

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 797**

51 Int. Cl.:

C07D 498/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2003** **E 03777162 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 1697383**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de tacrolimus**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2014

73 Titular/es:

BIOCON LIMITED (100.0%)
20th Km Hosur Road, Hebbagodi Bangalore
560 100 Karnataka, IN

72 Inventor/es:

PATIL, NITIN SOPANRAO;
MENDHE, RAKESH;
KHEDKAR, ANAND PRAKASH;
MELARKODE, RAMAKRISHNAN y
GURURAJA, RAMAVANA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 494 797 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

Procedimiento para la purificación de tacrolimus

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de macrólidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

[0002] Un compuesto, 15,19-epoxi-3H-pirido[2,1-c][1,4]oxaazacicotricosina-1,7,20,21(4H,23H)-tetrona, 5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-hexadecahidro-5,19-dihidroxi-3-[(1E)-2-[(1R,3R,4R)-(4-hidroxi-3-metoxiciclohexil)-1-metiletenil]-14,16-dimetoxi-4,10,12,18-tetrametil-8-(2-propenil)-, (3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19R,26aS), también conocido como FK506, así como tacrolimus, dado a
15 conocer en el las patentes EP 184162 y patente de EE. UU. n.º 4.894.366, es útil como inmunosupresor. Otro compuesto, 15,19-epoxi-3H-pirido[2,1-c][1,4]oxaazacicotricosina-1,7,20,21(4H,23H)-tetrona,8-etil-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-hexadecahidro-5,19-dihidroxi-3-[(1E)-2-[(1R,3R,4R)4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletenil]-14,16-dimetoxi-4,10,12,18-tetrametil-, (3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19R,26aS)-, también conocido como inmunomicina, así como FK 520, descrito en la Publicación EPO N.º 0184162, también es útil como inmunosupresor. Muchos otros derivados de estos compuestos, así como sus
20 análogos estructurales, tienen propiedades inmunosupresoras.

[0003] La patente de EE. UU. n.º 5.508.398 da a conocer un procedimiento para separar un macrólido no polipeptídico neutro de impurezas ácidas, básicas y neutras no polares presentes en un concentrado de extractos de
25 caldo de fermentación o licores madre que contienen dicho macrólido neutro, el cual comprende, en cualquier orden, una etapa de extracción (a) y, opcionalmente, una o ambas de las etapas (b) y (c), en donde (a) implica la extracción con una base acuosa, (b) implica la extracción con un ácido acuoso y (c) implica el tratamiento con un disolvente de hidrocarburo no aromático.

[0004] La patente de EE. UU. n.º 5.616.595 da a conocer un procedimiento para la recuperación de compuestos insolubles en agua (incluidos FK506, FK520 y rapamicina) a partir de un caldo de fermentación, el cual incluye etapas secuenciales de concentración, disolución y diafiltración del compuesto de interés, todo ello mediante un solo sistema cerrado de recirculación con el fin de recuperar el compuesto para su purificación adicional aguas
30 abajo.

35

[0005] En la patente de EE. UU. n.º 6.492.513 se describe un procedimiento para la separación de tacrolimus de sus impurezas relacionadas. El procedimiento implica el tratamiento de una resina de intercambio iónico que contiene grupos de ácido sulfónico con iones de plata. La cadena lateral de alqueno que contiene tacrolimus se
40 separa de su cadena lateral de alquilo que contiene análogos.

[0006] La patente de EE. UU. n.º 6.576.135 da a conocer un procedimiento para una separación similar. Tacrolimus, junto con las impurezas, se adsorbe sobre una resina de adsorción no iónica, tras lo cual se realiza la elución con un disolvente acuoso que contiene iones de plata.

[0007] Wang-Fan y cols. han documentado un procedimiento para la separación de tacrolimus a partir de inmunomicina usando cromatografía en contracorriente centrífuga. (Wang-Fan W., Kusters E., Lohse O., Mak C., Wang Y., Journal of Chromatography A, 864 (1999) 69-76).

[0008] La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la purificación de compuestos
50 macrólidos. En esta invención se usa un tratamiento con amoníaco fácilmente escalable para separar las impurezas ácidas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la recuperación de tacrolimus en una forma sustancialmente pura.

