

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 229**

51 Int. Cl.:

C07H 15/04 (2006.01)

A61K 31/706 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

C07H 17/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2013 PCT/JP2013/068466**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14007362**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2013 E 13813495 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2871188**

54 Título: **Método para separar un compuesto macrólido cíclico**

30 Prioridad:

06.07.2012 JP 2012152913

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

13.07.2017

73 Titular/es:

GODO SHUSEI CO., LTD. (100.0%)

6-2-10, Ginza, Chuo-ku

Tokyo, 1048162, JP

72 Inventor/es:

TSUKUDA, YUYA;

MURAMATSU, KEITA;

SASAKI, HIRONORI y

NAKAMURA, HIROHIDE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 624 229 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

Método para separar un compuesto macrólido cíclico

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para la separación y purificación de un compuesto macrólido cíclico, concretamente tacrolimus, que es útil como, por ejemplo, productos farmacéuticos.

10 Técnica antecedente

Entre los compuestos macrólidos cíclicos, existe una gran cantidad de sustancias útiles como productos farmacéuticos tales como antibióticos, por ejemplo, eritromicina, y fármacos inmunosupresores, por ejemplo, tacrolimus. Muchos de los compuestos macrólidos cíclicos se recogen de productos de microorganismos cultivados. Como dichos productos cultivados contienen gran cantidad de sustancias análogas diferentes al compuesto macrólido cíclico diana, se han notificado diversas técnicas para separar solo el compuesto diana.

Por ejemplo, como método de purificación clásico de un compuesto natural, existe una técnica donde una solución de ensayo se somete a una cromatografía en columna de gel de sílice en la plata está soportada sobre gel de sílice y se separan los compuestos que tienen un doble enlace en la estructura principal de los compuestos que no tienen un doble enlace (por ejemplo, Bibliografías no de patente 1 y 2).

Tacrolimus y sustancias análogas del mismo tienen un componente que tiene un doble enlace en la estructura principal de la cadena secundaria y un componente que no tiene un doble enlace. Por lo tanto, se notifica una técnica donde la plata está soportada en una resina de intercambio iónico fuertemente ácida y una mezcla de tacrolimus y sustancias análogas del mismo se pasan a través de la resina para separar el tacrolimus y las sustancias análogas (Bibliografía de patentes 1). Además, se notifica una técnica donde una mezcla se adsorbe en una resina adsorbtiva no iónica para separar tacrolimus y sustancias análogas del mismo mediante el uso de un disolvente acuoso que contiene ion plata, o similar (Bibliografía de patentes 2).

El documento JP 2007/516951 divulga el uso de compuestos macrólidos para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar.

El documento WO99/49863 A1 divulga preparaciones de macrólidos para la administración oral.

El documento JP 2005/531603 divulga agentes antibacterianos macrólidos de 3-descladinosil-5-O-carbamoilo y 6-O-carbonoilo.

El documento JP 2005/315668 divulga un agente de separación para un isómero óptico adecuado para cromatografía líquida de alta velocidad.

Listado de citas

Bibliografías de patentes

Bibliografía de patentes 1: documento JP 3750527 B1
Bibliografía de patentes 2: documento JP 3925198 B1

Bibliografías no de patentes

Bibliografía no de patentes 1: Isolation and Generation of Substances, Otake, et al., p. 70 (University of Tokyo Press, 1976)
Bibliografía no de patentes 2: J. Chromatograph. 69, 207 (1972)

55 Sumario de la Invención**Problemas que va a resolver la invención**

Sin embargo, aunque las técnicas descritas en las anteriores bibliografías de patentes son eficaces para la separación de un compuesto que tiene un doble enlace en la cadena secundaria y un compuesto que no tiene un doble enlace, no son eficaces para la separación de tacrolimus y un compuesto que tenga un doble enlace en la cadena secundaria, que sea igual a la de tacrolimus. De hecho, se ha sabido que un producto cultivado que contiene tacrolimus incluye un compuesto que tiene un doble enlace en la cadena secundaria de la misma forma que tacrolimus. Además, como se usa un compuesto de plata, se requieren técnicas para llevar a cabo una operación de retirar completamente la plata en una etapa de tratamiento posterior. Es también necesaria una consideración desde un punto de vista ambiental, ya que también es necesaria el tratamiento del líquido residual.

