

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 562**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/56**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2011 E 11828114 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2623511**

54 Título: **Procedimiento para purificar compuestos lipopeptídicos cíclicos o sales de los mismos**

30 Prioridad:

**29.09.2010 CN 201010297406**

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

**06.09.2016**

73 Titular/es:

**SHANGHAI TECHWELL BIOPHARMACEUTICAL  
CO., LTD (100.0%)  
No. 4258 Jindu Road  
Shanghai 201108, CN**

72 Inventor/es:

**ZHANG, ZHAOLI;  
LIU, SHIDONG;  
ZHUO, ZHONGHAO y  
JI, XIAOMING**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 581 562 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 purificar compuestos lipopeptídicos cíclicos o sales de los mismos

5 **Campo técnico**

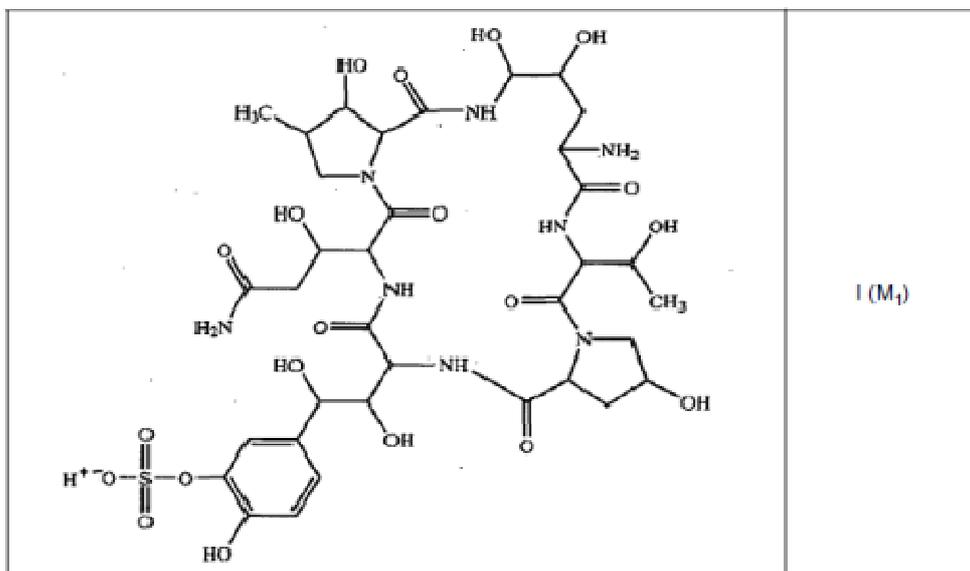
La presente invención se refiere al campo de la química orgánica, en particular, al procedimiento para purificar el compuesto ciclolipopeptídico de Fórmula I o las sales del mismo

