezcla de metanol (10,8 g), morfolina (7,2 g) y BHT (4 mg). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 1 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas purificado adicionalmente (2,27 g; pureza química: 93,7%; contenido en pentamicina: 83%; trr imp = 0,83: 3,2%; trr imp = 1,54: 2,0%).

Ejemplo 5: recristalizaciones sucesivas del solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas

A una mezcla de metanol (1,5 g) y morfolina (1,0 g) se le añaden BHT (5 mg) y solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (385 mg; pureza química: 87,7%; contenido en pentamicina: 80%; trr imp = 0,83: 5,4%; trr imp = 1,54: 4,7%). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (3 veces 0,5 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (230 mg; pureza química: 94,5%; trr imp = 0,83: 3,0%; trr imp = 1,54: 1,5%).

A una mezcla de metanol (0,84 g) y morfolina (0,56 g) se le añaden BHT (3 mg) y solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (220 mg; pureza química: 94,5%; trr imp = 0,83: 3,0%; trr imp = 1,54: 1,5%). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (3 veces 0,5 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (144 mg; pureza química: 96,2%; trr imp = 0,83: 2,3%; trr imp = 1,54: 0,82%).

A una mezcla de metanol (0,6 g) y morfolina (0,4 g) se le añaden BHT (2 mg) y solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (244 mg; pureza química: 96%; trr imp = 0,83: 2,3%; trr imp = 1,54: 1,0%). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (3 veces 0,5 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (162 mg; pureza química: 96,6%; trr imp = 0,83: 1,9%; trr imp = 1,54: 0,7%).

A una mezcla de metanol (0,42 g) y morfolina (0,28 g) se le añaden BHT (2 mg) y solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (140 mg; pureza química: 96,6%; trr imp = 0,83: 1,9%; trr imp = 1,54: 0,7%). Se agita la

mezcla a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (3 veces 0,5 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas (89 mg; pureza química: 97,3%; trr imp = 0,83: 1,6%; trr imp = 1,54: 0,5%).

- 5 En la figura 4 se representa el espectro de difracción de rayos X de polvo del solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas obtenido (razón molar 1:1). Los ángulos 2 theta [grados], \pm aproximadamente $0,1^\circ$, e intensidades relativas [%] de las líneas más intensas son los siguientes:

Ángulo 2 theta	Intensidad relativa	Ángulo 2 theta	Intensidad relativa	Ángulo 2 theta	Intensidad relativa
9,73	41,5	21,49	68,5	28,95	12,0
10,29	17,1	22,08	16,5	29,33	12,2
12,99	14,0	22,47	26,9	30,32	10,8
15,04	24,7	23,02	24,5	34,02	10,1
16,01	15,1	24,06	13,4	35,24	12,1
17,29	19,3	25,21	10,7	35,81	11,5
18,29	18,2	25,91	16,0	36,37	10,7
19,26	28,0	26,55	18,5	37,42	13,1
20,03	92,3	27,79	12,7	37,91	12,6
20,67	100,00	28,09	12,7	39,39	14,1

- 10 Tal como resulta evidente a partir de lo expuesto anteriormente, la cantidad de ambas impurezas a trr 0,83 y trr 1,54 se reduce adicionalmente en el solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas purificado en comparación tanto con la pentamicina en bruto utilizada como material de partida, con el polimorfo en forma de agujas descrito en el ejemplo 1 como con el solvato de pentamicina-morfolina en forma de escamas en bruto descrito en el ejemplo 2.

15 **Ejemplo 6: solvato de pentamicina-N-metilpirrolidona (razón molar 1:1)**

Las etapas 6.1 a 6.8 muestran la preparación del solvato mencionado anteriormente y su purificación mediante cristalización repetida. Tal como resulta evidente a partir de las mismas, el trr imp = 1,54 se elimina de manera eficaz, pero el otro trr imp principal = 0,83 sólo puede reducirse hasta un nivel del 3,3%.

20 Etapa 6.1: preparación de solvato de pentamicina-NMP

A una mezcla de metanol (65 g) y N-metilpirrolidona (NMP; 65 g) se le añaden BHT (100 mg) y pentamicina en bruto (20 g; pureza química: 80,6%; contenido en pentamicina: 80%; trr imp = 0,83: 8,0%; trr imp = 1,54: 7,0%). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 horas. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 10 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-NMP (17,3 g; pureza química: 86,9%; contenido en pentamicina: 71%; trr imp = 0,83: 5,8%; trr imp = 1,54: 5,0%).

30 Etapa 6.2: Primera recristalización de solvato de pentamicina-NMP

A una mezcla de metanol (50 g) y NMP (50 g) se le añaden BHT (100 mg) y solvato de pentamicina-NMP de la etapa 6.1 (17,3 g; pureza química: 86,9%; contenido en pentamicina: 71%; trr imp = 0,83: 5,8%; trr imp = 1,54: 5,0%). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 10 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-NMP (9,7 g; pureza química: 91,5%; contenido en pentamicina: 81%; trr imp = 0,83: 4,3%; trr imp = 1,54: 2,9%).

40 Etapa 6.3: Segunda recristalización de solvato de pentamicina-NMP

A una mezcla de metanol (30 g) y NMP (30 g) se le añaden BHT (100 mg) y solvato de pentamicina-NMP de la etapa 6.2 (9,65 g). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 5 horas. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 10 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-NMP (7,5 g; pureza química: 93,5%; contenido en pentamicina: 83%; trr imp = 0,83: 3,8%; trr imp = 1,54: 1,9%).

45 Etapa 6.4: Tercera recristalización de solvato de pentamicina-NMP

A una mezcla de metanol (22 g) y NMP (22 g) se le añaden BHT (100 mg) y solvato de pentamicina-NMP de la etapa 6.3 (7,45 g). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 10 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-NMP (4,0 g; pureza química: 94,9%; contenido en pentamicina: 87%; trr imp = 0,83: 3,5%; trr imp = 1,54: 1,2%).