Por lo tanto, la presente invención es para proporcionar un método capaz de separar un compuesto macrólido cíclico diana sin utilizar un compuesto de plata incluso cuando se mezcla un compuesto que tiene un doble enlace similar al compuesto macrólido cíclico diana. Solución al problema

5 Por lo tanto, los presentes inventores han realizado diversos estudios sobre las técnicas de separación y purificación de una mezcla que comprende un compuesto macrólido cíclico tal como tacrolimus y compuestos análogos del mismo como diana, y han descubierto que, cuando se emplea una cromatografía en columna de gel de sílice que utiliza un agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice, al contrario que lo esperado, el tacrolimus y sustancias análogas del mismo, que no son enantiómeros, se separan eficazmente y se puede producir tacrolimus con una alta pureza, y la presente invención se completó de esta manera.

Es decir, la presente invención es para proporcionar los siguientes puntos [1] a [4].

15 [1] Un método para separar un compuesto macrólido cíclico a partir de una mezcla que comprende un compuesto macrólido cíclico y al menos uno de sus compuestos análogos, donde la mezcla se somete a cromatografía en columna de gel de sílice utilizando un agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice, donde el compuesto macrólido cíclico es tacrolimus y el agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice es un polisacárido modificado con carbamato inmovilizado en gel de sílice o un polímero sintético modificado con una amina ópticamente activa inmovilizado en gel de sílice.

20 [2] El método de acuerdo con [1], donde el compuesto análogo del mismo es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ascomicina, FR-901156 y FR-900525.

[3] Un método para producir un compuesto macrólido cíclico que comprende al menos uno de sus compuestos análogos en una cantidad de menos de 0,27%, donde una mezcla que comprende el compuesto macrólido cíclico y al menos uno de sus compuestos análogos se somete a cromatografía en columna de gel de sílice utilizando un agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice, donde el compuesto macrólido cíclico es tacrolimus y el agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice es un polisacárido modificado con carbamato inmovilizado en gel de sílice o un polímero sintético modificado con una amina ópticamente activa inmovilizado en gel de sílice.

30 [4] El método de acuerdo con [3], donde su compuesto análogo se selecciona entre el grupo que consiste en ascomicina, FR-901156 y FR-900525.

Efectos de la invención

35 De acuerdo con el método de separación de la presente invención, el compuesto análogo, que tiene diferencias con el compuesto macrólido cíclico en términos de si el compuesto análogo tiene dobles enlaces en cadenas secundarias o no y el compuesto análogo contiene un número de átomos de carbono mayor o menor de 1 o 2, y similar, puede separarse con un buen rendimiento. Incluso aunque la columna que se vaya a usar sea una columna que tiene esencialmente un agente identificador de asimetría, era totalmente inesperado que el compuesto análogo que es ligeramente diferente del compuesto macrólido cíclico en el número de átomos de carbono pudiera separarse.

Breve descripción de los dibujos

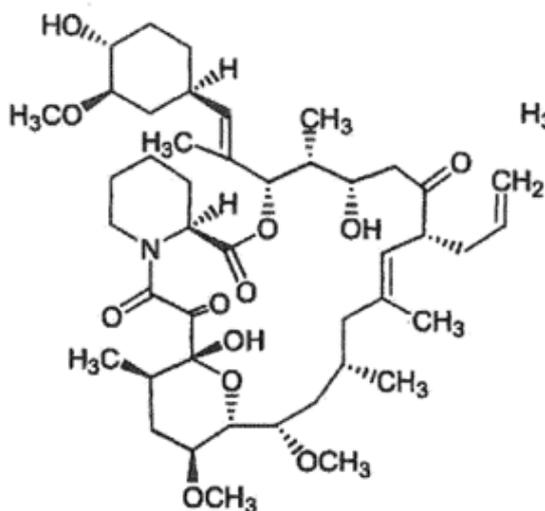
45 La Fig. 1 es una gráfica que ilustra un estado de separación mediante el método de separación del Ejemplo 1.
La Fig. 2 es una gráfica que ilustra un estado de separación mediante el método de separación del Ejemplo comparativo 1.
La Fig. 3 es una gráfica que ilustra un estado de separación mediante el método de separación del Ejemplo comparativo 2.