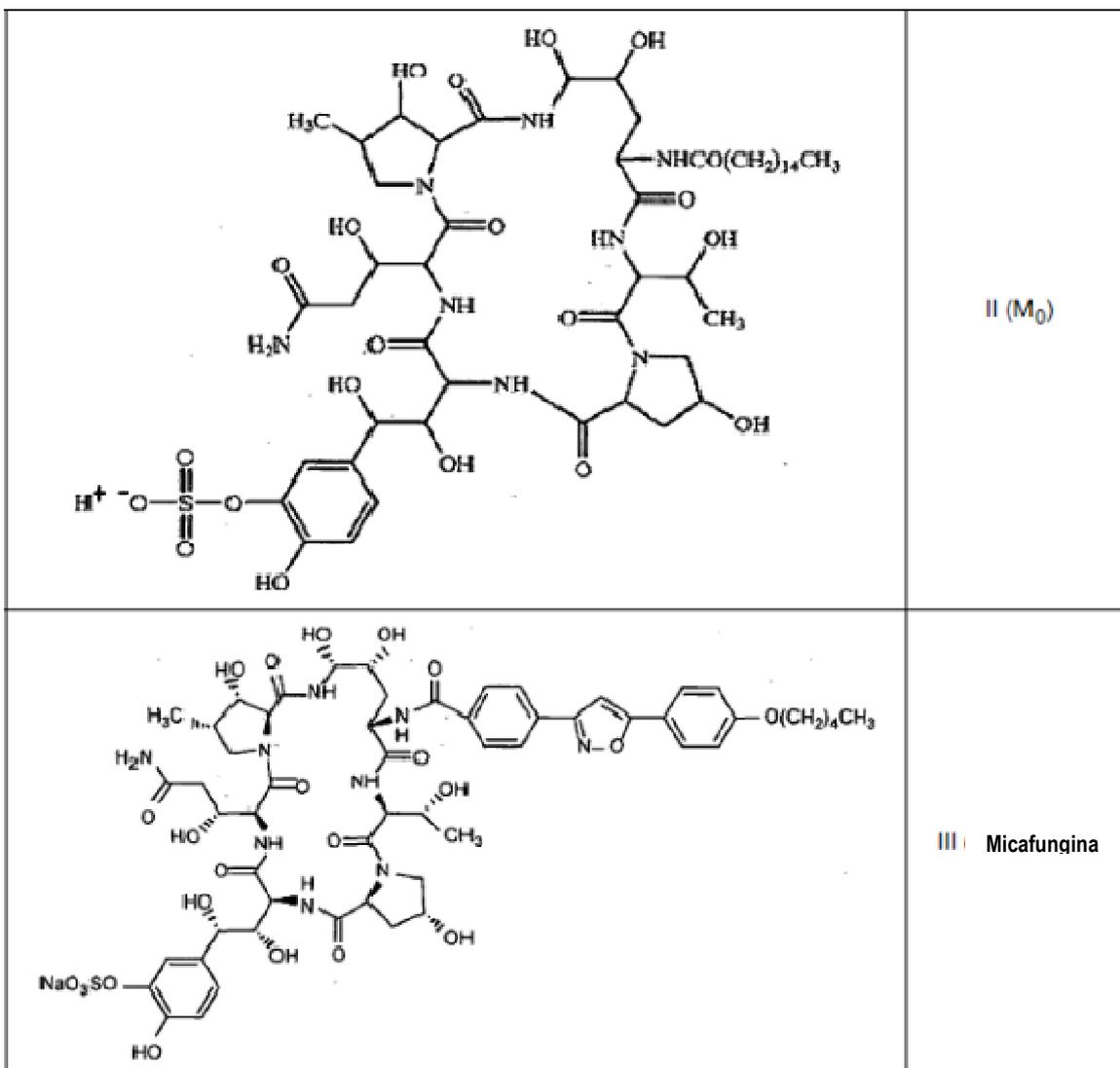
10 **Antecedentes**

Las infecciones por hongos se han convertido en la principal causa de la alta incidencia y mortalidad en pacientes con inmunodeficiencia. Durante los últimos 20 años, la incidencia de infección micótica ha aumentado significativamente. La población de alto riesgo para la infección por hongos, incluye a los pacientes críticos, pacientes quirúrgicos y los pacientes con infección por VIH, leucemia, así como con otros tumores. Además, los receptores de trasplantes de órganos son también población de alto riesgo para la infección por hongos.

Las equinocandinas son nuevos medicamentos anti-hongos, que son eficaces en el tratamiento de infecciones por Candida o Aspergillus, y los ejemplos de ellas son caspofungina y micafungina. Las equinocandinas inhiben a los hongos mediante la inhibición de la formación del enlace 1,3-β glucosídico, reduciendo así la toxicidad y los efectos secundarios hacia los humanos, mientras se mantiene una alta eficiencia. Por lo tanto, en comparación con los medicamentos antifúngicos tradicionales, las equinocandinas son más seguras cuando se utilizan.

FK463 (Micafungina) es el compuesto de Fórmula III, que se obtiene cortando la cadena lateral del compuesto FR901379 de Fórmula II (M<sub>0</sub>), formando así el compuesto FR179642 (M<sub>1</sub>) de Fórmula I, y añadiendo la cadena lateral al compuesto de Fórmula I mediante síntesis. Por lo tanto, el compuesto de Fórmula I con alta pureza es muy importante para la obtención de Micafungina con alta pureza.





- Se ha informado sobre las siguientes cepas para la transformación del compuesto de Fórmula II en el compuesto de Fórmula I por desacilación de la cadena lateral de acilo del compuesto anterior: *Streptomyces*, tales como *Streptomyces anulatus* No. 4811, *Streptomyces anulatus* No. 8703, *Streptomyces* sp. No. 6907, e IFO13244, IFO6798, IFO31963,, IFO9951, NRRL12052, etc. El documento US5376634 ha divulgado un método para purificar el compuesto de Fórmula I, en donde el método comprende las siguientes etapas: el compuesto de Fórmula II se transforma en el compuesto de Fórmula I por reacción enzimática, se filtra el líquido de transformación, el compuesto de Fórmula I se purifica a través de una columna de carbón activo y una columna de gel de sílice turnándose, y después de la concentración a presión reducida, se obtiene el compuesto de Fórmula I en forma de sólido blanco. Para este método, la cantidad de disolvente orgánico utilizado es grande, y el carbón activo y el gel de sílice utilizados no pueden ser reciclados, por lo tanto, dicho método contaminará el medio ambiente, puede ser dañino para la salud física de los operadores, y no es adecuado para la producción a gran escala.
- Por lo tanto, es urgente en la técnica encontrar un método de purificación sin necesidad de utilizar gran cantidad de disolvente o gel de sílice, y tal método no sólo puede superar los defectos de la técnica anterior, sino también mejorar la pureza del compuesto de Fórmula I.

### Sumario de la invención

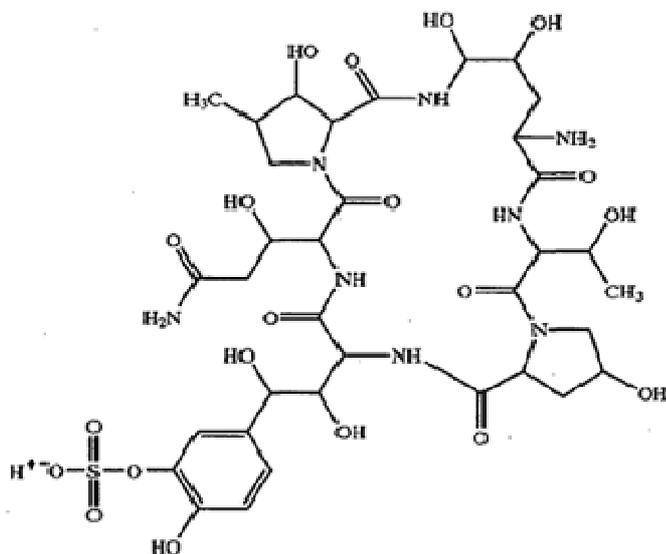
El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para purificar el compuesto de Fórmula I.

En la presente invención, se proporciona un procedimiento para purificar el compuesto de Fórmula I o las sales del mismo, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- (1) cargar el compuesto en bruto de Fórmula I en una resina de adsorción macroporosa;

(2) lavar la resina de adsorción macroporosa usando agua, un disolvente orgánico o una solución mixta de un disolvente orgánico y agua como el líquido de lavado; y

5 (3) eluir el compuesto de Fórmula I de la resina de adsorción macroporosa usando agua, un disolvente orgánico o una solución mixta de un disolvente orgánico y agua como eluyente;



I

10 en donde, la resina de adsorción de la etapa (1) comprende halógeno y está unida a una matriz de polímero de estireno a través de un enlace químico que es un enlace covalente; o

15 en la etapa (1), la solución comprende el compuesto en bruto de Fórmula I que comprende sales ionizables; y la resina de adsorción macroporosa se selecciona de entre una resina de adsorción aromática no polar polimerizada a partir de estireno y divinilbenceno, o una resina de adsorción metacrílica de polaridad moderada con unidades de metacrilato en su estructura.

20 En otra realización preferida, la resina de adsorción se selecciona de entre: XAD-1, XAD-2, XAD-3, XAD-4, XAD-5, XAD-16, XAD-16HP, HP-10, HP-20, HP-20ss, HP-21, HP-30, HP-40, HP-50, SP-825, SP-850, SP-70, SP-700, SP-207, SP-207ss, XAD-6, XAD-7, XAD-7HP, XAD-8, HP-2MG, o la mezcla de las mismas.