50

Etapa 6.5: Cuarta recrystalización de solvato de pentamicina-NMP

5 A una mezcla de metanol (12 g) y NMP (12 g) se le añaden BHT (50 mg) y solvato de pentamicina-NMP de la etapa 6.4 (3,6 g). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 3 días. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 5 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-NMP (2,78 g; pureza química: 95,8%; contenido en pentamicina: 86%; trr imp = 0,83: 3,3%; trr imp = 1,54: 0,5%).

Etapa 6.6: Quinta recrystalización de solvato de pentamicina-NMP

10 A una mezcla de metanol (8 g) y NMP (8 g) se le añaden BHT (50 mg) y solvato de pentamicina-NMP de la etapa 6.5 (2,5 g). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 4 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-NMP (3,1 g; pureza química: 95,8%; contenido en pentamicina: 71% (debido al disolvente residual); trr imp = 0,83: 3,3%; trr imp = 1,54: 0,4%).

Etapa 6.7: Sexta recrystalización de solvato de pentamicina-NMP

15 A una mezcla de metanol (6 g) y NMP (6 g) se le añaden BHT (50 mg) y solvato de pentamicina-NMP de la etapa 6.6 (2,3 g). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se filtran los cristales, se lavan con metanol (2 veces 3 ml) y se secan a presión reducida para producir solvato de pentamicina-NMP (1,6 g; pureza química: 96,0%; contenido en pentamicina: 88%; trr imp = 0,83: 3,3%; trr imp = 1,54: 0,3%).

Tal como resulta evidente a partir de la etapas 6.5 a 6.7, la cantidad de la impureza presente en el tiempo de retención relativo 0,83 permaneció en el 3,3% y no pudo reducirse adicionalmente.

Ejemplo 7: Preparación del polimorfo A de pentamicina a partir de solvato de pentamicina-morfolina

Al solvato de pentamicina de morfolina en forma de escamas (1,5 g; contenido en morfolina: 8%; pureza química: 97,2%) se le añaden etanol (13 g) y BHT (5 mg) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtran los cristales y se lavan con etanol (3 veces 2 ml). A los cristales se les añaden de nuevo etanol (13 g) y BHT (5 mg) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtran los cristales, se lavan con etanol (3 veces 2 ml) y se secan a presión reducida para producir pentamicina (1,1 g; contenido en morfolina: <0,1%; pureza química: 97,3%).

35 Se disuelve el producto obtenido en DMSO a 80°C bajo nitrógeno y se cristaliza mediante la adición lenta de metanol o etanol, enfriando hasta 0°C, filtrando los cristales obtenidos y lavándolos con metanol o etanol con lo cual se obtiene el polimorfo A de pentamicina. En la figura 6 se representa una fotografía de los cristales.

En la figura 7 se representa la DSC del polimorfo A de pentamicina (comienzo a 253,7; pico a 254,4°C).

40 En la figura 5 se representa el espectro de difracción de rayos X de polvo de polimorfo A de pentamicina.

Los ángulos 2 theta [grados], ± aproximadamente 0,2° e intensidades relativas [%] de las líneas más intensas son tal como se expone a continuación:

ángulo 2 theta	intensidad relativa						
2,22	100	7,29	33	9,25	15	19,78	51
20,17	52	20,62	25	21,24	17		

45

Ejemplo 8: Cristalizaciones repetidas de pentamicina en bruto en metanol

50 Se cristaliza pentamicina en bruto que presenta los rayos X, DSC y HPLC representados en la figura 11 y la figura 12, respectivamente, tres veces en metanol tal como se describe en J. Antibiotics, ser. A, vol. XI, n.º1, enero de 1958, págs. 26-29:

55 Se agitan 10 g de pentamicina en bruto en 600 ml de metanol en ebullición durante aproximadamente 15 minutos. Se filtra la disolución de metanol caliente y se calienta el filtrado de nuevo para reducir el volumen de metanol hasta que se produce precipitación. Tras enfriar a temperatura ambiente y el almacenamiento durante 30 minutos, se aísla el material sólido mediante filtración y se lava con 30 ml de metanol frío (4°C). Se seca la torta de filtro mediante evaporación a vacío 30 minutos tras alcanzar 16 mbar a temperatura de baño de agua de 40°. No se investiga la recuperación.

60 Se resuelven dos de tres partes de la primera cristalización en metanol en 400 ml de metanol en ebullición. Se calienta adicionalmente la disolución transparente con agitación para reducir el volumen de metanol hasta 150 ml. Tras enfriar a temperatura ambiente y almacenamiento durante 30 minutos, se aísla el material sólido mediante

filtración y se lava con 30 ml de metanol frío (4°C). Se seca la torta de filtro mediante evaporación a vacío 30 minutos tras alcanzar 16 mbar a temperatura de baño de agua de 40°. No se investiga la recuperación.

5 Se resuelven dos de tres partes de la segunda cristalización en metanol en 300 ml de metanol en ebullición. Se calienta adicionalmente la disolución transparente para reducir el volumen de metanol hasta aproximadamente 75 ml. Tras enfriar a temperatura ambiente y el almacenamiento durante 30 minutos, se aísla el material sólido mediante filtración y se lava con 30 ml de metanol frío (4°C). Se seca la torta de filtro mediante evaporación a vacío 30 minutos tras alcanzar 16 mbar a temperatura de baño de agua de 40°C. No se investiga la recuperación.

10 El producto obtenido es pentamicina en una pureza química de aproximadamente el 90% sólo evidente a partir de su cromatograma de HPLC representado en la figura 14. Una comparación de la figura 14 (HPLC tras tres cristalizaciones) con la figura 12 (HPLC antes de las cristalizaciones) muestra que se han eliminado algunas impurezas menores, pero las dos impurezas principales permanecen todavía. El espectro de difracción de rayos X de polvo y la DSC (pico a 243,55°C) del producto obtenido se representan en la figura 13. El pico de DSC a 243,55°C se compara con el punto de fusión (descomposición) de 236-237°C notificado en J. Antibiotics, ser. A, vol. XI, n.º 1, enero de 1958, págs. 26-29 y es claramente inferior que el pico de 254,42°C mostrado en la figura 7 para el polimorfo A de pentamicina según la presente invención.