[0010] El nuevo procedimiento de la presente invención comprende:

a) tratamiento de un macrólido impuro o bruto con un disolvente inmiscible en agua seleccionado entre un grupo compuesto por hidrocarburos, compuestos heterocíclicos, éteres o ésteres

b) concentración opcional de la mezcla,

5

c) tratamiento con gas amoníaco para eliminar las impurezas,

d) separación de las impurezas,

10 e) concentración opcional de la fase que contiene tacrolimus,

f) carga en cromatografía en gel de sílice, en fase inversa o pretratada con plata en cromatografía en gel de sílice pretratada con plata, y elución del macrólido,

15 g) obtención de tacrolimus cristalizado o precipitado en forma sustancialmente pura.

[0011] El producto así obtenido es de calidad farmacéuticamente aceptable.

[0012] El nuevo procedimiento tiene varias ventajas, tales como:

20

1. Industrialmente escalable

2. Producto de alta pureza

25 3. Simplicidad de operación

4. Menor número de etapas

5. Económico

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] Como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la recuperación de tacrolimus en una forma sustancialmente pura.

35

[0014] El macrólido de la presente invención se puede producir por fermentación, síntesis química o procedimiento semisintético. El caldo obtenido por fermentación o la fase acuosa que contiene el macrólido se puede extraer directamente con un disolvente inmiscible en agua. Cualquier material en bruto en forma sólida, semisólida o líquida, obtenido ya sea a partir de un caldo, de un procedimiento sintético o de la combinación de los mismos, se puede tratar con un disolvente inmiscible en agua para efectuar la disolución del macrólido en el disolvente inmiscible en agua. El disolvente inmiscible en agua que contiene el macrólido se puede concentrar parcialmente. La concentración se puede realizar mediante procedimientos conocidos *per se*. La concentración se puede realizar mediante evaporación del disolvente. La evaporación del disolvente se puede llevar a cabo por calentamiento sin o con presión reducida. La mezcla así obtenida se puede tratar con gas amoníaco. Las impurezas se pueden separar mediante procedimientos conocidos *per se*, p. ej., filtración, centrifugación o cualquier procedimiento de separación sólido-líquido adecuado. La fase que contiene el macrólido se puede someter a tratamiento sobre carbón vegetal. La fase que contiene el macrólido se puede concentrar mediante el procedimiento comentado anteriormente. La fase que contiene el macrólido se puede someter a cromatografía en gel de sílice. La sílice puede ser la fase inversa. El gel de sílice se puede pretratar con plata. El eluido obtenido de la cromatografía se puede mezclar con un disolvente inmiscible en agua. El disolvente inmiscible en agua se puede seleccionar entre un grupo compuesto por hidrocarburos, compuestos heterocíclicos, éteres o ésteres. Preferentemente, el disolvente se selecciona entre hidrocarburos o éteres. El macrólido se puede obtener por cristalización o precipitación. El macrólido se puede obtener a partir de disolventes individuales o mezcla de disolventes seleccionados entre acetato de etilo, éter dietílico, acetonitrilo, y hexano. 35

50

[0015] Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, entendiéndose que no se pretende limitar la invención por los detalles descritos en este documento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0016] El caldo de fermentación (11 kg) con un contenido de 1 g de tacrolimus se extrajo con 11 l de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se concentró parcialmente hasta 1,2 l. El concentrado se enfrió hasta 4 °C y el amoníaco se purgó a través del concentrado durante 30 minutos. La solución se filtró utilizando celita como coadyuvante de filtración para separar las impurezas precipitadas. El filtrado se concentró para obtener 28 g de residuo oleoso. El residuo se aplicó sobre una columna de gel de sílice. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de acetato de etilo al 25 % en hexano y 3 volúmenes de columna de acetato de etilo al 50 % en hexano. El producto se eluyó con acetato de etilo al 75 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para obtener 2,8 g de residuo oleoso. El residuo se disolvió en 100 ml de acetato de etilo. Se añadieron 3 g de carbón activado al mismo. La mezcla se agitó durante 20 minutos y, seguidamente, se filtró. El filtrado se concentró para obtener 2,7 g de residuo oleoso. Al residuo se le añadieron 2,5 ml de acetato de etilo. El producto bruto se cristalizó a 4 °C por adición lenta de hexano. El producto bruto se filtró y se secó.