25 En otra realización preferida, la resina de adsorción comprende bromo y está unida a la matriz de polímero de estireno a través de un enlace químico que es un enlace covalente.

30 En otra realización preferida, la resina de adsorción se selecciona de entre: SP-207, SP-207ss, o la mezcla de las mismas.

35 En otra realización preferida, en la etapa (1), a la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I se le deja fluir a través de la columna cromatográfica llena de la resina de adsorción macroporosa o la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I se mezcla con la resina de adsorción macroporosa, cargando con ello el compuesto en bruto de Fórmula I en la resina de adsorción macroporosa; y el caudal es 0,1-10 volúmenes de columna por hora.

40 En otra realización preferida, la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I comprende sales ionizables, la sal ionizable se selecciona de entre sulfatos, nitratos, sales que comprenden halógeno, fosfatos, acetatos, carbonatos, citratos, silicatos, persulfatos, cromatos, lactatos, oxalatos, etc., o la mezcla de los mismos.

45 En una realización del procedimiento de purificación proporcionado por la invención, en la etapa (2), el porcentaje en volumen del disolvente orgánico es de 0-3%, preferiblemente 0-2%, basado en el volumen total del líquido de lavado.

50 En una realización del procedimiento de purificación proporcionado por la invención, en la etapa (3), el porcentaje en volumen del disolvente orgánico es de 0-20%, preferiblemente 0-5%, basado en el volumen total de eluyente.

En una realización del procedimiento de purificación proporcionado por la invención, en la etapa (1), la relación en peso del compuesto en bruto de Fórmula I con respecto a la resina de adsorción macroporosa es 0,1-15 (g/L); preferiblemente, 5-10 (g/L)).

5 En una realización del procedimiento de purificación proporcionado por la invención, el disolvente orgánico se selecciona de entre: alcohol C<sub>1-4</sub>, cetona C<sub>1-4</sub>; preferiblemente, el disolvente orgánico se selecciona de entre: metanol, etanol, propanol, butanol, acetona, butanona, o la mezcla de los mismos; más preferiblemente, se selecciona de entre: metanol, etanol o acetona.

10 De acuerdo con ello, en la invención se proporciona un método de purificación sin necesidad de utilizar gran cantidad de disolvente y gel de sílice, y tal método no sólo puede superar los defectos de la técnica anterior, sino también mejorar la pureza del compuesto de Fórmula I.

### Breve descripción de los dibujos

15 La Fig. 1 muestra el cromatograma de HPLC del compuesto en bruto 1 de Fórmula I de acuerdo con el Ejemplo 1.

La Fig. 2 muestra el cromatograma de HPLC del compuesto de Fórmula I purificado en el Ejemplo 6.

### 20 Descripción detallada de la invención

A través de una gran cantidad de experimentos, los inventores han descubierto que la resina de adsorción aromática macroporosa, especialmente resinas de derivados aromáticos, tal como la resina aromática con bromo unido a su esqueleto, tiene una adsorción hidrofóbica mejorada, y tal resina exhibirá una fuerte adsorción de la sustancia con una fuerte hidrofili-  
25 dad, tal como el compuesto de la Fórmula I. la resina es significativamente eficaz en la purificación del compuesto de Fórmula I con las impurezas relevantes.

La resina de adsorción aromática no polar polimerizada a partir de estireno y divinilbenceno, o una resina de adsorción metacrílica de polaridad moderada con unidades de metacrilato en su estructura tiene una adsorción hidrófoba débil, por lo tanto, exhibirá una adsorción débil de la sustancia con fuerte hidrofili-  
30 dad, tal como el compuesto de Fórmula I. Sin embargo, los inventores han descubierto sorprendentemente que cuando el compuesto de Fórmula I se absorbe sobre la resina de adsorción macroporosa, se pueden añadir sales ionizables para mejorar la hidrofobicidad del compuesto diana, por lo tanto, el compuesto de Fórmula I se puede absorber fácilmente en la resina, purificando de este modo el compuesto de Fórmula I.

35 El procedimiento para purificar el compuesto de Fórmula I proporcionado por la presente invención incluye las siguientes etapas:

40 en la primera etapa, cargar el compuesto en bruto de Fórmula I en una resina de adsorción macroporosa;

en la segunda etapa, lavar la resina de adsorción macroporosa usando agua, un disolvente orgánico o una solución mixta de disolvente orgánico y agua como líquido de lavado; y

45 en la tercera etapa, eluir el compuesto de Fórmula I de la resina de adsorción macroporosa usando agua, un disolvente orgánico o una solución mixta de un disolvente orgánico y agua como eluyente.

La primera etapa se puede realizar poniendo la solución del compuesto en bruto de Fórmula I en contacto con la resina de adsorción macroporosa. El contacto se puede realizar por: a. alimentando directamente la resina de adsorción a la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I, y agitando la mezcla resultante durante 5-120 minutos; o b. llenando el dispositivo cromatográfico, tal como una columna cromatográfica con la resina de adsorción, y dejando fluir la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I a través de la columna cromatográfica, en donde el caudal puede ser 0,1-10 volúmenes de columna por hora.

55 En un ejemplo de la invención, el procedimiento de purificación incluye las siguientes etapas:

A. alimentar directamente la resina de adsorción a la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I, y agitar la mezcla resultante durante 5-120 minutos;

60 B. separar la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I de la resina;

C. lavar la resina de adsorción macroporosa en la etapa B usando agua, un disolvente orgánico o una solución mixta de un disolvente orgánico y agua como líquido de lavado;

D. eluir la resina de adsorción lavada obtenida en la etapa C mediante el uso de agua, un disolvente orgánico o una solución mixta de un disolvente orgánico y agua como eluyente, y luego recoger el eluato que comprende el compuesto de la Fórmula I, obteniendo de este modo el compuesto purificado de Fórmula I.

5 En la etapa B, la separación incluye, por ejemplo, filtración y centrifugación, para separar la resina de la fase de filtrado.