20 **Ejemplo 9: estabilidad del polimorfo A de pentamicina**

Se compara la estabilidad del polimorfo A puro en más del 95% en su exposición al aire y calor con la estabilidad de pentamicina amorfa (que contiene pentamicina pura en más del 95%) tal como se expone a continuación:

25 Se prepara pentamicina amorfa mediante precipitación a partir de una disolución de pentamicina pura en más del 95% en dimetilsulfóxido añadiendo acetonitrilo, seguido por filtración y secado del precipitado.

30 Se prepara el polimorfo A de pentamicina puro en más del 95% mediante cristalización en una disolución de pentamicina pura en más del 95% en dimetilsulfóxido añadiendo acetato de etilo, seguido por filtración y secado del precipitado.

35 Se incuban una muestra de de la pentamicina amorfa así obtenida y una muestra del polimorfo A así obtenido en un recipiente abierto aproximadamente seis días a 60°C y adicionalmente 2 semanas a 40°C. Se monitoriza el procedimiento de degradación mediante HPLC, midiendo la disminución de la pureza en relación con el estado inicial a tiempo cero (t₀) fijada en el 100%. Tras la incubación, la cantidad de degradación de la pentamicina amorfa es del 11%, mientras que la cantidad de degradación del polimorfo A es sólo del 1%.

40 **Ejemplo 10: adaptación del ejemplo 1 de la patente británica nº 884.711**

45 De manera análoga a la descrita en el ejemplo 1 en la página 8 de la patente británica nº 884.711, se extraen 3,5 kg de cortes de caldo de fermentación con 16 litros de butanol, se concentra el extracto a vacío a 55°C hasta 600 ml, y a continuación se añaden 600 ml de agua destilada. Tras la concentración hasta una pasta, se lava con 1 litro de dietil éter y se filtra. Se procesan adicionalmente 40 g del sólido obtenido mediante extracción con metanol en un extractor Soxhlet durante 6 horas, se cristalizan a 4°C y se filtran. Según la HPLC, los cristales obtenidos contienen pentamicina pura en un 67,3%. Esto se compara con una pureza de aproximadamente 75% notificada en la página 8, líneas 33 y 35, de la patente británica. Se lavan 1,9 g de los cristales en un extractor Soxhlet con 100 ml de cloroformo durante 2 horas y a continuación se extraen en un extractor Soxhlet durante 2 horas con dietil éter. Se vuelve a extraer el sólido obtenido en un extractor Soxhlet con metanol durante 4 horas. Los cristales obtenidos enfriando hasta 4°C durante 40 horas y secando a vacío contienen según la HPLC pentamicina pura en un 70,1%. Esto se compara con la página 8, línea 41 de la patente británica 884.711, según la cual se obtiene supuestamente lagosina (pentamicina) "pura".

REIVINDICACIONES

1. Pentamicina en una pureza química que supera el 96%.

- 5 2. Pentamicina según la reivindicación 1 en forma de polimorfo A en una pureza química que supera el 96%, caracterizada porque presenta los valores de 2 theta siguientes, \pm aproximadamente $0,2^\circ$, de las líneas más intensas en el espectro de difracción de rayos X de polvo, proporcionándose las intensidades relativas únicamente como indicación aproximada:

ángulo 2 theta	intensidad relativa						
2,22	100	7,29	33	9,25	15	19,78	51
20,17	52	20,62	25	21,24	17		

- 10 3. Pentamicina en forma de un solvato con un compuesto heterocíclico seleccionado de entre morfolina, N-metilpirrolidona y N-etilpirrolidona.

15 4. Pentamicina según la reivindicación 3 en forma de un solvato de morfolina.

5. Utilización de un solvato de pentamicina con un compuesto heterocíclico seleccionado de entre morfolina, N-metilpirrolidona y N-etilpirrolidona para la purificación química de la pentamicina.

- 20 6. Procedimiento para la purificación de pentamicina hasta una pureza química que supera el 95% transformando la pentamicina en una pureza química inferior a 93% en un solvato adecuado con un compuesto heterocíclico seleccionado de entre morfolina, N-metilpirrolidona y N-etilpirrolidona, purificando dicho solvato mediante cristalización en metanol o etanol y liberando la pentamicina del solvato.

25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el solvato es un solvato de morfolina.

8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la pentamicina se libera del solvato mediante agitación prolongada en metanol o etanol.

- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la pentamicina se libera del solvato mediante agitación prolongada en metanol o etanol.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, llevado a cabo en presencia de un antioxidante adecuado.

- 35 11. Procedimiento para disminuir significativamente la tasa de degradación de la pentamicina en una pureza que supera el 95% transformándola en su polimorfo A en una pureza química que supera el 95%, estando dicho polimorfo A caracterizado porque presenta los valores de 2 theta siguientes, \pm aproximadamente $0,2^\circ$, de las líneas más intensas en el espectro de difracción de rayos X de polvo, proporcionándose las intensidades relativas únicamente como indicación aproximada:

ángulo 2 theta	intensidad relativa						
2,22	100	7,29	33	9,25	15	19,78	51
20,17	52	20,62	25	21,24	17		

y en el que la transformación en el polimorfo A se efectúa mediante cristalización a partir de una disolución de pentamicina pura en más de 95% en dimetilsulfóxido tras añadir acetato de etilo.



