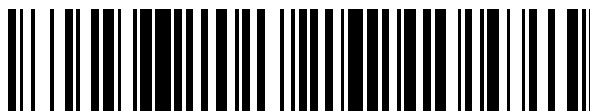


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 003**

51 Int. Cl.:

C07C 401/00 (2006.01)

A61K 31/592 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2009** **E 09720292 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2262765**

54 Título: **1,25-Dihidroxivitamina D2 estabilizada y método de preparación de la misma**

30 Prioridad:

12.03.2008 US 36021

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2016

73 Titular/es:

OPKO IRELAND GLOBAL HOLDINGS, LIMITED
(100.0%)
Citywest Business Campus
3013 Lake Drive, Dublin 24, IE

72 Inventor/es:

SAHA, UTTAM

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 575 003 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

1,25-Dihidroxitamina D₂ estabilizada y método de preparación de la misma

5 Referencia cruzada a la solicitud relacionada

Se reivindica por la presente el beneficio según 35 USC §119 (e) de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos con n° de Serie 61/036.021, presentada el 12 de marzo de 2008.

10 Antecedentes**Campo de la divulgación**

15 La divulgación se refiere, en general, a hormonas de vitamina D activas en forma purificada. Más particularmente, la divulgación se refiere a 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada, que es particularmente muy adecuada para formulaciones farmacéuticas.

Breve descripción de la tecnología relacionada

20 Los compuestos de vitamina D que tienen un grupo hidroxilo en la posición 1- α , a menudo considerados compuestos de vitamina D activados, han recibido una considerable atención en los últimos años debido a sus potentes actividades. Sin embargo, los compuestos de vitamina D activados se conocen también por ser químicamente inestables, particularmente por exposición a la luz y al oxígeno, y por tener una mala estabilidad durante el almacenamiento a temperaturas más altas. La conformación de compuestos de vitamina D activados en formulaciones farmacéuticas puede empeorar estos problemas de estabilidad.

La Patente de Estados Unidos n.º 6.903.083 (7 de junio 2005) informaba sobre la purificación de 24-hidroxitamina D₂ y cis-1 α -hidroxivitamina D₂ por recristalización en formiato de metilo, y los resultados del ensayo de estabilidad de las mismas.

Sumario

El método y el uso reivindicados de la divulgación proporcionan 1,25-dihidroxitamina D₂ sorprendentemente estable, caracterizada por estar exenta de formiato de metilo, preferentemente completamente exenta de formiato de metilo.

La divulgación proporciona un método eficaz para cristalizar 1,25-dihidroxitamina D₂ para producir una 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada con un rendimiento relativamente alto, incluyendo el método cristalización en una mezcla acetona/agua.

Para las composiciones y métodos descritos en el presente documento, las características preferidas, tales como componentes, intervalos composicionales de los mismos, propiedades funcionales, sustituyentes, condiciones y etapas, pueden seleccionarse a partir de los diversos ejemplos proporcionados en el presente documento.

Otros aspectos y ventajas resultarán evidentes para los expertos habituales en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos. Aunque el método y el uso reivindicados son susceptibles de realizaciones preferidas en diversas formas, la descripción dada a continuación incluye realizaciones preferidas específicas, entendiendo que la divulgación es ilustrativa, y no se pretende que limite la invención a estas realizaciones específicas descritas en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Para facilitar adicionalmente la comprensión de la presente invención, se adjuntan a la misma dos figuras de dibujos.

Las Figuras 1 y 2 representan un ensayo de estabilidad acelerada de 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la divulgación del presente documento, en comparación con 1,25-dihidroxitamina D₂ que contiene formiato de metilo.

Descripción detallada

La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada se caracteriza por estar exenta de formiato de metilo y tener un alto nivel de pureza (por ejemplo, al menos un 97 %). El método para preparar la 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada puede incluir cristalización en una mezcla de acetona/agua.

Se contempla la 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada y un método de cristalización abarcados por realizaciones que incluyen cualquier combinación de uno o más de los elementos opcionales adicionales, características y etapas

adicionales descritas más adelante (incluyendo aquellas mostradas en las figuras), a menos que se indique de otra manera.

