

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 646**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2010 E 10747327 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2464374**

54 Título: **Separación y/o purificación de pneumocandina B₀ a partir de C₀**

30 Prioridad:

14.08.2009 US 233838 P

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

21.06.2016

73 Titular/es:

XELLIA PHARMACEUTICALS APS (100.0%)

Dalslandsgate 11

DK-2300 København S, DK

72 Inventor/es:

BRUNSVIK, ANDERS

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 574 646 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

Separación y/o purificación de pneumocandina B₀ a partir de C₀

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la separación y purificación de compuestos de pneumocandina.

Antecedentes

10

Las pneumocandinas son hexapéptidos cíclicos antifúngicos con una cadena lateral de lípidos (ver Schwarts y otros, 1992, Journal of Antibiotics, Vol 45, núm. 12, páginas 1853-1866, Masurekar y otros, 1992, Journal of Antibiotics, Vol 45, núm. 12, páginas 1867-1874, Hensens y otros, 1992, Journal of Antibiotics, Vol 45, núm. 12, páginas 1875-1885, Schmatz y otros, 1992, Journal of Antibiotics, Vol 45, núm. 12, páginas 1886-1891 y Adefarati y otros, 1992, Journal of Antibiotics, Vol 45, núm. 12, páginas 1953-1957 y US 5.021.341)

15

20

La actividad antifúngica de las pneumocandinas está conectada a la inhibición de la biosíntesis de 1,3β-glucanos, 1,3β-glucano sintasa, una enzima de múltiples subunidades, es responsable de la construcción de la pared celular fúngica, la deposición del tabique de división, y el ensamblaje de la pared de ascosporas. La subunidad catalítica de este complejo de enzimas, una proteína de membrana integral, se ha identificado tanto en levaduras modelo *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, y en los hongos patógenos tales como las especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis*". (Curr Drug Targets Infect Disorders. 2001 agosto; 1 (2): 159-69 por Liu y Balasubramanian).

25

Las pneumocandinas y los derivados de la pneumocandina son útiles como ingredientes farmacéuticos activos (API) y/o productos intermedios para la producción de API. Los medicamentos que comprenden los API están destinadas para usar en el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades o afecciones que implican infecciones fúngicas.

30

Por ejemplo, los API de caspofungina es un derivado semisintético de la pneumocandina B₀. La caspofungina, comercializada como Cancidas®, se indica en adultos y pacientes pediátricos (3 meses o más) para:

35

- el tratamiento empírico de presuntas infecciones por hongos en pacientes con fiebre, neutropénicos.
- el tratamiento de la candidemia y de las siguientes infecciones por *Candida*: abscesos intraabdominales, peritonitis e infecciones espacio pleural.
- el tratamiento de la candidiasis esofágica.
- el tratamiento de la aspergilosis invasiva en pacientes que son refractarios o intolerantes a otras terapias

Por lo tanto, se requiere que los API tengan alta pureza para la seguridad y eficacia de los medicamentos.

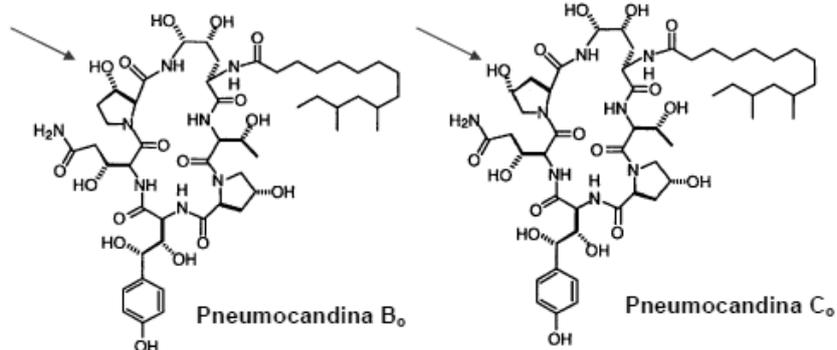
40

La pneumocandina B₀ puede usarse como material de partida para la producción de caspofungina. Durante dicha producción, la pneumocandina C₀ será considerada como una impureza. Por lo tanto, es conveniente separar la pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀, o incluso purificar la pneumocandina B₀ a partir de la pneumocandina C₀. La pneumocandina B₀ se produce, a menudo, por la fermentación del hongo *Glaea lozoyensis* (anteriormente clasificado como *Zalerion arboricola*), pero muchos isómeros y derivados con propiedades fisicoquímicas similares, se coproducen en los procesos de fermentación.