Figura 1: fotografía de polimorfo en agujas del solvato de pentamicina-morfolina (1:1)

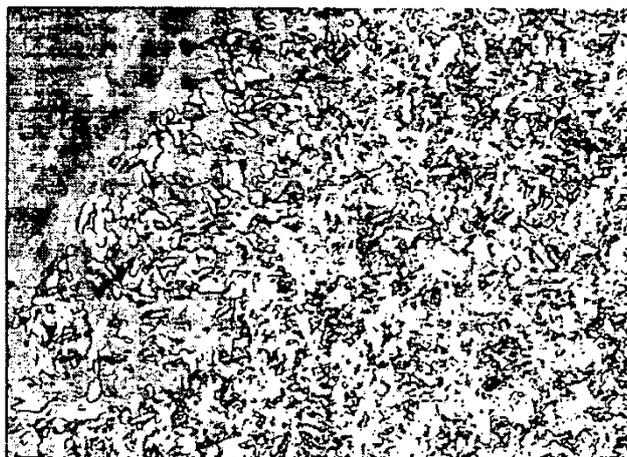


Figura 2: fotografía de polimorfo en escamas del solvato de pentamicina-morfolina (1:1)

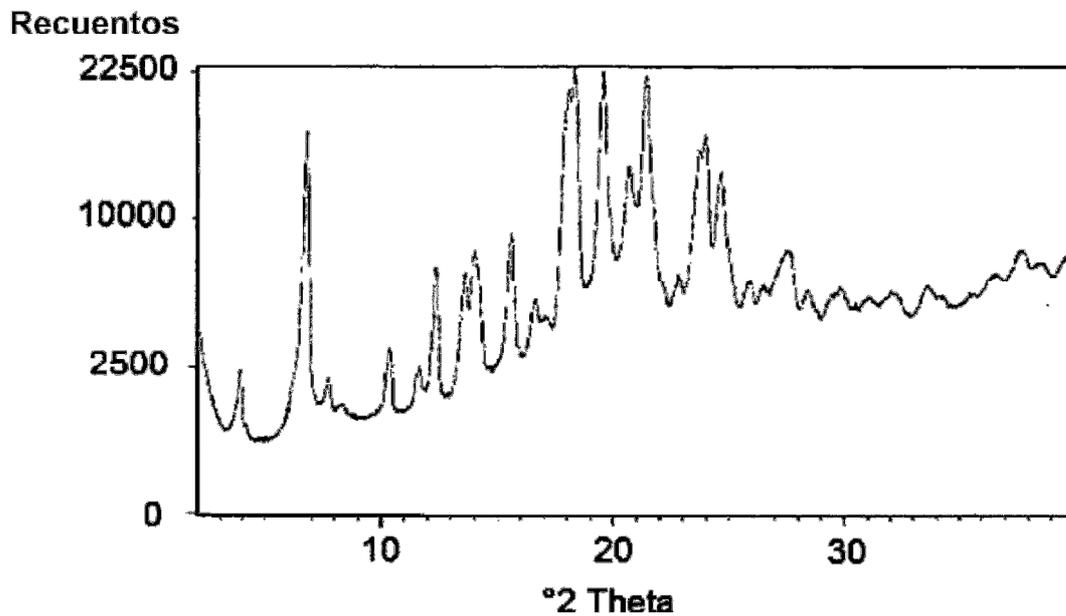


Figura 3: diagrama de difracción de polvo del solvato de pentamicina:morfolina en forma de agujas.

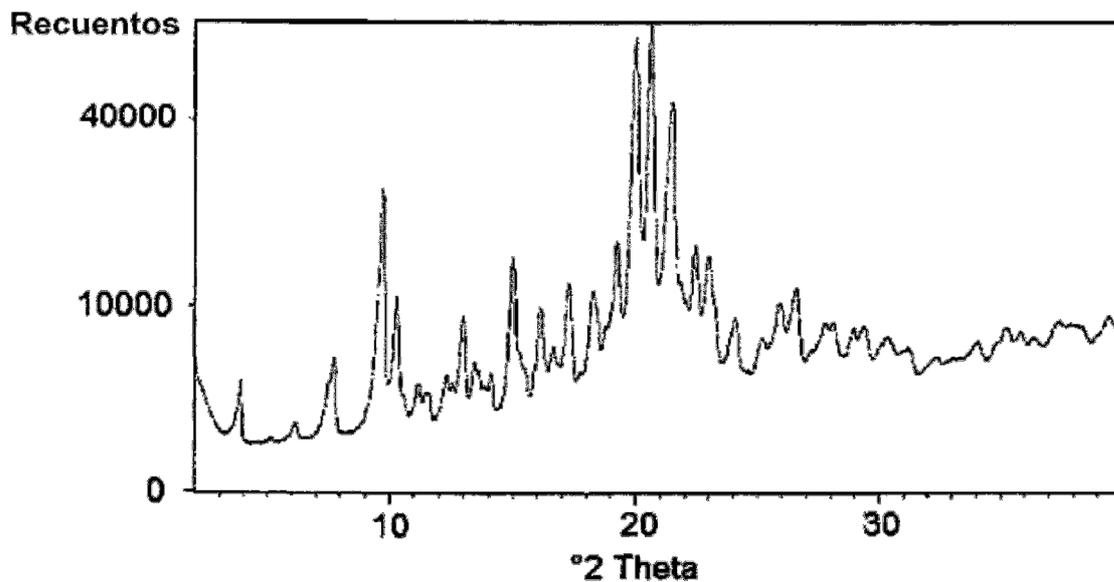


Figura 4: espectro de difracción de rayos X de polvo del solvato de pentamicina:morfolina en forma de escamas.