La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada producida por el método o el uso reivindicados es cristalina, estable durante el almacenamiento y muy adecuada para formulaciones de terapia modernas. Los estudios han demostrado que la 1,25-dihidroxitamina D₂ de acuerdo con la descripción del presente documento es sorprendentemente estable. En particular, se caracteriza por una velocidad de degradación reducida tras exponerla a calor y durante un almacenamiento prolongado. La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la descripción del presente documento presentará una estabilidad durante el almacenamiento excelente y sin precedentes, cuando se formula en una forma de dosificación farmacéutica, por ejemplo, una cápsula de gelatina blanda.

La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada producida por el método o el uso reivindicados tiene una pureza igual o mayor del 97 % (es decir, al menos un 97 %) basada en el área total bajo la curva (AUC) por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), preferentemente al menos un 98 % de pureza, o al menos un 98,5 % de pureza. También está exenta de formiato de metilo. La sustancia 1,25-dihidroxi-vitamina D₂ estabilizada opcionalmente tiene una baja concentración de 1,25-dihidroxi-previtamina-D₂ (por ejemplo, preferentemente, no más del 2,5 %, no más del 1 %, o no más del 0,5 %).

El formiato de metilo se muestra en la técnica anterior como un disolvente de cristalización adecuado para 1,25-dihidroxitamina D₂ y muchos otros compuestos de vitamina D activos. Se ha encontrado ahora que el formiato de metilo residual tiene un efecto perjudicial sobre la estabilidad de 1,25-dihidroxitamina D₂ y su previtamina, conduciendo a una degradación notable con el tiempo, incluso a niveles muy bajos de concentración de formiato de metilo residual y en condiciones de almacenamiento controlado (por ejemplo, -20 °C y atmósfera inerte). Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que el formiato de metilo se hidroliza (por ejemplo, a temperatura elevada, o con el tiempo), en presencia incluso de una cantidad de agua muy pequeña, para producir ácido fórmico y metanol. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que el ácido fórmico promueve la formación subproductos de 1,25-dihidroxitamina D₂, presumiblemente provocando la formación de un dieno conjugado por protonación del grupo 25-dihidroxi y posterior retirada de agua.

Por consiguiente, en otro aspecto, la 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada producida por el método o el uso reivindicados opcionalmente también estará exenta de, o sustancialmente exenta de, disolventes residuales que puedan producir ácidos incluyendo, aunque sin limitación, ésteres de alcohol de ácidos orgánicos y ésteres de alcohol de ésteres inorgánicos. Los ejemplos no limitantes incluyen ésteres de formiato (por ejemplo, formiato de metilo, formiato de etilo); ésteres de acetato (por ejemplo, acetato de metilo, acetato de butilo, acetato de etilo, acetato de isoamilo, diacetato de 1,2-etanodiol, triacetato de 1, 2, 3-propanotriol) y ésteres de lactato (por ejemplo, lactato de etilo, lactato de metilo). Por ejemplo, el nivel de tales componentes residuales preferentemente es menor de 1 %, 0,5 %, 1.000 ppm, 500 ppm, o 100 ppm. La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada también está opcionalmente exenta de, o sustancialmente exenta de, uno o más de los siguientes: disolventes halogenados, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y ácidos. Por ejemplo, el nivel de tales disolventes halogenados residuales preferentemente es menor de 1 %, 0,5 %, 1.000 ppm, 500 ppm, o 100 ppm.

Además opcionalmente, aunque preferentemente, la 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la descripción del presente documento, según se produce por el método o el uso reivindicados, tiene una pureza de al menos el 97 % (o al menos el 98 % o al menos el 98,5 %), un contenido de disolventes residuales del 0,5 % o menor, adicionalmente opcionalmente un contenido de impurezas totales del 1,5 % o menor, y además opcionalmente no tiene una sola impureza mayor del 0,5 % por HPLC.