45

La pneumocandina B₀ y la pneumocandina C₀ son isómeros que se diferencian por la posición de un grupo hidroxilo en solamente un residuo de prolina:

50



55

Chemical abstracts
núm. de registro: 135575-42-7

Chemical abstracts
núm. de registro: 144074-96-4

65

5 Varios métodos para la separación de la pneumocandina B₀ de las otras pneumocandinas (por ejemplo, la pneumocandina A₀, B₅, D₀, E₀) son conocidos. Sin embargo, los métodos de cristalización y de cromatografía en fase inversa han sido incapaces de separar la pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀. Estos dos isómeros difieren sólo por la posición de un grupo hidroxilo en un residuo de prolina.

10 Para la separación de la pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀, se ha usado la cromatografía en fase normal utilizando fases móviles de acetato de etilo/metanol/agua. Este método, sin embargo, sufre de baja solubilidad de la pneumocandina en la solución de carga y también de algo baja robustez. Además, esta fase móvil no es muy compatible con los métodos de espectrometría de masas, lo que limita la utilidad del método para fines analíticos.

Técnica anterior

15 Varias publicaciones describen métodos para la purificación de pneumocandinas.

- Purification of Pneumocandins by preparative silica-gel high-performance liquid chromatography
Journal of Chromatography A, 831 (1999) 217-225 de Osawaa Osawaa y otros.
- Preparative high-performance liquid chromatography of echinocandins
Journal of Chromatography A, Volumen 27, Número 2, 11 de diciembre de 1998, páginas 373-389 de Roush y otros.
- Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography of Pneumocandins: In Situ Modification of Silica with L-Proline To Separate Structural Analogues
Biotechnol Prog. 2006 marzo-abril; 22 (2): 538-46 de Nti-Gyabaah y otros.
- Ultrafast liquid chromatography/tandem mass Spectrometry bio analysis of polar analytes using packed silica columns
Rapid Commun Mass Spectrom. 2002; 16 (17): 1613-21 de Shou y otros
- WO2005026323 STATIONARY PHASES AND A PURIFICATION PROCESS USING THE STATIONARY PHASES
- Transition Metal-Mediated Separation of Isomeric Pneumocandins by Capillary Electrochromatography
J. High Resol. Chromatogr, 1999, 22 (6): 309-314 de Hoffman y Dovletoglou
- Potential of HILIC-MS in quantitative bio analysis of drugs and drug metabolites
J. Sep. Sci. 2008, 31, 1481-1491 de Hsieh

40 Resumen de la invención

Esta invención proporciona la separación y purificación de compuestos de pneumocandina.

45 Más específicamente, se proporciona un método para la purificación de la pneumocandina B₀.

Aún más específicamente, se proporciona un método para la separación de la pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀, mediante el uso una fase estacionaria hidrófila que comprende sílice sin modificar y una fase móvil hidrófoba que comprende 80% -90% v/v de acetonitrilo y 10% -20% v/v de una solución acuosa ácida.

50 Este método proporciona una separación muy rápida de B₀ de C₀ mediante el uso una fase móvil que es compatible con los métodos de espectrometría de masas.