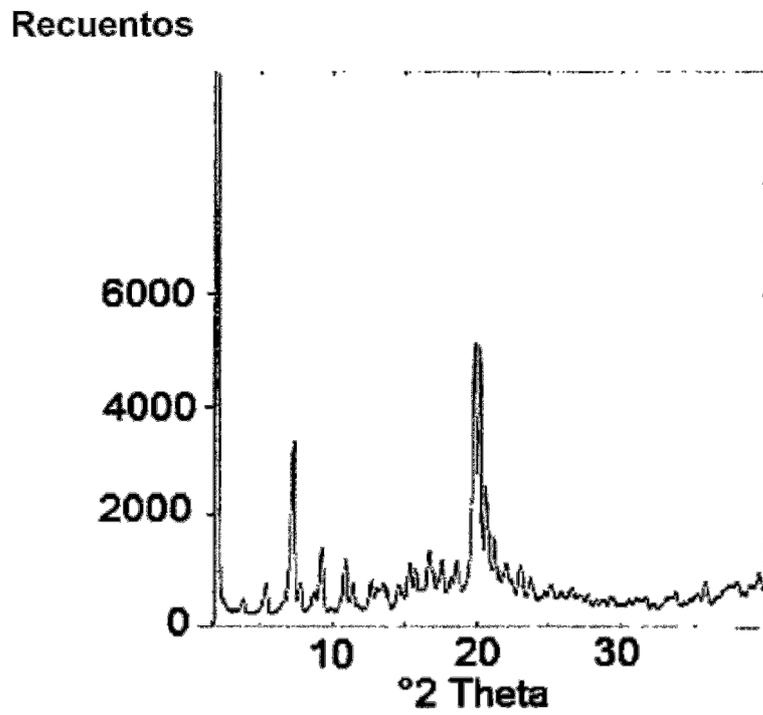


Figura 5: rayos X del polimorfo A de pentamicina.

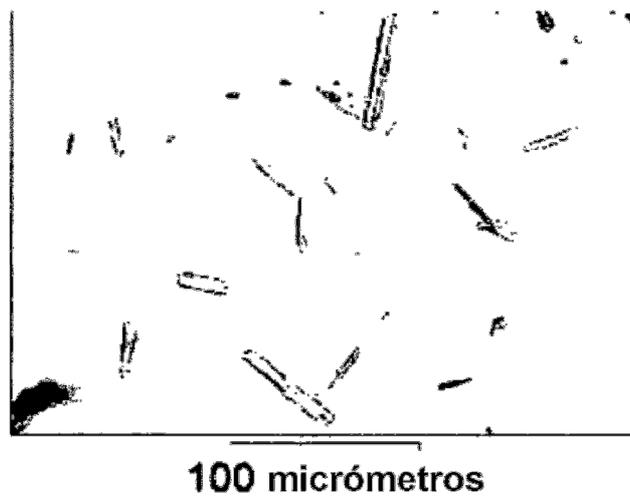


Figura 6 fotografía del polimorfo A de pentamicina.