50 Descripción de las realizaciones

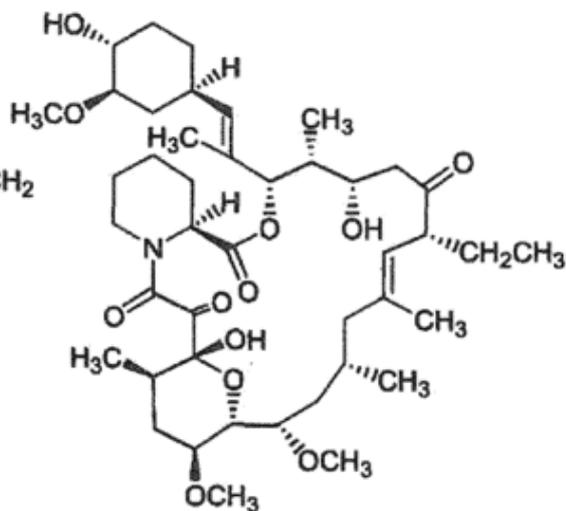
La presente invención se refiere a un método de separación y purificación de un compuesto macrólido cíclico diana a partir de una mezcla que comprende el compuesto macrólido cíclico y al menos uno de sus compuestos análogos mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando un agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice.

El compuesto macrólido cíclico es tacrolimus.

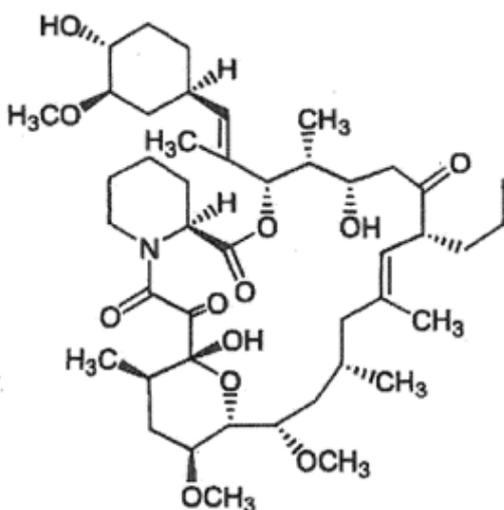
60 Los ejemplos del compuesto análogo del compuesto macrólido cíclico incluyen un compuesto análogo contenido en un producto cultivado cuando el compuesto macrólido cíclico se produce mediante una técnica de cultivo. Sus ejemplos incluyen compuestos que tienen diferencias estructurales respecto del compuesto macrólido cíclico, que se basan en si un doble enlace está incluido en una cadena secundaria o no y en si el número de átomos de carbono en la estructura de 1 o 2. Los ejemplos de compuesto análogo de tacrolimus incluyen ascomicina (FK520), FR-901156 y FR-900525. Las estructuras de tacrolimus, ascomicina, los documentos FR-901156 y FR-900525 se muestran en lo sucesivo.



Tacrolimus; FK506

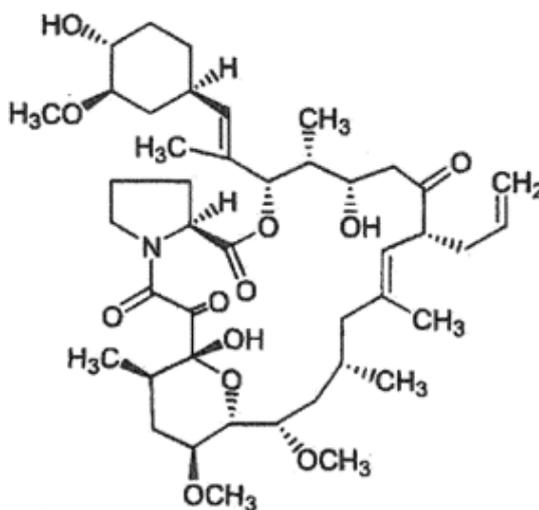


Ascomicina; FK5200



(FR-901156)

Compuesto I



(FR-900525)

Compuesto II

Una mezcla que comprende un compuesto macrólido cíclico y al menos uno de sus compuestos análogos utilizada en la presente invención es preferentemente una mezcla que comprende tacrolimus y al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ascomicina, FR-901156 y FR-900525. Más específicamente, es preferible un producto purificado bruto de una solución cultivada que contiene dicha mezcla.