Descripción detallada

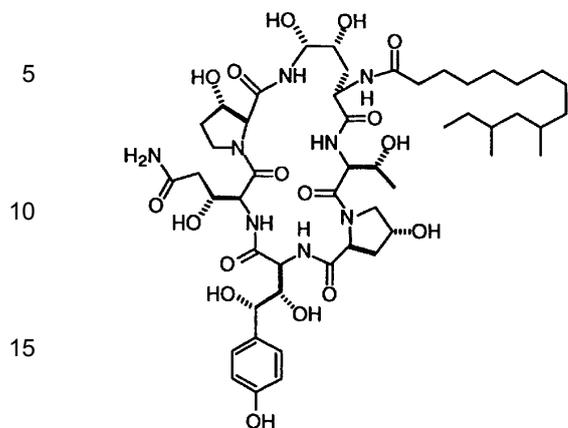
55 Definiciones:

Como se usa en la presente descripción, los siguientes términos y expresiones se supone que tienen los significados definidos más abajo.

60 "Pneumocandinas" son hexapéptidos cíclicos o derivados de los mismos que comprenden un resto lipídico con actividad antifúngica.

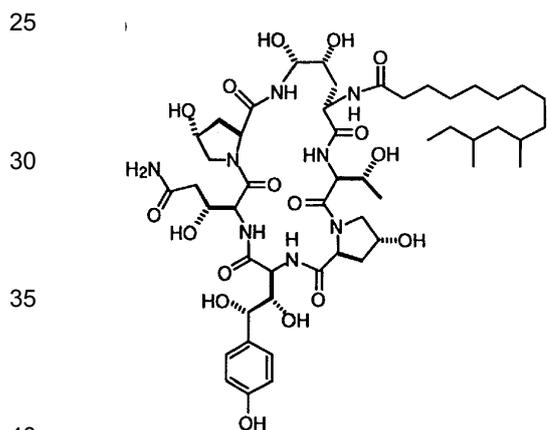
"Pneumocandina B₀" es un compuesto con la siguiente estructura:

65



20 Sin embargo, el término "Pneumocandina B₀", como se usa en la presente, también incluye sales o estereoisómeros de la misma.

"Pneumocandina C₀" es un compuesto con la siguiente estructura:



Sin embargo, el término "Pneumocandina C₀", como se usa en la presente, también incluye sales o estereoisómeros de la misma.

45 "Separación" es cualquier método en donde un compuesto deseado se resuelve de otro (por métodos analíticos o preparativos).

"Purificación" es cualquier método de separación por el cual se incrementa la concentración de un compuesto deseado.

50 "Cromatografía" es cualquier técnica de purificación que implica una fase estacionaria y una fase móvil.

"Una fase estacionaria" es cualquier superficie que comprende ligandos capaces de retener los compuestos.

"Ligandos" son restos de la fase estacionaria, en la que se produce la unión de los compuestos.

55 "Una fase móvil" es cualquier fluido, disolvente, líquido o mezcla que puede filtrarse a través o a lo largo de la fase estacionaria en una dirección definida.

60 "Una fase móvil hidrófoba" es cualquier fase móvil que comprende un porcentaje alto de un disolvente orgánico y un porcentaje bajo de una solución acuosa (por ejemplo, ácido fórmico o TFA) y/o un tampón (por ejemplo, acetato de amonio o formiato de amonio).

"Cromatografía de fase inversa" es cualquier cromatografía en la que los componentes más polares o cargados se eluyen antes que los menos polares.