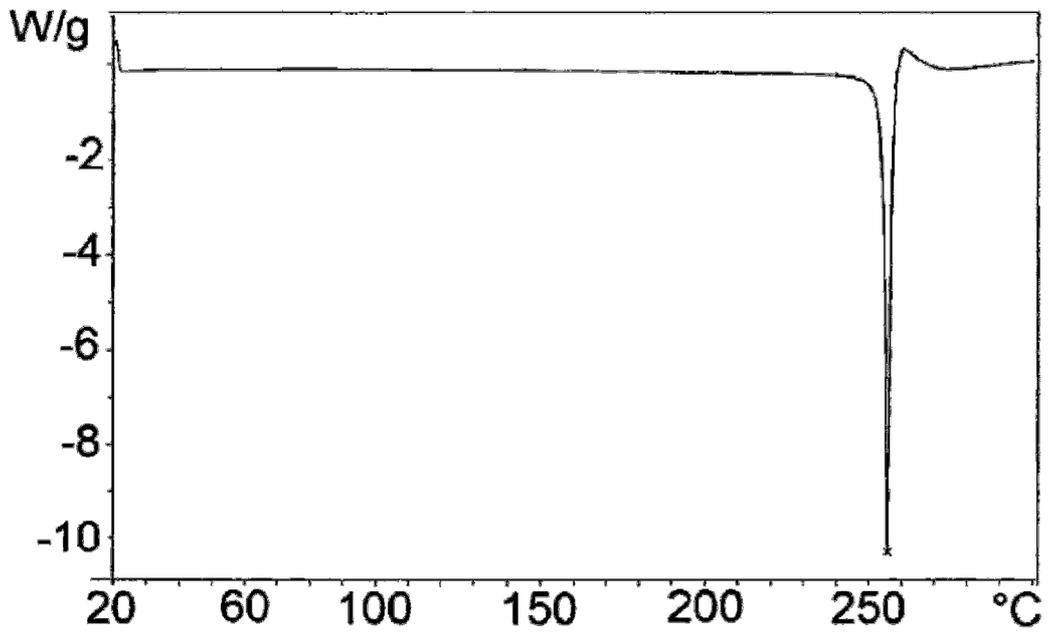


Figura 7: DSC del polimorfo A de pentamicina

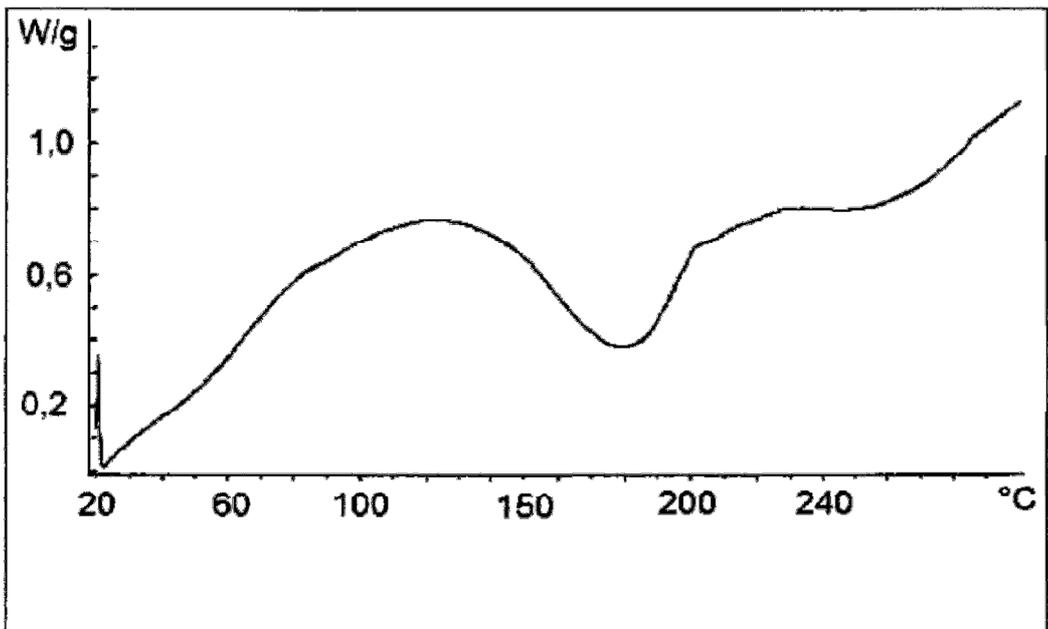


Figura 8: DSC de la pentamicina amorfa

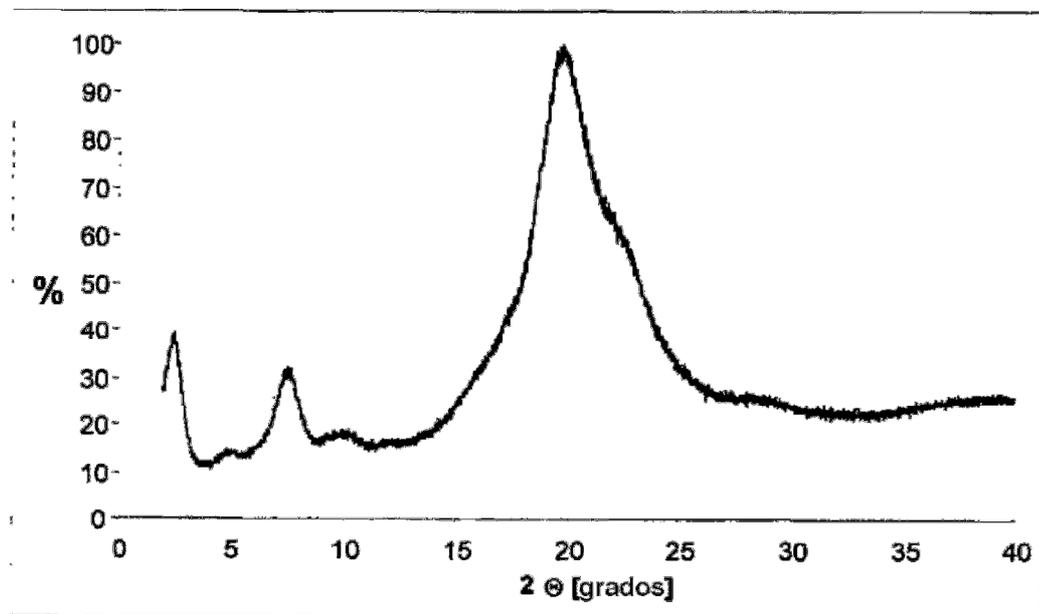


Figura 9: diagrama de difracción de rayos X de polvo de la pentamicina amorfa

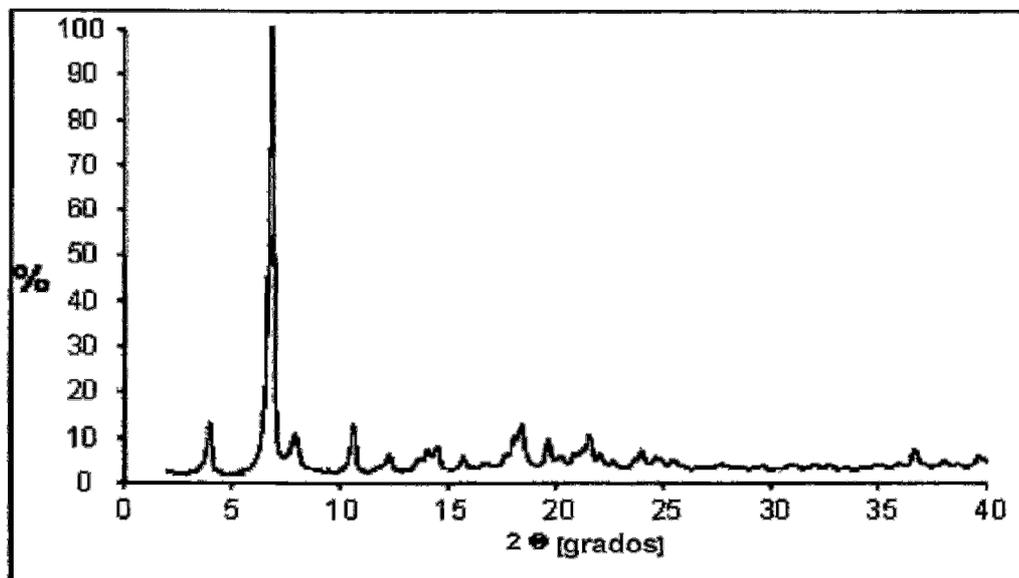
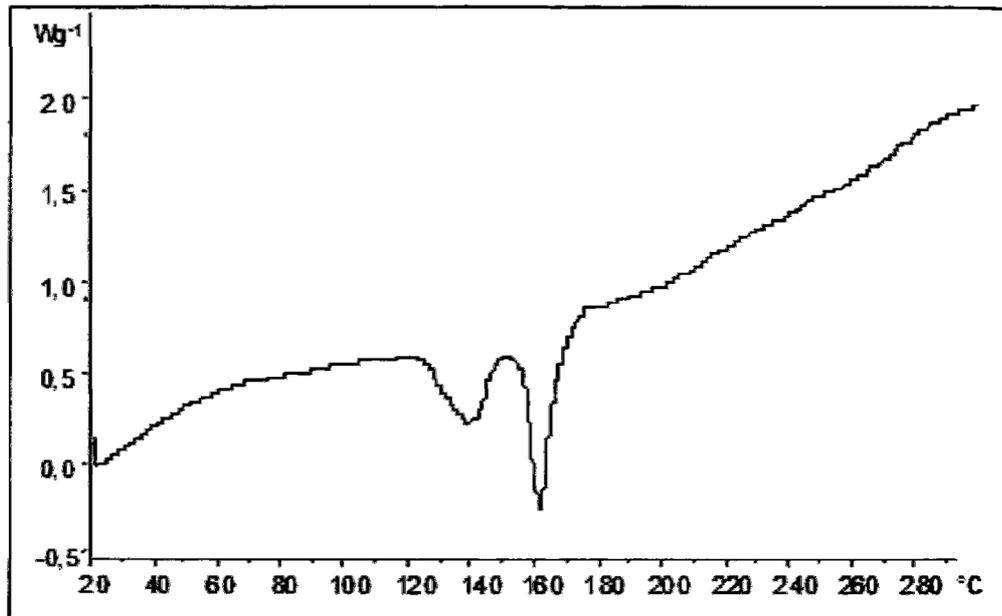