10 En procedimientos de purificación proporcionados por la invención, el disolvente orgánico se selecciona de: alcohol C<sub>1-4</sub>, cetona C<sub>1-4</sub>, o la mezcla de los mismos; preferiblemente, metanol, etanol, propanol, butanol, acetona, butanona, o la mezcla de los mismos.

15 En procedimientos de purificación proporcionados por la invención, la resina de adsorción macroporosa se selecciona de entre una resina de adsorción aromática no polar polimerizado a partir de estireno y divinilbenceno, o una resina de adsorción metacrílica de polaridad moderada con unidades de metacrilato en su estructura. Preferiblemente, la resina se selecciona de entre: resina de adsorción la serie XAD (RohmHaas, EE.UU.), resina de adsorción la serie Diaion HP (Mitsubishi Chemical Corporation, Japón), y la resina de adsorción que comprende bromo y está unido a la matriz de polímero de estireno a través de un enlace químico covalente. Más  
20 preferiblemente, la resina se selecciona de entre: XAD-1, XAD-2, XAD-3, XAD-4, XAD-5, XAD-6, XAD-7, XAD-7HP, XAD-8, XAD-16, XAD-16HP, HP-10, HP-20, HP-20ss, HP-21, HP-30, HP-40, HP-50, HP-2MG, SP-825, SP-850, SP-70, SP-700, SP207, SP207ss, o la mezcla de las mismas. Lo más preferible, es que la resina se seleccione de entre: HP20, XAD-16, XAD-16P, SP207, o productos mini-granulados, tales como HP-20ss, SP207ss, el tamaño de partícula de la cual es 0,063 mm-0,150 mm, y la ejecución de la separación se ha mejorado mucho.

25 Además, los inventores han descubierto que la resina de adsorción que comprende halógeno y está unido a la matriz de polímero de estireno a través de un enlace químico covalente posee una mayor absorción y eficiencia de separación. Se prefiere la resina de adsorción que comprende bromo y está unido con la matriz de polímero de estireno a través de un enlace químico covalente, y la resina más preferida es SP207, SP207ss, o de la mezcla de las mismas. Actualmente, las resinas de adsorción disponibles comercialmente que comprenden halógeno y está unido a la matriz de polímero de estireno a través de un enlace químico covalente son principalmente: SP207,  
30 SP207ss (Mitsubishi Chemical Corporation, Japón).

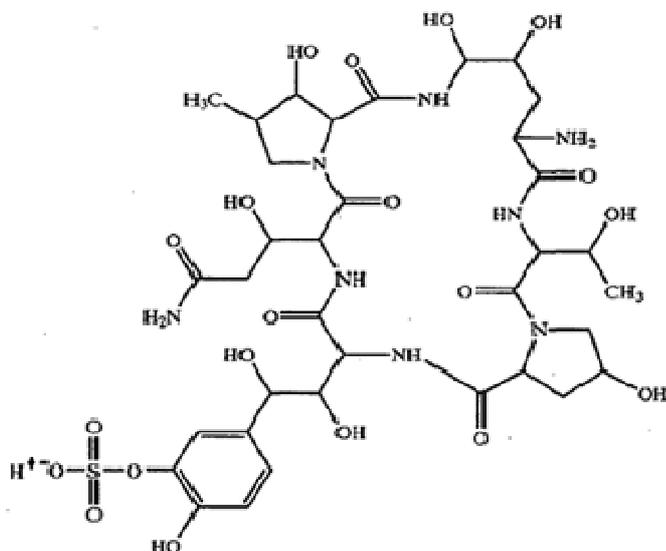
35 Con respecto a la resina de adsorción sin halógeno, el compuesto en bruto de Fórmula I se mezcla con sales ionizables antes de cargar el compuesto en bruto de Fórmula I, para incrementar la conductividad de la solución de carga y la hidrofobicidad del compuesto diana de Fórmula I, mejorando de ese modo la absorción de la resina del compuesto diana. La sal ionizable se selecciona entre sulfatos, nitratos, sales que comprenden halógeno, fosfatos, acetatos, carbonatos, citratos, silicatos, persulfatos, cromatos, lactatos, oxalatos, etc., o la mezcla de los mismos. Preferiblemente, la sal ionizable se selecciona de entre una o más del grupo siguiente que consiste en sales comunes: sales que comprenden halógeno, sulfatos, fosfatos, acetatos, carbonatos y citratos. Lo más preferible es que la resina se seleccione de entre: NaCl, KCl y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

40 En la segunda etapa del procedimiento de purificación proporcionado por la invención, la concentración del disolvente orgánico en el líquido de lavado es de 0-3%; preferiblemente, 0-2%. La sal ionizable puede ser añadida al líquido de lavado también. La sal ionizable incluye sulfatos, nitratos, sales que comprenden halógeno, fosfatos, acetatos, carbonatos, citratos, silicatos, persulfatos, cromatos, lactatos, oxalatos, etc., o la mezcla de las mismas. Preferiblemente, la sal ionizable se selecciona de entre una o más del grupo siguiente que consiste en sales comunes: sales que comprenden halógenos, sulfatos, fosfatos, acetatos, carbonatos y citratos. Lo más preferible es que la resina se seleccione de entre: NaCl, KCl y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

45 En la tercera etapa del procedimiento de purificación proporcionado por la invención, la concentración del disolvente orgánico en el eluyente es de 0-20%; preferiblemente, 0-5%.

50 En el procedimiento de purificación proporcionado por la invención, el lavado se puede realizar 1, 2, o 3 veces. El caudal de lavado puede ser 0,1-10 volúmenes de columna por hora. El caudal para la elución puede ser 0,1-10 volúmenes de columna por hora.

55 Tal como se usa en el presente documento, "compuesto de Fórmula I" y "compuesto I" se pueden utilizar indistintamente, tanto en referencia al compuesto que tiene la siguiente estructura o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



5 Tal como se usa en la presente memoria, "sal farmacéuticamente aceptable" significa sales formadas a partir de las siguientes bases: base inorgánica, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, aluminio, etc.; base orgánica, tal como metilamina, etilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ciclohexanolamina, lisina, ornitina, etc., u otras bases relevantes para las sales farmacéuticamente aceptables.