La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la descripción del presente documento, según se produce por el método o el uso reivindicados, es estable en condiciones de exposición a calor. En una realización, la 1,25-dihidroxitamina D₂ es al menos aproximadamente el 98 %, preferentemente al menos el 98,5 %, por ejemplo al menos el 99 % pura después del almacenamiento a 60 °C durante al menos 24 horas, preferentemente durante al menos 72 horas. En otra realización, la cantidad de 1,25-dihidroxitamina D₂ que queda después del almacenamiento a 60 °C durante al menos 24 horas es preferentemente de al menos el 97,5 %, más preferentemente al menos el 99 %, por ejemplo al menos el 99,9 % de la cantidad inicial. En otra realización, la cantidad de 1,25-dihidroxitamina D₂ que permanece después del almacenamiento a 60 °C durante al menos 72 horas es preferentemente de al menos el 97 %, más preferentemente al menos el 98,5 %, por ejemplo al menos aproximadamente el 99,5 % de la cantidad inicial.

La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la descripción del presente documento, según se produce por el método o el uso reivindicados, es estable durante un periodo de tiempo prolongado en condiciones de almacenamiento a largo plazo. En una realización, la 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la descripción del presente documento tiene una pureza de al menos el 98 %, preferentemente al menos el 98,5 %, más preferentemente al menos el 99 % después del almacenamiento a -20 °C en atmósfera de argón durante al menos 3, 6, 9, 12 o 15 meses. En la Tabla 1 se muestran las realizaciones y ejemplos del porcentaje de la cantidad inicial de 1,25-dihidroxitamina D₂ que queda después del almacenamiento a -20 °C en atmósfera de argón durante al menos 3, 6, 9, 12 o 15 meses.

Tabla 1

	Porcentaje de la cantidad inicial de 1,25-dihidroxitamina D ₂ que queda después de un periodo de tiempo prolongado		
Periodo de tiempo	Preferentemente	Más preferentemente	Ejemplo
Al menos 3 meses	Al menos 99 %	Al menos 99,5 %	Al menos 99,9 %
Al menos 6 meses	Al menos 97 %	Al menos 98,5 %	Al menos 99,9 %
Al menos 9 meses	Al menos 94 %	Al menos 97 %	Al menos 99,9 %
Al menos 12 meses	Al menos 94 %	Al menos 97 %	Al menos 99,9 %
Al menos 15 meses	Al menos 94 %	Al menos 97 %	Al menos 99,9 %

La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada, según se produce por el método o el uso reivindicados, se usa adecuadamente en formulaciones farmacéuticas tales como para uso oral (por ejemplo, cápsulas de gelatina blandas o duras, soluciones, comprimidos) y para uso parenteral. De esta manera, la formulación farmacéutica preparada a partir de, o que contiene, 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada puede estar en forma de una solución no acuosa o una suspensión no acuosa (por ejemplo contenida en un vial o ampolla) o en forma sólida. En una realización preferida, la formulación de 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada es un aceite (por ejemplo un aceite de coco fraccionado). En otra realización preferida, la formulación de 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada es un sólido en forma de un comprimido, una cápsula, un gránulo o un polvo. La formulación farmacéutica puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen ingredientes funcionales y no funcionales, incluyendo vehículos, diluyentes, adyuvantes de procesamiento y agentes de modificación de la liberación. Tales formulaciones farmacéuticas pueden prepararse con la sustancia 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada descrita en el presente documento, usando cualquier técnica adecuada, incluyendo técnicas conocidas.

La dosificación de 1,25-dihidroxitamina D₂ para administración oral o parenteral generalmente es de aproximadamente 0,1 µg por semana a 100 µg por semana, preferentemente de aproximadamente 0,7 µg por semana a aproximadamente 70 µg por semana, que puede dividirse en dosis diarias u otro periodo, tal como tres veces por semana, para administración concomitante con hemodiálisis. En realizaciones ejemplares, se contempla una dosificación parenteral equivalente a aproximadamente 0,5 µg por día a aproximadamente de 7 µg por día, mientras que se contempla una dosificación oral equivalente a aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 µg por día.