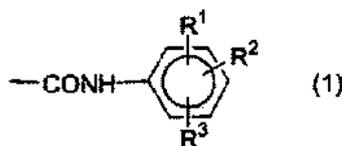
La mezcla contiene preferentemente un 60% en masa (denominada simplemente a partir de ahora en el presente documento como %) o más de tacrolimus, más preferentemente contiene un 70% o más, e incluso más preferentemente contiene un 80% o más. Además, el límite superior del contenido de tacrolimus es preferentemente un 98% o menos, más preferentemente un 95% o menos, e incluso más preferentemente 90% o menos. Un contenido específico de tacrolimus en la mezcla es preferentemente de 60 a 90%, más preferentemente de 70 a 95%, e incluso más preferentemente de 80 a 98%. La cantidad total del compuesto análogo en la mezcla es preferentemente un 2% o más, más preferentemente un 4% o más, adicionalmente preferentemente un 5% o más. El compuesto análogo está contenido preferentemente en la mezcla, preferentemente en una cantidad de 2 a 10%, más preferentemente de 4 a 10%, incluso de forma más preferente de 5 a 10%.

Un ejemplo de la mezcla incluye un producto purificado bruto de un producto cultivado de microorganismos

productores de tacrolimus. Los ejemplos de los microorganismos productores de tacrolimus incluyen los microorganismos descritos en el documento JP-B N.º 3-38276, por ejemplo, microorganismos productores de tacrolimus que pertenecen a Sptreptomyces, microorganismos productores de tacrolimus que pertenecen a tacrolimus tsukubaensis, pertenecientes a Streptomyces tsukubaensis, Streptomyces tsukubaensis N.º 9993, y similares. Los ejemplos de productos purificados brutos incluyen los productos purificados brutos descritos en la gaceta oficial.

En la presente invención se utiliza una columna de agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice como columna de separación. Tacrolimus y uno de sus compuestos análogos no son enantiómeros, pero son compuestos que tienen diferentes estructuras. Independientemente del hecho, era inesperado que tacrolimus y uno de sus compuestos análogos se pudieran separar eficazmente.

Los ejemplos de agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice incluyen un polisacárido modificado con carbamato inmovilizado en gel de sílice, y un polímero sintético modificado con una amina ópticamente activa inmovilizado en gel de sílice. Los ejemplos de polisacáridos modificados con carbamato incluyen celulosa modificada con carbamato, amilosa modificada con carbamato, agarosa modificada con carbamato, amilopectina modificada con carbamato, y ciclodextrina modificada con carbamato. Los ejemplos más específicos incluyen los polisacáridos modificados con fenilcarbamato representados por la fórmula (1) descrita a continuación:



(donde R^1 , R^2 y R^3 son iguales o diferentes y representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenoilo, un grupo alquinilo, un grupo alcoxi, un grupo arilo o un grupo alcanóilo). En el presente documento, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono es preferible como el grupo alquilo, un grupo alquenoilo y un grupo alquinilo que tienen, cada uno de ellos, de 2 a 6 átomos de carbono, son preferibles como el grupo alquenoilo y el grupo alquinilo. Un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono es preferible como el grupo alcoxi. Un grupo fenilo es preferible como el grupo arilo. Un grupo alcanóilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono es preferible como el grupo alcanóilo.

Los ejemplos de las aminas ópticamente activas incluyen (R) o (S) naftiletilamina y (R) o (S) feniletilamina.