65

- "Cromatografía en fase normal" es cualquier cromatografía en la que los componentes más polares o cargados se eluyen más tarde que los menos polares.
- 5 "Alto porcentaje" significa entre 60 % -100 %
- "Bajo porcentaje" significa entre 0 % -40 %
- "% v/v" significa porcentaje en volumen
- 10 HILIC es cualquier técnica cromatográfica que emplea un fase estacionaria hidrófila y fases móviles de disolventes orgánicos acuosos.
- La presente invención permite la separación y la purificación de compuestos de pneumocandina por cromatografía, especialmente cromatografía de interacción hidrófila (HILIC), también conocido como cromatografía en líquida de interacción hidrófila.
- 15 Sin estar atados por la teoría, se cree que durante la purificación por HILIC se crea un sistema de extracción líquido-líquido. La fase móvil forma una capa rica en agua en la superficie de la fase estacionaria altamente polar. Los analitos se distribuyen entre el estacionaria la capa rica en agua con altos contenidos acuosos y el fase móvil con contenidos en su mayoría orgánicos. Los analitos que poseen mayor polaridad tendrán una mayor afinidad por la capa acuosa estacionaria que los analitos que poseen una polaridad más débil. Por lo tanto, probablemente tiene lugar una separación basada en la polaridad y el grado de solvatación de un compuesto. Sin embargo, el mecanismo de HILIC exacto está aún sin resolver en el campo.
- 20 Hay varios tipos de fases estacionarias polares, tales como, por ejemplo, columnas de sílice sin modificar, amino, y zwitteriónica (ZIC) comercialmente disponibles para separación/purificación por HILIC.
- Para la presente invención, se prefieren las superficies de sílice sin modificar que comprende silanoles y/o siloxanos.
- 25 La HILIC a menudo proporciona una fase móvil orgánica alta y acuosa baja que es favorable a MS en términos de sensibilidad.
- Se prefiere que la fase móvil contenga un porcentaje alto de un disolvente orgánico (por ejemplo ACN) y un porcentaje bajo de una solución acuosa ácida (por ejemplo, ácido fórmico o TFA) y/o un tampón (por ejemplo, acetato de amonio o formiato de amonio).
- 30 La muestra de pneumocandina se disuelve en la fase móvil y pasa a través de la fase estacionaria y de esta manera la separación es permitida. De esta manera, la pneumocandina B₀ se puede separar de la pneumocandina C₀ o de otras pneumocandinas. Esta separación cromatográfica puede llevarse a cabo a escala preparativa o analítica.
- 40 Esta invención proporciona un método para la separación y la purificación de compuestos de pneumocandina.
- Más específicamente se proporciona un método para la purificación de la pneumocandina B₀.
- 45 Aún más específicamente, se proporciona un método para la purificación de B₀ usando una fase estacionaria hidrófila y fase móvil hidrófoba.
- La fase móvil hidrófoba podría comprender 60 %-98 % de acetonitrilo, o más preferentemente 75 %-95 % de acetonitrilo o incluso más preferentemente 80 %-90 % de acetonitrilo o más preferentemente 85 %-87 % de acetonitrilo.
- 50 La fase móvil hidrófoba podría comprender 2 %-40 % de soluciones acuosas, o más preferentemente 5 %-25 % de soluciones acuosas o aún más preferentemente 10 %-20 % de soluciones acuosas con la máxima preferencia 13 %-15 % de soluciones acuosas.
- 55 En otra modalidad, la fase móvil comprende acetonitrilo, agua y acetato de amonio.
- En otra modalidad, esta invención proporciona un método para la separación de la pneumocandina B₀ de otros compuestos.
- 60 En otra modalidad, esta invención proporciona un método para la separación de la pneumocandina B₀ de otras pneumocandinas.
- En aún otra modalidad, esta invención proporciona un método para la separación de la pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀.
- 65

Para poder crear un método analítico para analizar el contenido de B₀ y C₀ en una muestra, fue necesario separar los dos compuestos por cromatografía o encontrar iones específicos de los compuestos, calificadores o transiciones MS/MS. Ya que ninguno de los estándares B₀ o C₀ suministrados era lo suficientemente puro, se tuvo que desarrollar una separación rápida de B₀ o C₀ o incluso antes de que pudieran realizarse los experimento de MS. Ya que la cromatografía en fase inversa no mostró resultados prometedores, se decidió tratar de establecer un método basado en la cromatografía de fase normal. Las pruebas iniciales se realizaron en una columna Agilent-NH₂, con diferente combinaciones de acetonitrilo (ACN) y 0,1 % de solución de acetato de amonio en agua (AMAC), lo que mostró signos de separación, pero la resolución estaba lejos de ser lo suficientemente buena para dar una separación inicial de los dos compuestos. Una columna de HILIC Ascentis Express, de Sigma-Aldrich se probó después basada en que esta es de un tipo de "fase normal" de columna y que la tecnología de partículas de núcleo fundido es conocida para dar una buena resolución. Después de poner a prueba diferentes combinaciones de ACN y AmAc se seleccionó una mezcla de 85/15 (ACN/AmAc). El resultado fue una separación inicial de B₀ y C₀. El aumento del contenido de ACN dio tiempos de retención más largos, pero picos más amplios, y aumentar el contenido AMAC dio tiempos de retención más cortos pero menos separación. B₀ y C₀ fueron controlados con ESI/MS en el modo positivo.