La 1,25-dihidroxitamina-D₂ estabilizada puede administrarse mediante una forma de dosificación unitaria que comprende de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 25 µg, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por dosificación unitaria, por ejemplo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg o de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 µg. Se contempla también una forma de dosificación unitaria de liberación sostenida o retrasada, o de liberación sostenida, que incluye de aproximadamente 1 µg a aproximadamente de 10 µg, o más preferentemente de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 5 µg, por ejemplo.

Por ejemplo, en una formulación de gelatina blanda, el relleno de la cápsula adecuadamente contiene 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada que preferentemente está disuelta en un aceite farmacéuticamente aceptable, por ejemplo aceite de coco fraccionado, e incluye un antioxidante que puede ser, por ejemplo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) o vitamina E. La cubierta de la cápsula preferentemente contiene gelatina, glicerina, dióxido de titanio y agente colorante. El relleno típicamente es aproximadamente un 30-90 % en peso de toda la cápsula, preferentemente aproximadamente un 40-70 % en peso.

El compuesto de 1,25-dihidroxitamina D₂ puede prepararse por cualquier método de síntesis conocido. La 1,25-dihidroxitamina D₂ en bruto puede purificarse en columna para retirar el isómero trans de acuerdo con métodos conocidos. Una 1,25-dihidroxitamina D₂ purificada en columna puede estabilizarse por recristalización en una mezcla adecuada de disolvente orgánico y agua, consistente con divulgación en el presente documento, por ejemplo acetona y agua. Los cristales recristalizados se muelen después preferentemente hasta un polvo fino y se secan en un horno de vacío (por ejemplo a 40 °C durante 8-12 horas) para retirar los disolventes residuales. Pueden realizarse una o más recristalizaciones sucesivas (generalmente al menos dos). Los disolventes orgánicos adecuados, además de acetona, incluyen acetonitrilo, butanol, dietil cetona, etanol, éter, etilenglicol, heptano, metanol, metiletilcetona, propanol, tetrahidrofurano y combinaciones de los mismos. Si se realizan recristalizaciones en disolventes que contienen ácido o que producen ácido, tales como formiato de metilo, entonces se realizarán una o más recristalizaciones sucesivas (generalmente al menos dos) con un disolvente de acuerdo con la divulgación en el presente documento, para retirar los componentes residuales no deseados.

La 1,25-dihidroxitamina D₂ parcialmente pura se cristaliza en un disolvente que está exento de formiato de metilo, preferentemente además exento de al menos uno de los siguientes disolventes seleccionados del grupo que consiste en disolventes de éster de formiato, disolventes de éster de acetato, disolventes de éster de lactato, disolventes de éster de alcohol, disolventes halogenados, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y disolventes capaces

de generar ácido. El sistema de disolventes es preferentemente acetona/agua, más preferentemente usando una proporción 1:1. Aunque pueden usarse otros disolventes como se ha definido anteriormente, se ha encontrado que la cristalización en acetona/agua da un rendimiento muy alto del producto deseado y también proporcionaba beneficiosamente niveles muy bajos de 1,25-dihidroxi-*previtamina* D₂. Se encontró que cada etapa de cristalización en acetona/agua daba un rendimiento mayor del 90 % en comparación con la cristalización en formiato de metilo, que se encontró que daba rendimientos en el intervalo del 50 % al 60 %.

Si se realiza un método de cristalización multietapa para purificar la 1,25-dihidroxi-*vitamina* D₂, entonces preferentemente los disolventes identificados en el presente documento (exentos de formiato de metilo, además, preferentemente exentos de al menos uno de los siguientes disolventes seleccionados del grupo que consiste en disolventes de éster de formiato, disolventes de éster de acetato, disolventes de éster de lactato, disolventes éster de alcohol, disolventes halogenados, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, y disolventes capaces de generar ácido) se usan en la etapa de cristalización final, con el objetivo de minimizar, y preferentemente al menos, eliminar sustancialmente las especies no deseadas identificadas en el presente documento, tales como disolventes residuales.