10 Tal como se usa en la presente memoria, "pureza del compuesto de Fórmula I", "pureza del compuesto I" y "pureza de HPLC del compuesto I" se pueden utilizar indistintamente, todas ellas con referencia al porcentaje del área del pico del compuesto I con respecto a la suma de todas las áreas de los picos medidos en las condiciones de detección de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) proporcionadas por la invención.

15 Tal como se usa en la presente memoria, "compuesto en bruto de Fórmula I" y "compuesto en bruto I" se pueden utilizar indistintamente, tanto refiriéndose a una mezcla que contiene <80% del compuesto I, medido en las condiciones de detección de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) proporcionadas por la invención. El compuesto en bruto I se puede obtener utilizando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, incluyendo por ejemplo los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 del documento EP0431350B1, en el que el compuesto en bruto I se obtuvo por fermentación de *Coleophoma sp. F-11899 (FERM BP2635)* y, a continuación, por la extracción de los micelios utilizando un disolvente orgánico. Preferiblemente, la extracción se lleva a cabo añadiendo directamente el cultivo de fermentación en 2 veces el volumen del disolvente orgánico. El disolvente orgánico preferido se selecciona de entre metanol, etanol o acetona.

25 Tal como se usa en la presente memoria, "solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I" y "solución que comprende el compuesto en bruto I" se pueden utilizar indistintamente, tanto refiriéndose a una solución que contiene el compuesto diana I y uno o más compuestos no diana. La solución se puede obtener disolviendo el compuesto en bruto I en agua o en una solución tampón, o una solución de reacción que comprende el compuesto de Fórmula I obtenido a partir de cualquier procedimiento. Para preparar el compuesto I se puede utilizar la solución de reacción que comprende el compuesto I a partir de cualquier procedimiento conocido en la técnica (véase el ejemplo 1 del documento CN1040541C). Por ejemplo, la solución se obtiene mediante la adición de una cantidad de agua o disolvente orgánico a la solución de transformación del compuesto I. La concentración del disolvente orgánico en la solución del compuesto en bruto I es 0% -2%.

35 Tal como se usa en la presente memoria, "carga" se refiere al procedimiento de poner la solución que contiene el compuesto en bruto I en contacto con una resina de adsorción macroporosa de forma que el compuesto en bruto I se adsorbe en la resina de adsorción macroporosa. "Contacto" incluye alimentar directamente la resina de adsorción macroporosa a la solución y después agitar para permitir que ocurra la adsorción; o llenar con la resina de adsorción macroporosa un dispositivo cromatográfico y dejar que la solución fluya a través de la columna cromatográfica.

40 "Lavar" la resina de adsorción macroporosa significa que se deja pasar una solución tampón adecuada a través o sobre la resina de adsorción macroporosa.

Tal como se usa en la presente memoria, una "solución tampón de lavado" se refiere a una solución tampón utilizada para lavar la resina de adsorción macroporosa (principalmente para retirar la fase orgánica) antes de que el

compuesto diana I se eluya. Convenientemente, la solución tampón de lavado y la solución de tampón de carga de la muestra pueden, aunque no necesariamente, ser de la misma polaridad.

5 "Eluir" moléculas de la resina de adsorción macroporosa significa que las moléculas se retiran de la resina de adsorción macroporosa cambiando la polaridad de la solución tampón alrededor de la resina de adsorción macroporosa. Debido a la polaridad, la solución tampón puede competir con las moléculas por los sitios de adsorción en la resina de adsorción macroporosa.

10 Tal como se usa en la presente memoria, una "solución tampón de elución" se utiliza para eluir el compuesto diana I a partir de una fase estacionaria. El compuesto diana I se puede eluir de la resina de adsorción macroporosa mediante la solución tampón de elución.

15 "Purificar" el compuesto I a partir de una composición que comprende el compuesto diana I y uno o más compuestos no diana quiere decir que la pureza del compuesto I en la composición se aumenta retirando (total o parcialmente) al menos un compuesto no diana de la composición.

20 Todas las características mencionadas anteriormente o en los ejemplos siguientes de la invención se pueden combinar opcionalmente. Todas las características divulgadas en esta memoria se pueden utilizar en cualquier combinación. Cualquier característica alternativa que tengan el mismo, equivalente, o similar propósito puede sustituir a cada característica divulgada en esta especificación. Por lo tanto, a menos que se especifique lo contrario, las características como las divulgadas son sólo ejemplos generales de características equivalentes o similares.

Las principales ventajas de la invención incluyen:

25 1. Se proporciona un nuevo procedimiento de bajo costo para purificar un compuesto ciclolipopeptídico, en particular, compuestos de equinocandina;

30 2. Las ventajas de las etapas de purificación en el procedimiento proporcionado por la invención, tales como, una vía simple, condiciones suaves, rendimientos elevados de purificación, una pequeña cantidad del disolvente orgánico utilizado, tratamientos simples, baja contaminación del medio ambiente, en gran medida, reducen los requisitos de manipulación y equipos de procesamiento, reduciendo así el coste;

35 3. A través del procedimiento proporcionado por la invención se pueden obtener productos diana estables, facilitando de este modo el control de calidad en los productos finales y la producción a gran escala.

40 La invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos específicos. Se ha de entender que estos ejemplos solamente están destinados a ilustrar la invención. Respecto a los métodos experimentales de los siguientes ejemplos sin condiciones particulares, se llevan a cabo en condiciones rutinarias o según las instrucciones del fabricante. A menos que se especifique lo contrario, todos los porcentajes, relaciones, proporciones o partes son en peso.

La unidad de los porcentajes peso/ volumen en la invención es bien conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo, el peso de un soluto en una solución de 100 mL.

45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por el experto en la técnica. Además, cualquier procedimiento o material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria se pueden utilizar en el procedimiento de la presente invención. Las realizaciones y materiales preferidos descritos en la presente memoria se proporcionan meramente a título ilustrativo.