Figura 10: DSC (arriba) y rayos X (abajo) del polimorfo C

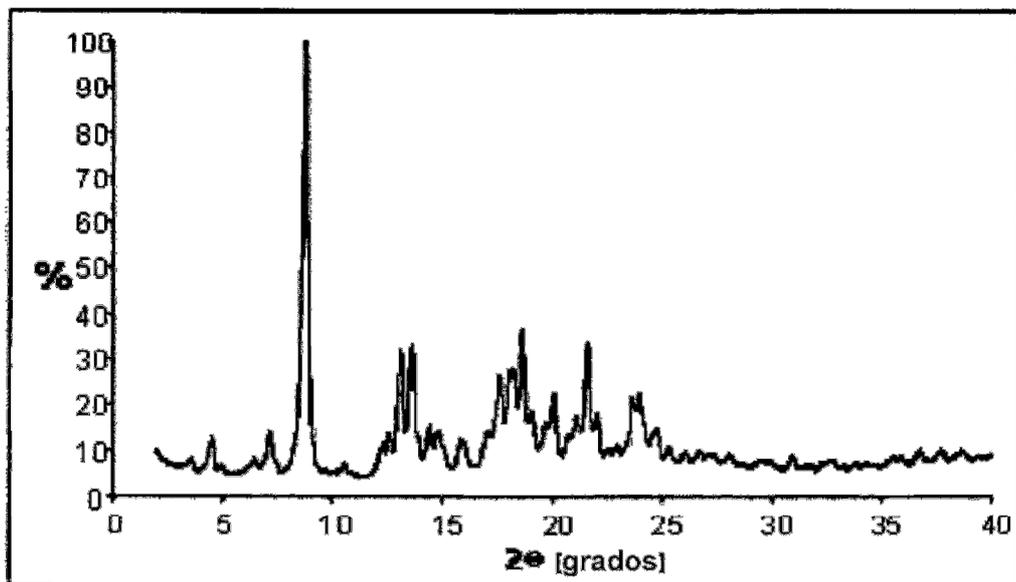
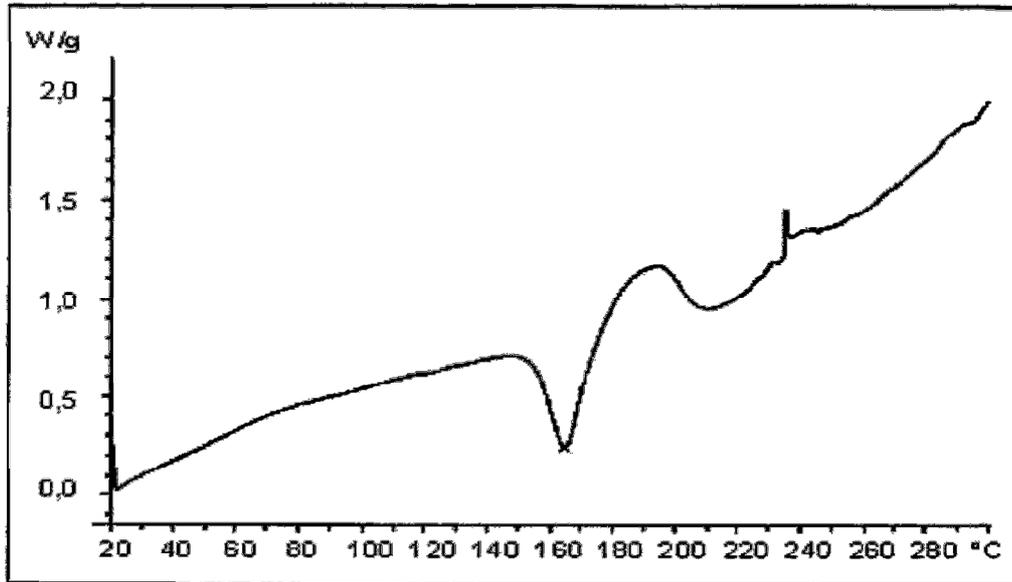