El material en bruto se calienta a reflujo en primer lugar con acetona a una temperatura en un intervalo de 50 °C a 60 °C (15 ml/1 g) hasta que se obtiene una solución transparente. La solución se filtra después a través de un embudo sinterizado y se añade gradualmente un volumen de agua (preferentemente un volumen igual). Una vez que la temperatura se reduce a aproximadamente 25 °C y comienza la cristalización, la mezcla se enfría adicionalmente (por ejemplo, en un matraz colocado en un congelador a 4 °C durante 24 horas). El sólido después se filtra y se lava, preferentemente con una mezcla de acetona/agua (por ejemplo relación 1:1). Preferentemente, la mezcla acetona/agua se pre-enfría, por ejemplo a 4 °C. La cristalización puede repetirse hasta que el producto alcanza las especificaciones de pureza deseadas, preferentemente a un nivel de al menos un 97 % de pureza, más preferentemente al menos un 98 % o al menos un 98,5 % de pureza por HPLC.

El análisis por HPLC puede seguir adecuadamente los parámetros de la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Columna:	YMC-Pack Pro C18, 5 µm, 12 nm, 250x4,6 mm
Fase móvil:	70:30 acetonitrilo: agua isocrático
Caudal:	1,5 ml por minuto
Longitud de onda:	265 nm
Tiempo de ejecución:	20 min
Temperatura de la muestra:	15 °C ± 5 °C
Temperatura de la columna:	30 °C ± 5 °C
Concentración de la muestra:	1 mg/ml
Volumen de inyección:	10 µl

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Preparación de 1,25-dihidroxi-*vitamina* D₂ estabilizada

Se prepara 1,25-dihidroxi-*vitamina* D₂ siguiendo el procedimiento descrito en el Journal of Organic Chemistry 1988, 53, 3450-3457. El material en bruto se trata con anhídrido maleico en tetrahydrofurano a temperatura ambiente, seguido de purificación en columna, para retirar el isómero trans mediante un aducto de Diels-Alder.

La 1,25-dihidroxi-*vitamina* D₂ parcialmente pura se cristalizó en acetona/agua (1:1). El material en bruto se calentó a reflujo en primer lugar con acetona de calidad para HPLC (15 ml/1 g) hasta que se obtuvo una solución transparente. Después se filtró y se añadió gradualmente un volumen igual de 18,2 megaohm de agua. Una vez que la temperatura bajó a aproximadamente 25 °C y comenzó la formación de cristales, el matraz se puso en un congelador a 4 °C durante 24 horas. El sólido se filtró y se lavó con acetona/agua 1:1 pre-enfriada a 4 °C. La cristalización se repitió hasta que el producto alcanzó las especificaciones de pureza deseadas. En este ejemplo, la pureza era de 99,4 % (HPLC); ninguna impureza conocida era mayor del 0,5 % (1β,25-dihidroxi-*vitamina* D₂, 5,6-trans-1,25-dihidroxi-*vitamina* D₂, 22-cis-1,25-dihidroxi-*vitamina* D₂, y 1,25-dihidroxi-*previtamina* D₂); ninguna impureza desconocida era mayor del 0,1 %. Para secar el material sólido este se molió mediante un mortero y maja y se puso a 40 °C al vacío durante 8-12 horas.

Los parámetros de la Tabla 1 anterior se usaron para el análisis HPLC.

Ejemplo 2 - Ensayo de estabilidad acelerada de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada

Las muestras de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada de acuerdo con el Ejemplo 1 y la 1,25-dihidroxivitamina D₂ obtenida comercialmente (SAFC, Madison, Wisconsin, EE.UU.) preparada por cristalización en formiato de metilo, se pusieron en un horno a 60 °C en varios viales de color ámbar de 2 ml con tapas revestidas de teflón. Se tomaron muestras en diferentes puntos temporales y la pureza se comprobó por HPLC de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en las Tablas 3 y 4 a continuación y en las Figuras 1 y 2. La Figura 1 muestra la estabilidad observada de las dos preparaciones durante 24 horas, y la Figura 2 muestra la estabilidad durante 72 horas. A partir de estos estudios queda claro que el material purificado preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 sorprendentemente fue más estable en comparación con el material disponible en el mercado preparado usando formiato de metilo y que contenía formiato de metilo residual. El material estabilizado preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 es claramente ventajoso cuando se requiere aportar cualquier cantidad de calor durante la formulación.