50 En los siguientes ejemplos, el compuesto I es detectado por HPLC:  
El análisis se realiza en el sistema de HPLC analítica Waters. El análisis de HPLC en fase inversa se utiliza para la determinación de FR179642, la equinocandina B y otros análogos. El material y las condiciones utilizadas en el análisis de fase inversa se enumeran como sigue: columna cromatográfica PLATISIL ODS (tamaño de partícula 5  
55  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm d.i.  $\times$  250 mm); Temperatura: 30 ° C; fase móvil: 3% acetonitrilo / 0,5% fosfato de dihidrógeno de sodio; caudal: 1 ml/min; detectado bajo UV de 210 nm.

Ejemplo 1  
Preparación del compuesto en bruto de Fórmula I

60 La solución de reacción que contenía el compuesto I se obtuvo de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento US5376634. En la solución, el contenido del compuesto I era 7,3 g / L, y la pureza de HPLC del compuesto fue 73,91% (véase la Fig. 1 y la Tabla 1 para el patrón de HPLC).

65 Tabla 1

## ES 2 581 562 T3

	Tiempo de retención	Área	Altura	% Área
1	5,257	52004	4607	1,15
2	5,815	202507	25208	4,49
3	6,432	87928	6165	1,95
4	6,895	8923	1043	0,20
5	7,291	121333	10471	2,69
6	7,710	44199	2234	0,98
7	8,353	11225	1099	0,25
8	9,578	3334358	165845	73,91
9	11,460	134324	9884	2,98
10	13,681	11436	779	0,25
11	14,848	9766	729	0,22
12	15,163	23807	1379	0,53
13	19,268	307011	6129	6,81
14	24,014	162338	6277	3,60

### Ejemplo 2 Purificación del compuesto I

5 En este Ejemplo se utilizaron 500 ml de solución que contenía el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 3,65 g de compuesto I.

10 Se añadió 25 g de NaCl a la solución en bruto. Tras la disolución, la solución en bruto se cargó en una columna cromatográfica llena con 370 ml de resina HP20ss, en la que el caudal para la carga fue de 1 volumen de columna por hora. Después, se utilizó NaCl acuoso al 3% (2 x volúmenes de columna) para lavar la columna siendo el caudal para el lavado 1 volumen de columna por hora. Y luego, se utilizaron 100 ml de agua pura como eluyente, en el que el caudal de elución es 1 volumen de columna por hora. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron y se mezclaron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 3,4 g mediante HPLC (rendimiento 93,2%), y su pureza fue del 97,2%.

### Ejemplo 3 Purificación del compuesto I

20 En este Ejemplo se utilizó 1 L de solución que contenía el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 7,3 g de compuesto I.

25 Se añadió 40 g de KCl a la solución de bruto. Tras la disolución, la solución en bruto se cargó en una columna cromatográfica llena de 0,8 L de resina XAD-16, en la que el caudal para la carga fue de 1 volumen de columna por hora. Después, se utilizó agua pura (5 x volúmenes de columna) para lavar la columna siendo el caudal para el lavado 1 volumen de columna por hora. Y luego, se utilizaron 2,5 L de metanol acuoso al 3% como eluyente, en el que el caudal de elución es 1 volumen de columna por hora. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron y se mezclaron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 6,6 g mediante HPLC (rendimiento 90,4%), y su pureza fue del 96,5%.

### Ejemplo 4 Purificación del compuesto I

35 En este Ejemplo se utilizó 1 L de solución que contenía el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 7,3 g de compuesto I.

40 La solución en bruto se añadió a un vaso de plástico de dosificación (5 L). Se añadieron al vaso de dosificación, 1,4 L de resina XAD-16HP y 50 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La mezcla resultante se agitó durante 120 minutos a la temperatura ambiente, y después se filtró por un embudo Büchner en que se colocó un trozo de papel de filtro. El filtrado se descartó, y la resina se cargó en una columna cromatográfica. Se usaron 3 L de agua pura para lavar la columna. Después, se utilizaron 5 L de acetona acuosa al 4% como eluyente. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 6,7 g mediante HPLC (rendimiento 92,5%), y su pureza fue del 97,3%.

### Ejemplo 5 Purificación del compuesto I

45 En este Ejemplo se utilizaron 0,5 L de solución que contenía el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 4,6 g de compuesto I.

La solución en bruto se cargó en una columna cromatográfica llena con 300 ml de resina SP207ss, en la que el caudal para la carga fue de 5 volúmenes de columna por hora. Después, se utilizó etanol acuoso al 1% (2 x volúmenes de columna) para lavar la columna siendo el caudal para el lavado 1 volumen de columna por hora, y se usó para lavar la columna etanol acuoso al 2% (2 x volúmenes de columna) siendo el caudal para el lavado 1 volumen de columna por hora. Y luego, se utilizaron 3,6 L de etanol acuoso al 3% como eluyente, en el que el caudal de elución es 1 volumen de columna por hora. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron y se mezclaron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 4,33 g mediante HPLC (rendimiento 94,2%), y su pureza fue del 99,0% (véase la Fig. 2 y la Tabla 2 para el patrón de HPLC).

Tabla 2

	Tiempo de retención	Área	Altura	% Área
1	6,481	100952	8789	0,41
2	6,890	29266	406	0,12
3	7,509	34144	889	0,14
4	9,464	24141515	1222680	99,00
5	11,387	82921	1983	0,33

## Ejemplo 6

## Purificación del compuesto I

En este Ejemplo se utilizaron 0,5 L de solución que contenía el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 4,6 g de compuesto I.

La solución en bruto se cargó en una columna cromatográfica llena con 600 ml de resina SP207ss, en la que el caudal para la carga fue de 5 volúmenes de columna por hora. Después, se utilizó agua pura (2 x volúmenes de columna) para lavar la columna siendo el caudal para el lavado 1 volumen de columna por hora. Y luego, se utilizaron 7,2 L de etanol acuoso al 2% como eluyente, en el que el caudal de elución es de 2 volúmenes de columna por hora. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron y se mezclaron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 4,4 g mediante HPLC (rendimiento 95,6%), y su pureza fue del 99,0%.

## Ejemplo 7

## Purificación del compuesto I

En este Ejemplo se utilizaron 0,5 L de solución que contenía el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 4,6 g de compuesto I.