Figura 11: DSC (arriba) y rayos X (abajo) de pentamicina en bruto

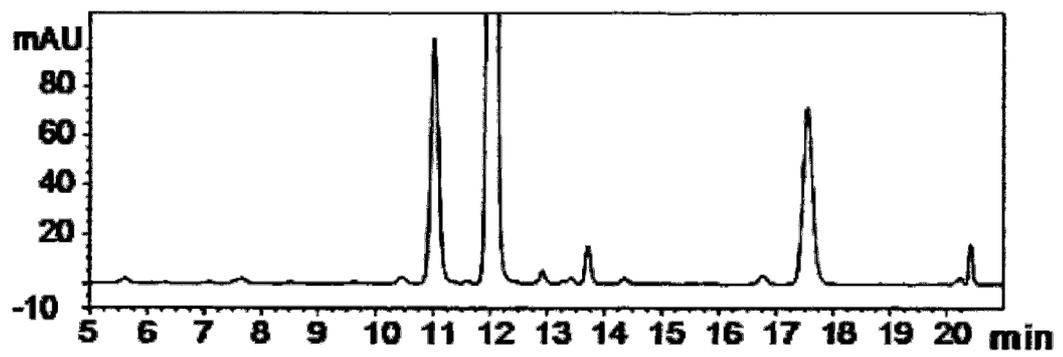


Figura 12: HPLC de pentamicina en bruto

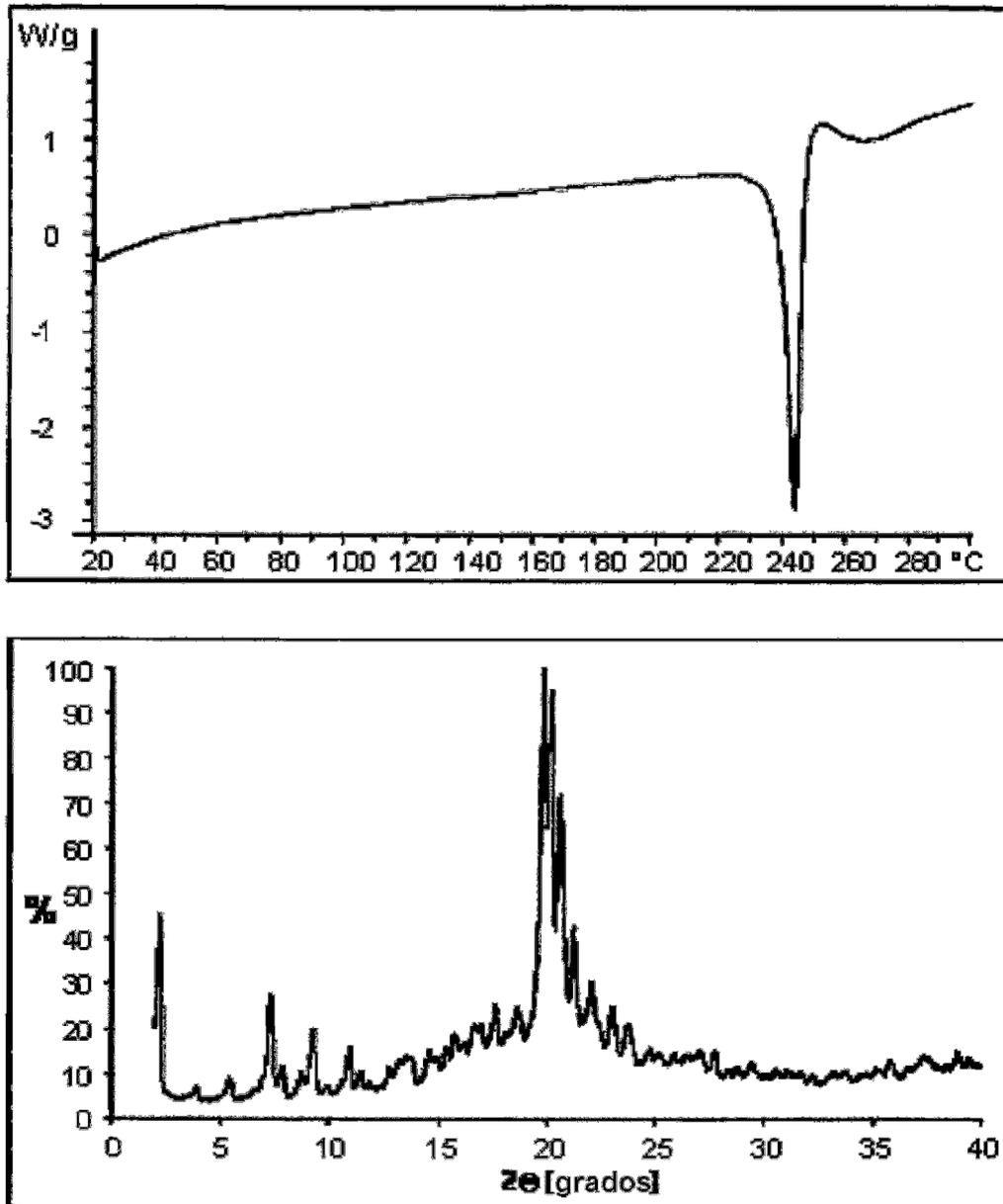


Figura 13: DSC (arriba) y rayos X (abajo) de pentamicina tras tres cristalizaciones en metanol tal como se describe en J. Antibiotics, ser. A, vol. XI, n.º 1, enero de 1958, págs. 26-29.

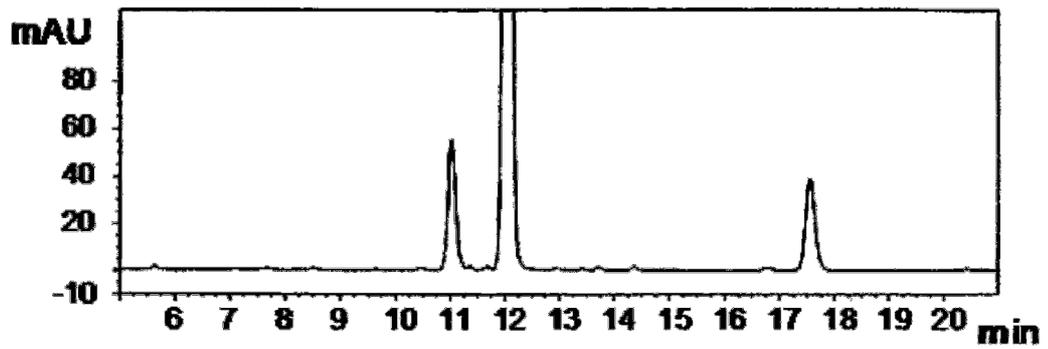


Figura 14: HPLC de pentamicina tras tres cristalizaciones en metanol tal como se describe en *J. Antibiotics*, ser. A, vol. XI, n.º1, enero de 1958, págs. 26-29.