Este método proporciona sorprendentemente una separación rápida de B₀ de C₀ con una fase móvil que es compatible con los métodos de espectrometría de masas (la fase móvil es volátil y da una alta eficiencia de ionización). El método puede separar B₀ de C₀ en menos de 5 minutos o incluso menos de 3 minutos.

Las siguientes abreviaturas se usan con los significados especificados a lo largo de esta descripción:

Abreviaturas:

API - ingredientes farmacéuticos activos
 HILIC - cromatografía de líquidos de interacción hidrófila
 LC - cromatografía de líquidos
 HPLC - cromatografía de líquidos de alto rendimiento
 MS - espectrometría de Masas
 MS/MS - espectrometría de masas en tándem
 ESI/MS - ionización por electrospray espectrometría de masas
 TOF - tiempo de Vuelo
 ZIC - columna zwitteriónica
 ACN - acetonitrilo
 AMAC - acetato de amonio
 TFA - ácido trifluoroacético

EJEMPLOS

Ejemplo I

En este experimento se usó un sistema HPLC Agilent 1200 se acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6520 Q-TOF. El sistema HPLC Agilent 1200 consistía en una bomba binaria, desgasificador, automuestreador termostatzado y compartimento termostatzado de columnas (fijado a 25 °C). Se usó una columna Supelco Ascentis Express HILIC de 15 cm x 4,6 mm, 2,7 µm. La fase móvil consistía en 15% v/v 0,1% p/p de acetato de amonio pH 4,5 y 85% v/v de ACN. El régimen de flujo fue de 1 ml/min. La figura 1A muestra que esta configuración cromatográfica es capaz de separar la pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀ en una mezcla que contiene ambos isómeros. La figura 1B muestra la identificación del pico de pneumocandina B₀ mediante el uso un estándar de referencia de pneumocandina B₀ pura. La figura 1C muestra la identificación del pico de la pneumocandina C₀ mediante el uso un estándar de referencia de la pneumocandina C₀ pura. La separación cromatográfica y los tiempos de retención podrían verse afectados por la alteración de los contenidos de acetato de amonio o ACN. El aumento del contenido de ACN resultó en tiempos de retención más largos y picos más amplios. El aumento del contenido de acetato de amonio dio lugar a tiempos de retención más cortos y disminución de la separación.

Figura 1:

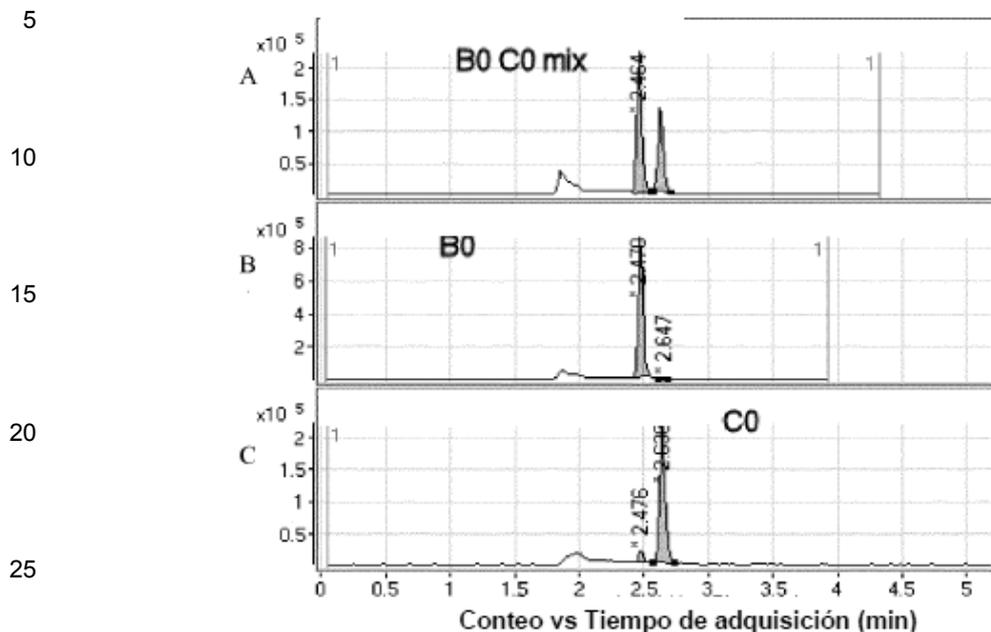
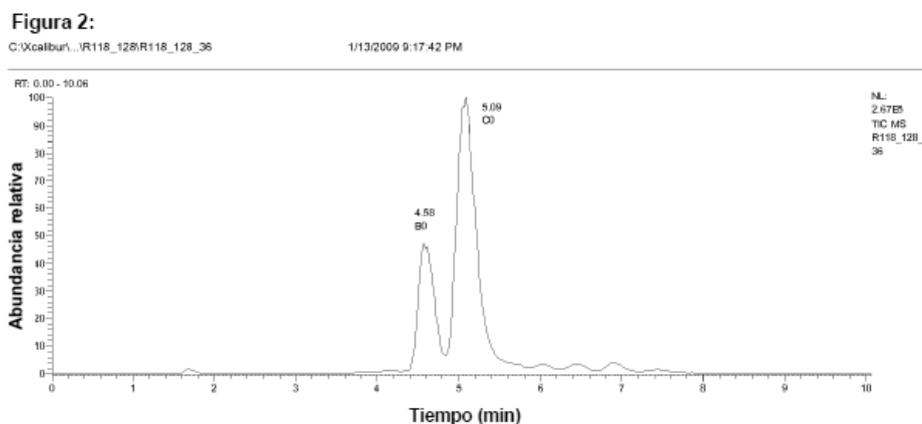


Fig. 1 Cromatogramas de masas selectivos de diferente experimentos de LC-MS. (A) Separación cromatográfica de la pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀ en una mezcla que contiene ambos isómeros. (B) Identificación del pico de pneumocandina B₀ mediante el uso de un estándar de referencia de pneumocandina B₀ pura. (C) Identificación del pico de la pneumocandina C₀ mediante el uso un estándar de referencia de pneumocandina C₀ pura.

Ejemplo II

En este experimento, se usó un sistema HPLC Thermo Fisher Surveyor. El sistema HPLC Surveyor consistía en una bomba cuaternaria, desgasificador, automuestreador con termostato y un compartimento termostatzado de columnas (fijado a 40 °C). Se usó una columna Supelco Ascentis Si HILIC de 15 cm x 2,1 mm, 5 µm. La fase móvil consistía en 13% v/v 0,1% p/p de acetato de amonio pH 4,5 y 87% v/v de ACN. El régimen de flujo fue de 0,2 ml/min. La figura 2 muestra que esta configuración cromatográfica es capaz de separar la Pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀ en una muestra que contiene ambos isómeros:



Reivindicaciones

- 5 1. Método de cromatografía de líquido de interacción hidrófila para la separación de la pneumocandina B₀ de la pneumocandina C₀
caracterizado por
el uso de un fase estacionaria hidrófila que comprende sílice sin modificar y una fase móvil hidrófoba que comprende 80 % -90 % v/v de acetonitrilo y 10 %-20 % v/v de una solución acuosa ácida.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la separación es una purificación.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fase estacionaria comprende grupos siloxano.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fase estacionaria comprende grupos silanol.
- 15 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fase estacionaria comprende grupos siloxano y silanol.
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fase móvil comprende 15% v/v 0,1% de acetato de amonio acuoso y 85% v/v de acetonitrilo.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tiempo de separación es de menos de 5 minutos.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tiempo de separación es de menos de 3 minutos.