La solución en bruto se cargó en una columna cromatográfica llena de 46 L de resina SP207, en el que el caudal para la carga fue de 5 volúmenes de columna por hora. Después, se utilizó agua pura (2 x volúmenes de columna) para lavar la columna siendo el caudal para el lavado 1 volumen de columna por hora. Y luego, se utilizaron 150 L de etanol acuoso al 20% como eluyente, en el que el caudal de elución es de 2 volúmenes de columna por hora. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron y se mezclaron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 4,02 g por HPLC (rendimiento 87,4%), y su pureza fue del 98,1%.

## Ejemplo 8

## Purificación del compuesto I

En este Ejemplo se utilizaron 0,5 L de solución que contenían el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 4,6 g de compuesto I.

La solución en bruto se cargó en una columna cromatográfica llena con 460 ml de resina SP207, en la que el caudal para la carga fue de 5 volúmenes de columna por hora. Después, se utilizó etanol acuoso al 1% (2 x volúmenes de columna) para lavar la columna siendo el caudal para el lavado 1 volumen de columna por hora. Y luego, se utilizó 3,0 L de etanol acuoso al 5% como eluyente, en el que el caudal de elución es de 1 volúmenes de columna por hora. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron y se mezclaron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 4,4 g mediante HPLC (rendimiento 95,6%), y su pureza fue del 97,9%.

## Ejemplo Comparativo 1 (Ejemplo de Referencia)

## Purificación del compuesto I

En este Ejemplo se utilizaron 500 ml de solución que contenía el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 3,65 g de compuesto I.

5 La solución en bruto se cargó en una columna cromatográfica llena con 370 ml de resina HP20ss, en la que el caudal para la carga fue de 1 volúmenes de columna por hora. Después, se utilizaron 1.000 ml de agua pura como eluyente, en el que el caudal de elución es de 1 volúmenes de columna por hora. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron y se mezclaron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 3,4 g mediante HPLC (rendimiento 93,2%), y su pureza fue del 75,2%.

Ejemplo Comparativo 2 (Ejemplo de Referencia)

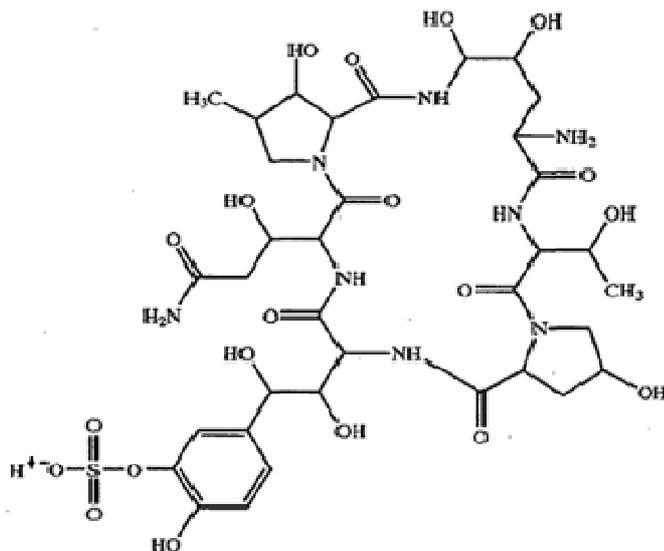
10 En este Ejemplo se utilizó 1 L de solución que contenía el compuesto en bruto I obtenido en el Ejemplo 1, en el que la solución contenía 7,3 g de compuesto I.

15 La solución en bruto se cargó en una columna cromatográfica llena de 0,8 L de resina XAD-16, en la que el caudal para la carga fue de 1 volúmenes de columna por hora. Después, se utilizó agua pura (5 x volúmenes de columna) para lavar la columna siendo el caudal para el lavado 1 volumen de columna por hora. Y luego, se utilizaron 2,5 L de metanol acuoso al 3% como eluyente, en el que el caudal de elución es de 1 volúmenes de columna por hora. Las porciones que contenían el compuesto I se recogieron y se mezclaron. El contenido de compuesto I en el eluato se determinó que era 6,6 g mediante HPLC (rendimiento 50,4%), y su pureza fue del 79,5%.

20 Los ejemplos anteriores 1-8 son meramente los ejemplos preferidos para la presente invención. Los contenidos técnicos sustanciales de acuerdo con la presente invención se definen ampliamente en las reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar el compuesto de Fórmula I o las sales del mismo, en donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
- (1) cargar el compuesto en bruto de Fórmula I en una resina de adsorción macroporosa;
  - (2) lavar la resina de adsorción macroporosa usando agua, un disolvente orgánico o una solución mixta de un disolvente orgánico y agua como el líquido de lavado; y
  - (3) eluir el compuesto de Fórmula I de la resina de adsorción macroporosa usando agua, un disolvente orgánico o una solución mixta de un disolvente orgánico y agua como eluyente;



en donde, la resina de adsorción de la etapa (1) comprende halógeno y está unida a una matriz de polímero de estireno a través de un enlace químico que es un enlace covalente; o

en la etapa (1), la solución comprende el compuesto en bruto de Fórmula I que comprende sales ionizables; y la resina de adsorción macroporosa se selecciona de entre una resina de adsorción aromática no polar polimerizada a partir de estireno y divinilbenceno, o una resina de adsorción metacrílica de polaridad moderada con unidades de metacrilato en su estructura

2. El procedimiento de purificación según la reivindicación 1, en el que en la etapa (1), a la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I se le deja fluir a través de la columna cromatográfica llena de la resina de adsorción macroporosa o la solución que comprende el compuesto en bruto de Fórmula I se mezcla con la resina de adsorción macroporosa, cargando con ello el compuesto en bruto de Fórmula I en la resina de adsorción macroporosa.

3. El procedimiento de purificación según la reivindicación 2, en el que el caudal es 0,1-10 volúmenes de columna por hora.

4. El procedimiento de purificación según la reivindicación 1, en el que la resina de adsorción macroporosa se selecciona de entre XAD-1, XAD-2, XAD-3, XAD-4, XAD-5, XAD-16, XAD-16HP, HP-10, HP-20, HP-20ss, HP-21, HP-30, HP-40, HP-50, SP-825, SP-850, SP-70, SP-700, SP-207, SP-207ss, XAD-6, XAD-7, XAD-7HP, XAD-8, HP-2MG, o la mezcla de las mismas.