Tabla 3

	formiato de metilo	A 60 °C	0 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h
Comercial	500 ppm	Pureza (% absoluto)	96,80	95,18	94,98	94,69	93,98	93,86	93,82
Ejemplo 1	no detectado		99,40	99,38	99,42	99,33	99,42	99,31	98,89

Tabla 4

	formiato de metilo	A 60 °C	% inicial	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h
Comercial	500 ppm	Pureza (% de la cantidad inicial)	100	98,33	98,12	97,82	97,09	96,97	96,92
Ejemplo 1	no detectado		100	99,98	100	99,93	100	99,90	99,50

Ejemplo 3 - Ensayo de estabilidad a largo plazo de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada

Se prepararon muestras adicionales de 1,25-dihidroxivitamina D₂ (SAFC Madison, Wisconsin, EE.UU.), que estaban sustancialmente libres de 1,25-dihidroxiprevitamina D₂, por cristalización en formiato de metilo, y que tenían niveles variados de formiato de metilo residual. Estas muestras se almacenaron a -20 °C en atmósfera de argón y se ensayaron periódicamente para su pureza por HPLC. Se prepararon también otras muestras de 1,25-dihidroxivitamina D₂ preparadas de acuerdo con la divulgación del presente documento, y sin formiato de metilo, y se ensayaron en las mismas condiciones. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6 a continuación.

Tabla 5

	Lote	Pureza de 1,25-Dihidroxivitamina D ₂ (% absoluto)					
	1,25-dihidroxivitamina D ₂	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	15 meses
A	10 ppm de formiato de metilo, 0,11 % de 1,25-dihidroxiprevitamina D ₂	99,48 %	97,99 % (3-1/2M)				
B	16 ppm de formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxiprevitamina D ₂	99,8 %				93,76 % (11M)	
C	78 ppm de formiato de metilo, 0,04 % de 1,25-dihidroxiprevitamina D ₂	97,54 %		94,3 % (7M)			
D	4.061 ppm de formiato de metilo, 0,21 % de 1,25-dihidroxiprevitamina D ₂	95,55 %	94,36 %		80,98 %		
E	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxiprevitamina	97,7 %		97,7 %			
F	sin formiato de metilo, 2 % de 1,25-dihidroxiprevitamina D ₂	99,5 %	99,5 %			98,7 %	
G	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxiprevitamina	99,36 %			99,42 %		99,40 %
H	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxiprevitamina	99,40 %		99,4 %		99,39 %	

Tabla 6

	Lote	Pureza de 1,25-dihidroxivitamina D ₂ (% de la cantidad inicial)					
	1,25-dihidroxivitamina D ₂	% Inicial	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	15 meses
A	10 ppm de formiato de metilo, 0,11 % de 1,25-dihidroxiprevitamina D ₂	100 %	98,50 % (3-1/2M)				

	Lote	Pureza de 1,25-dihidroxitamina D ₂ (% de la cantidad inicial)					
B	16 ppm de formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxitamina D ₂	100 %				93,95 % (11M)	
C	78 ppm de formiato de metilo, 0,04 % de 1,25-dihidroxitamina D ₂	100 %		96,68 % (7M)			
D	4.061 ppm de formiato de metilo, 0,21 % de 1,25-dihidroxitamina D ₂	100 %	98,75 %		84,75 %		
E	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxitamina	100 %		100 %			
F	sin formiato de metilo, 2 % de 1,25-dihidroxitamina D ₂	100 %	100 %			99,2 %	
G	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxitamina	100 %			100 %		100 %
H	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxitamina	100 %		100 %		100 %	