El método de separación de la presente invención puede llevarse a cabo de la misma manera que en la cromatografía en columna de gel de sílice general excepto que se utiliza como columna la columna de agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice anteriormente descrita. Por ejemplo, una mezcla que comprende un compuesto macrólico cíclico y uno de sus compuestos análogos se pasa a través de una columna de agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice que posteriormente puede eluirse con un eluyente útil para la elución de los compuestos. Preferentemente, se usa como eluyente una solución mixta de un hidrocarburo saturado tal como hexano, alcoholes y/o éteres, una solución mixta de acetonitrilo, alcoholes, éteres, agua, y similares.

La pureza del tacrolimus obtenida de acuerdo con el método de la presente invención es preferentemente del 99,0% o más, más preferentemente del 99,5% o más, e incluso más preferentemente del 99,7% o más. Cada contenido del compuesto I y del compuesto II es preferentemente del 0,1% o menos, y la cantidad total de compuestos análogos de ascomicina, el compuesto I y el compuesto II es preferentemente menos del 0,27%.

Ejemplos

Los detalles de la presente invención se explicarán con referencia a los ejemplos.

Ejemplo de referencia 1

Un medio (150 ml, pH 6,5) que contienen glicerina (1%), almidón de maíz (1%), glucosa (0,5%), polvo de semillas de algodón (1%), licor de maíz fermentado (0,5%), levadura seca (0,5%) y carbonato de calcio (0,2%) se esteriliza a 120 °C durante 30 minutos. El medio esterilizado se inocula con un asa de siembra de un producto cultivado en tubos de cultivo de la cepa n.º 9993 de Streptomyces tsukubaensis (la corporación administrativa independiente, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, organismo depositario de organismos patentados, número de registro FFRM BP-927) y se llevó a cabo el cultivo con agitación a 30 °C durante 4 días. Un medio (15 l, pH 6,8) que contiene almidón soluble (4,5%), licor de maíz fermentado (1,0%), levadura seca (1%), carbonato de calcio (0,1%) y Adekanol (0,1%) se inoculó con el anterior producto cultivado obtenido y se cultivó a 30 °C durante 4 días.

Se añadieron el carbón activo y tierra de diatomeas al caldo de cultivo obtenido y se filtraron. Se extrajo una mezcla de micelio con 8 l de acetona para concentrar el extracto. Se añadieron 170 g de cloruro de sodio y 1,7 l de acetato de etilo al producto concentrado y, tras agitar, se retiró la capa acuosa. La capa orgánica se lavó con una solución acuosa de cloruro de sodio y, a continuación, se concentró la capa de acetato de etilo. El producto concentrado obtenido se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice, y las fracciones de tacrolimus eluidas con soluciones mixtas de acetato de etilo:n-hexano de (1:1) y (4:1) se concentraron para obtener de esta manera una mezcla que comprendía tacrolimus, ascomicina, 17-propil-1,14-dihidroxi-12-[2-(4-hidroxi-3-metoxiciclohexil)-1-metilvinil]-23,25-dimetoxi-13,19,21,27-tetrametil-11,28-dioxa-4-azatriciclo[22.3.1.0^{4,9}]octacos-18-eno-2,3,10, 16-tetraona (abreviada a partir de ahora en el presente documento como el compuesto I), y 16-alil-1,13-dihidroxi-11-[2-(4-hidroxi-3-metoxiciclohexil)-1-metilvinil]-22,24-dimetoxi-12,18,20,26-tetrametil-10,27-dioxa-4-azatriciclo[21.3.1.0^{4,8}]heptacos-17-eno-2,3,9,1 5-tetraona (abreviada a partir de ahora en el presente documento como el compuesto II). La relación de la composición es 90,5% de tacrolimus, 6,4% de ascomicina, 2,6% del compuesto I y 0,4% del compuesto II.

- 15 Es mejor una suma menor de las concentraciones de ascomicina, el compuesto I y el compuesto II, que están contenidos en la fracción activa separada, y se requiere que la suma sea menor de 0,27% para usos prácticos.