5. El procedimiento de purificación según la reivindicación 1, en el que la resina de adsorción comprende bromo y está unido a la matriz de polímero de estireno a través de un enlace químico que es un enlace covalente.

6. El procedimiento de purificación según la reivindicación 5, en el que la resina de adsorción se selecciona de entre: SP-207, SP-207ss, o la mezcla de las mismas.

7. El procedimiento de purificación según la reivindicación 1, en el que la sal ionizable se selecciona de entre sulfatos, nitratos, sales que comprenden halógeno, fosfatos, acetatos, carbonatos, citratos, silicatos, persulfatos, cromatos, lactatos, oxalatos, etc., o la mezcla de las mismas.

8. El procedimiento de purificación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el disolvente orgánico se selecciona de entre: alcohol C<sub>1-4</sub>, cetona C<sub>1-4</sub>.
- 5 9. El procedimiento de purificación según la reivindicación 8, en el que el disolvente orgánico se selecciona de entre: metanol, etanol, propanol, butanol, acetona, butanona, o de la mezcla de los mismos.
10. El procedimiento de purificación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que en la etapa (2), el porcentaje en volumen del disolvente orgánico es de 0-3%, preferentemente 0-2%, basado en el volumen total del líquido de lavado.
- 10 11. El procedimiento de purificación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que en la etapa (3), el porcentaje en volumen del disolvente orgánico es de 0-20%, preferiblemente 0-5%, basado en el volumen total de eluyente.
- 15 12. El procedimiento de purificación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que en la etapa (1), la relación en peso del compuesto en bruto de Fórmula I con respecto a la resina de adsorción macroporosa es 0,1-15 (g/L).
- 20

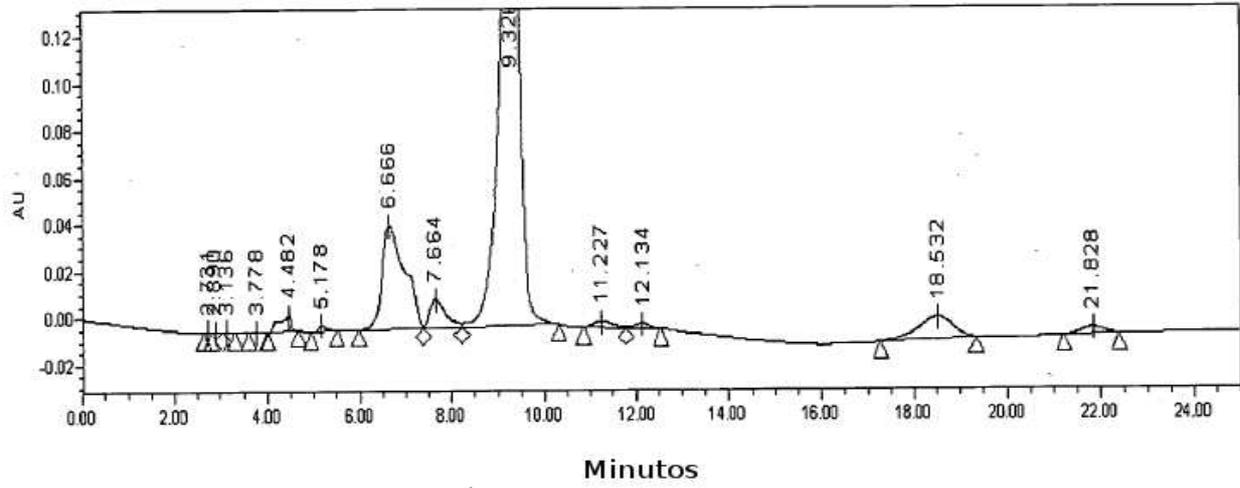


Fig. 1

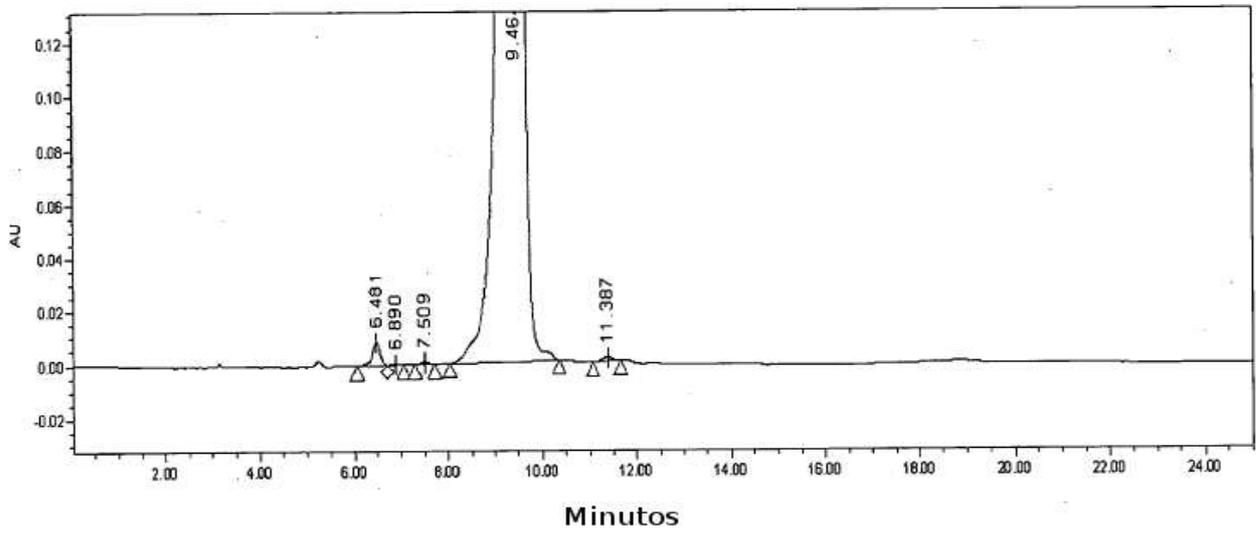


Fig. 2