Aparte de las excepciones observadas a los 3,5 meses, 7 meses y 11 meses, las muestras se ensayaron a cero, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses y 15 meses después de su fabricación. Sorprendentemente, las muestras que superaban el 99 % de pureza en el momento de la fabricación y que incluso tenían cantidades bajas de 1,25-dihidroxitamina D₂ (por ejemplo, 0,11 % o 0 %) pero que contenían incluso una pequeña cantidad de formiato de metilo residual (por ejemplo, 10 ppm o 16 ppm) se encontró que caían por debajo del 98 % de pureza a los 3,5 meses y por debajo del 94 % de pureza en 11 meses. A diferencia de esto, la 1,25-dihidroxitamina D₂ preparada de acuerdo con la invención que cristalizó en acetona/agua y no contenía formiato de metilo (lotes G y H descritos anteriormente) no mostraba absolutamente ninguna disminución en la pureza durante al menos quince meses de almacenamiento.

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de 1,25-dihidroxitamina D₂ en bruto, que comprende cristalizar 1,25-dihidroxitamina D₂, caracterizado por que la cristalización es en un sistema de disolventes exento de formiato de metilo, comprendiendo el disolvente una mezcla de disolvente orgánico y agua, seleccionándose el disolvente orgánico del grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, butanol, dietil cetona, etanol, éter, etilenglicol, heptano, metanol, metil etil cetona, propanol, tetrahidrofurano y combinaciones de los mismos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el sistema de disolventes está adicionalmente exento de:
 - (a) al menos uno de los siguientes disolventes seleccionados del grupo que consiste en disolventes de éster de formiato, disolventes de éster de acetato, disolventes de éster de lactato, disolventes de éster de alcohol, disolventes halogenados, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y disolventes capaces de generar ácido; o
 - (b) disolventes de éster de formiato, disolventes de éster de acetato, disolventes de éster de lactato, disolventes éster de alcohol, disolventes halogenados, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y disolventes capaces de generar ácido.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende realizar dicha cristalización como la etapa de cristalización final en una purificación por cristalización multietapa.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sistema de disolventes es una mezcla acetona/agua.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende:
 - El reflujo de 1,25-dihidroxitamina D₂ en bruto con acetona de calidad para HPLC;
 - retirar por filtración los sólidos;
 - añadir un volumen de 18,2 megaohm de agua a la solución de acetona; y
 - reducir la temperatura de la solución para cristalizar la 1,25-dihidroxitamina D₂.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, que comprende además lavar la 1,25-dihidroxitamina D₂ cristalizada con una solución de acetona/agua y secar la 1,25-dihidroxitamina D₂ cristalizada para retirar los disolventes residuales.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa de formular la 1,25-dihidroxitamina D₂ purificada en una formulación farmacéutica que comprende la 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la formulación farmacéutica está en forma de una solución no acuosa o está en forma de una suspensión no acuosa o está en forma sólida.
9. El uso de un sistema de disolventes usado para cristalizar 1,25-dihidroxitamina D₂ para obtener 1,25-dihidroxitamina D₂ purificada en una forma que presenta estabilidad mejorada en comparación con si su cristalización se hubiera llevado a cabo usando un sistema de disolventes distinto del sistema de disolventes indicado, comprendiendo el sistema de disolventes una mezcla de disolvente orgánico y agua, seleccionándose el disolvente orgánico del grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, butanol, dietilcetona, etanol, éter, etilenglicol, heptano, metanol, metiletilcetona, propanol, tetrahidrofurano y combinaciones de los mismos, estando el sistema de disolventes exento de formiato de metilo.