Ejemplo 1

- 20 Separación mediante cromatografía en columna utilizando chiralpak (marca registrada) IC

4 mg de la mezcla que contiene tacrolimus, ascomicina, el compuesto I y el compuesto II, que se obtuvo en el método que se muestra en el Ejemplo de referencia 1, se sometieron a cromatografía en columna utilizando 4 ml de Chiralpak (marca registrada) IC, que es un gel de sílice obtenido uniendo químicamente tris(3,5-diclorofenil carbamato) de celulosa, que es un agente identificador de asimetría, y se eluyeron mediante el uso de una solución mixta de n-hexano: 2-propanol: metil t-butil éter (70:15:15) como eluyente.

El resultado se muestra en la Fig. 1. Se midió la pureza de la fracción activa separada mediante análisis por HPLC. En la composición de la fracción eluida, tacrolimus representó un 99,88%, ascomicina representó un 0,08%, el compuesto I representó un 0,04%, y el compuesto II no se detectó.

Ejemplo 2

- 35 Separación mediante cromatografía en columna utilizando Chiralpak (marca registradas) IE

De la misma forma que en el Ejemplo 1, 4 mg de una mezcla que comprendía tacrolimus, ascomicina, el compuesto I y el compuesto II se sometieron a cromatografía en columna utilizando 4 ml de Chiralpak (marca registrada) IE, que es un gel de sílice obtenido uniendo químicamente tris (3,5-diclorofenil carbamato) de amilosa, que es un agente identificador de asimetría, y se eluyeron mediante el uso de una solución mixta de n-hexano: 2-propanol: metil t-butil éter (45:15:40) como eluyente.

Se midió la pureza de la fracción activa separada mediante análisis por HPLC. En la composición de la fracción eluida, tacrolimus representó el 100,00% y la totalidad de ascomicina, el compuesto I y el compuesto II no se detectaron.

Ejemplo comparativo 1

- 50 Separación mediante cromatografía en columna usando DIAION (marca registrada) HP20SS y un eluyente que contenía nitrato de plata

De la misma manera que en el Ejemplo 1, 200 mg de una mezcla que comprendía tacrolimus, ascomicina, el compuesto I y el compuesto II se sometieron a cromatografía en columna utilizando 20 ml de DIAION (marca registrada) HP20SS, y se eluyeron mediante el uso de una solución acuosa de acetona al 50% que contenía 0,294 mol/l de plata y posteriormente, una solución acuosa de acetona al 60% como eluyentes. El resultado se muestra en la Fig. 2. Se midió la pureza de la fracción activa separada mediante análisis por HPLC. En la composición de la fracción eluida, tacrolimus representó un 99,73%, ascomicina y el compuesto I no se detectaron y el compuesto II representó el 0,27%.

Ejemplo comparativo 2

- 60 Separación mediante cromatografía en columna utilizando la resina de intercambio iónico RCP 160M de DIAION (marca registrada) que contiene sal de plata

Se absorbieron iones plata en 15,6 ml de la resina de intercambio iónico RCP 160M de DIAION (marca registrada) mediante una solución de nitrato de plata y, de la misma manera que en el Ejemplo 1, 200 mg de una mezcla que comprendía tacrolimus, ascomicina, el compuesto I y el compuesto II, se añadieron a continuación al anterior y se

eluyeron mediante el uso de una solución mixta de acetato de etilo: metanol (1:) como eluyente. El resultado se muestra en la Fig. 3. Se midió la pureza de la fracción activa separada mediante análisis por HPLC. En la composición de la fracción eluída, tacrolimus representó un 99,35%, ascomicina representó un 0,2%, el compuesto I era el 0,06%, y el compuesto II era el 0,4%.