[0017] El producto bruto se aplicó sobre una columna de gel de sílice. El gel de sílice (amaño de malla 230-400) se trató inicialmente con nitrato de plata. La columna se eluyó con un 75 % de acetato de etilo y un 25 % de hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron. El producto se cristalizó como se mencionó anteriormente en acetato de etilo y hexano. Los cristales se filtraron y se secaron. La pureza cromatográfica fue mayor que el 99 %.

Ejemplo 2

[0018] El caldo de fermentación (29 kg) con un contenido de 3,1 g de tacrolimus se extrajo con 29 l de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se concentró parcialmente hasta 2 l. El concentrado se enfrió hasta 4°C y el amoníaco se purgó a través del concentrado durante 20 minutos. La solución se filtró utilizando celita como coadyuvante de filtración para separar las impurezas precipitadas. El filtrado se concentró para obtener 51 g de residuo oleoso. El residuo se aplicó sobre una columna de gel de sílice. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de acetato de etilo al 25 % en hexano y 3 volúmenes de columna de acetato de etilo al 50 % en hexano. El producto se eluyó con acetato de etilo al 75 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para obtener 6 g de residuo oleoso. El residuo se disolvió en 200 ml de acetato de etilo. Se añadieron 6 g de carbón activado al mismo. La mezcla se agitó durante 20 minutos y, seguidamente, se filtró. El filtrado se concentró para obtener 5 g de residuo oleoso. Al residuo se le añadieron 5 ml de acetato de etilo. El producto bruto se cristalizó a 4 C por adición lenta de hexano. El producto bruto se filtró y se secó.

[0019] Se aplicaron los 3 g del producto bruto a una columna de gel de HPLC RP (d ~ 50 mm x H ~ 200 mm). El producto se eluyó con n-butanol:acetonitrilo:tampón en una proporción de 9,75:12,5: 77,75. El tampón contenía 1,36 g/l de dihidrógeno fosfato de potasio, 1 ml/l de trietilamina y 1 ml/l de ácido fosfórico. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se extrajeron con un volumen igual de acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se secó con sulfato sódico anhidro y se concentró. El producto se cristalizó como se mencionó anteriormente en acetato de etilo y hexano. Los cristales (1,6 g) se filtraron y secaron. La pureza cromatográfica fue mayor que el 99 %.

REIVINDICACIONES

1. Un nuevo procedimiento para la recuperación de tacrolimus en forma sustancialmente pura que comprende:
- 5 a) tratamiento de un tacrolimus impuro o bruto con un disolvente inmiscible en agua seleccionado del grupo compuesto por hidrocarburos, compuestos heterocíclicos, éteres o ésteres
- b) concentración opcional de la mezcla
- 10 c) tratamiento con gas amoníaco para eliminar las impurezas
- d) separación de las impurezas
- 15 e) concentración opcional de la fase que contiene tacrolimus,
- f) carga en cromatografía en gel de sílice, cromatografía en fase inversa de cromatografía en gel de sílice pretratada con plata, y elución de tacrolimus
- 20 g) obtención de tacrolimus cristalizado o precipitado en forma sustancialmente pura.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cristalización se lleva a cabo utilizando disolventes seleccionados del grupo compuesto por acetato de etilo, éter dietílico, acetonitrilo y hexano.
- 25 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
- a) tratamiento de un tacrolimus impuro o bruto con un disolvente inmiscible en agua seleccionado del grupo compuesto por hidrocarburos, compuestos heterocíclicos, éteres o ésteres
- 30 b) concentración opcional de la mezcla
- c) tratamiento con gas amoníaco para eliminar las impurezas
- d) separación de las impurezas
- 35 e) concentración opcional de la fase que contiene tacrolimus,
- f) carga en cromatografía en gel de sílice y elución del macróido,
- 40 g) concentración opcional y mezcla con un disolvente inmiscible en agua seleccionado del grupo formado por hidrocarburos, compuestos heterocíclicos, éteres o ésteres de tacrolimus para obtener una forma más pura
- h) carga en cromatografía de gel de sílice pretratada con plata y elución de tacrolimus
- 45 i) obtención de tacrolimus cristalizado o precipitado en forma sustancialmente pura.