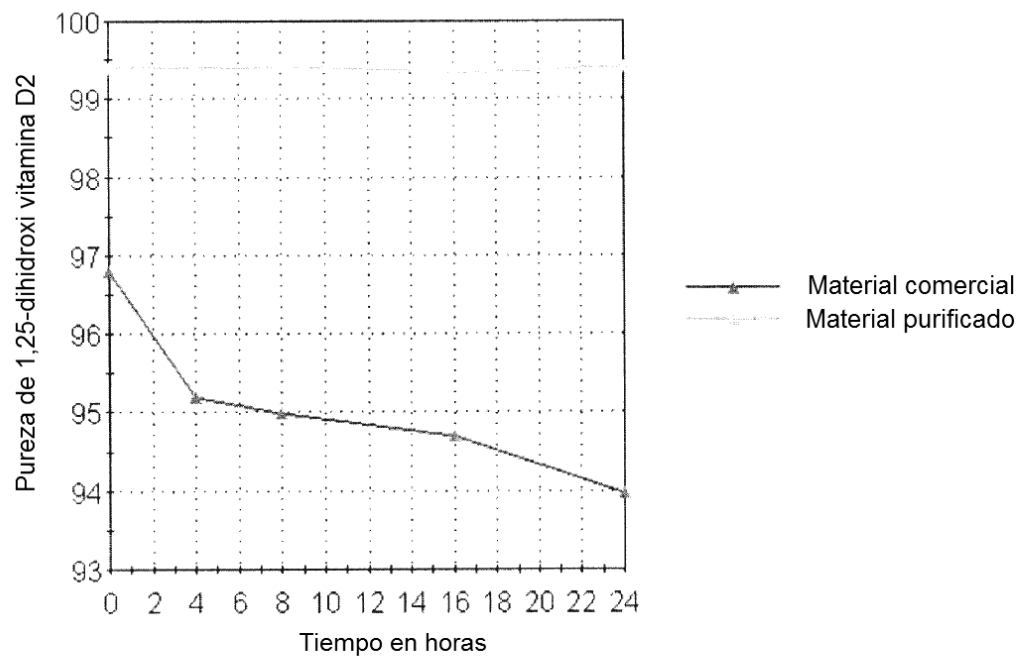


Figura 1

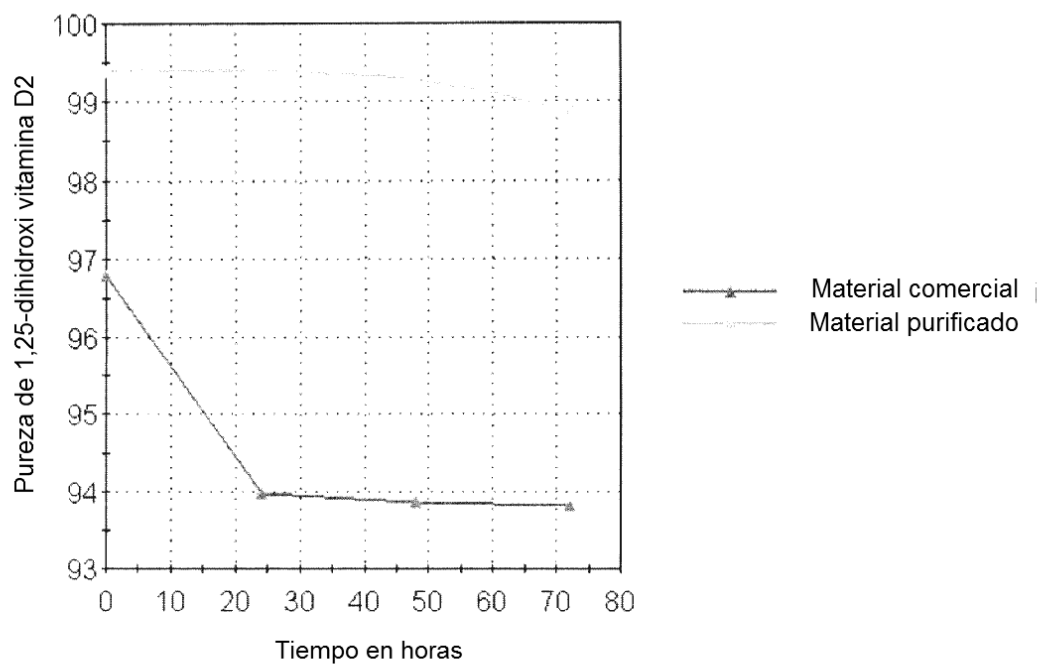


Figura 2