5

Ejemplo 3

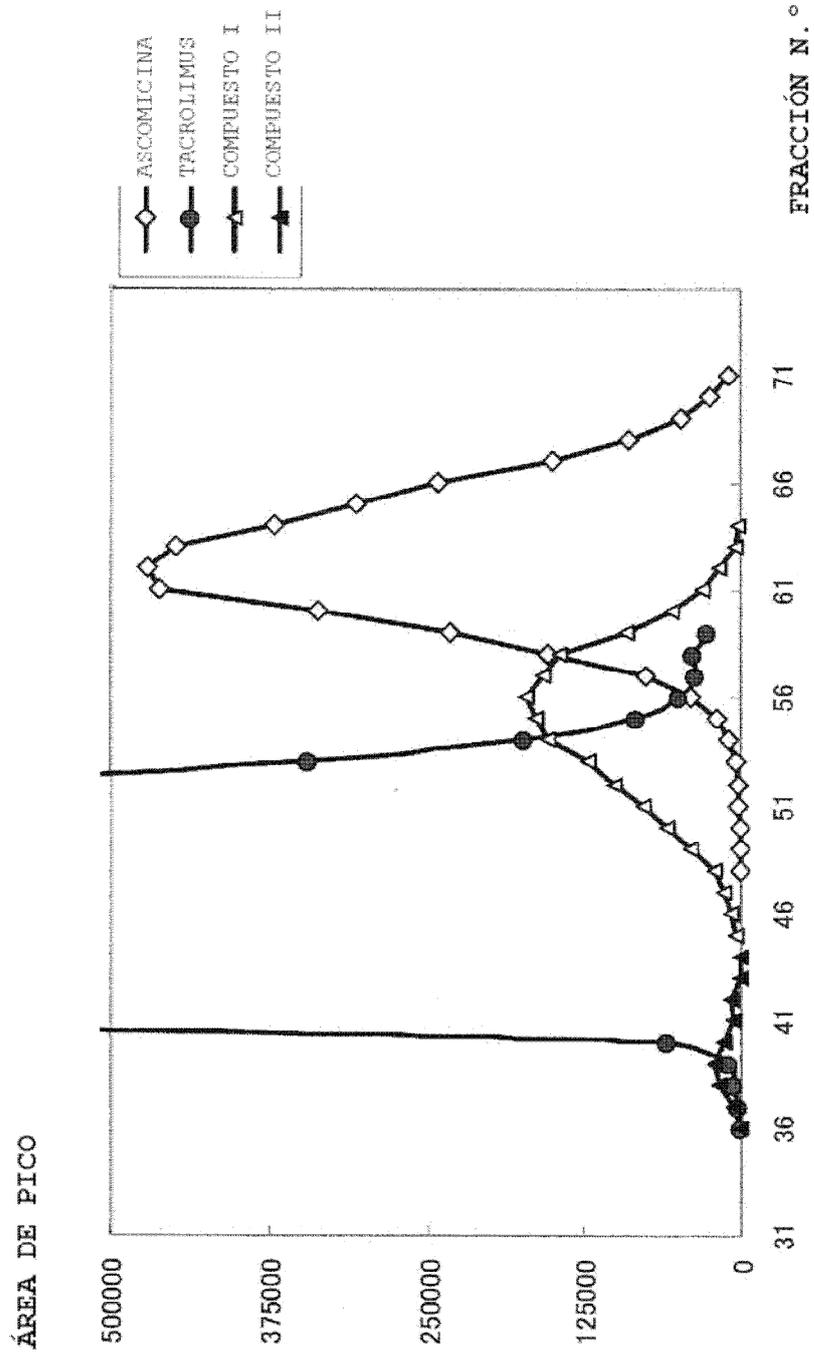
Separación mediante cromatografía en columna utilizando YMC Chiral NEA (marca registrada) (R)

- 10 De la misma forma que en el Ejemplo 1, 1 mg de una mezcla de tacrolimus, ascomicina, el compuesto I y el compuesto II se sometieron a cromatografía en columna utilizando 2,5 ml de Chiral NEA (marca registrada) (R) que es un gel de sílice sobre el cual se inmoviliza un polímero de metacrilato obtenido uniendo (R)-1-(α -naftil)etilamina, que es un agente identificador de asimetría, y se eluyó mediante el uso de acetonitrilo al 35% como eluyente. Se midió la pureza de la fracción activa separada mediante análisis por HPLC. En la composición de la fracción eluída,
- 15 tacrolimus representó un 99,94%, ascomicina representó un 0,02%, no se detectó el compuesto I y el compuesto II representó el 0,04%.

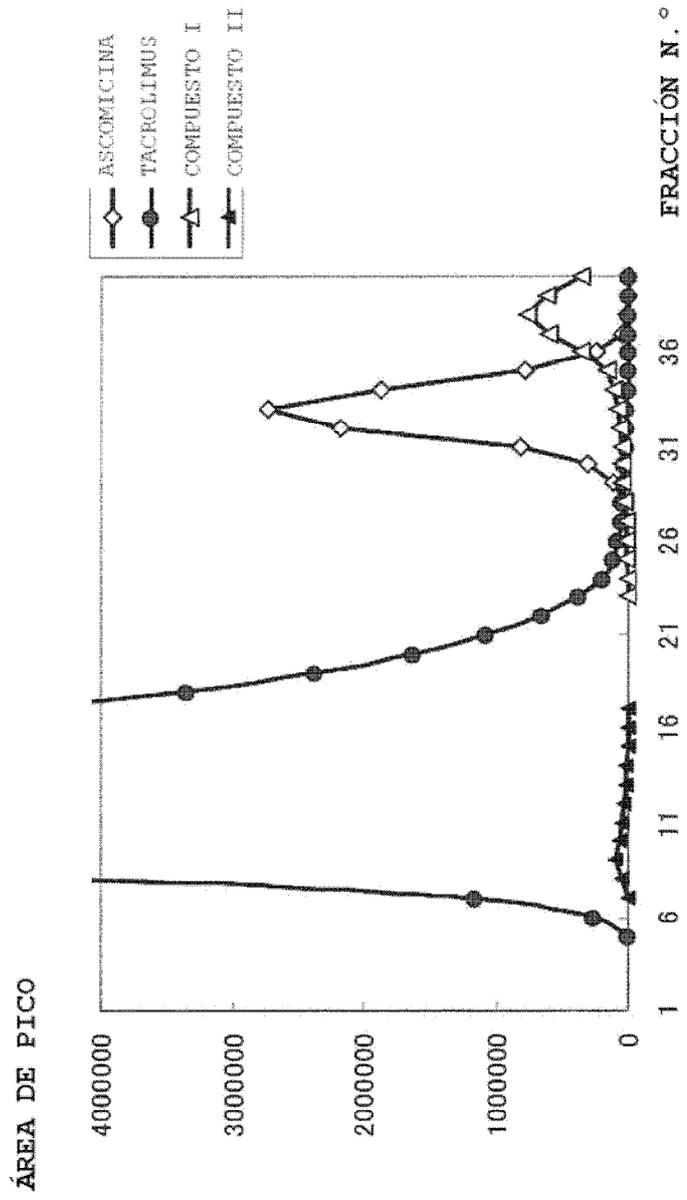
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para separar un compuesto macrólido cíclico a partir de una mezcla que comprende un compuesto macrólido cíclico y al menos uno de sus compuestos análogos, donde la mezcla se somete a cromatografía en columna de gel de sílice usando un agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice, donde el compuesto macrólido cíclico es tacrolimus y el agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice es un polisacárido modificado con carbamato inmovilizado en gel de sílice o un polímero sintético modificado con una amina ópticamente activa inmovilizado en gel de sílice.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto análogo es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ascomicina, FR-901156 y FR-900525.
- 15 3. Un método para producir un compuesto macrólido cíclico que comprende un compuesto análogo del mismo en la cantidad total de menos del 0,27%, donde la mezcla que comprende un compuesto macrólido cíclico y al menos uno de sus compuestos análogos se somete a cromatografía en columna de gel de sílice utilizando un agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice, donde el compuesto macrólido cíclico es tacrolimus y el agente identificador de asimetría inmovilizado en gel de sílice es un polisacárido modificado con carbamato inmovilizado en gel de sílice o un polímero sintético modificado con una amina ópticamente activa inmovilizado en gel de sílice.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el compuesto macrólido cíclico es tacrolimus y el compuesto análogo del mismo es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ascomicina, FR-901156 y FR-900525.

[FIG. 1]



[FIG. 2]



[FIG. 3]

