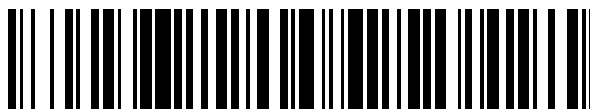


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 874**

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 16150360 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019** **EP 3026042**

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

30 Prioridad:

12.03.2008 US 3602108 P

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

12.05.2020

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:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 759 874 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-Dihidroxivitamina D₂ estabilizada y método de preparación de la misma

5 Antecedentes

Campo de la divulgación

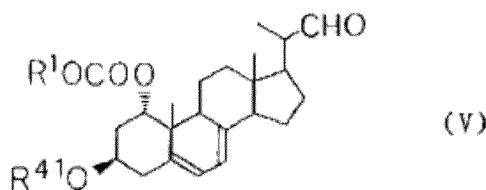
La divulgación se refiere, en general, a hormonas de vitamina D activas en forma purificada. Más particularmente, la divulgación se refiere a 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada, que es particularmente muy adecuada para formulaciones farmacéuticas.

Breve descripción de la tecnología relacionada

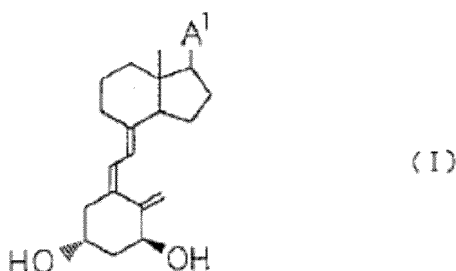
Los compuestos de vitamina D que tienen un grupo hidroxilo en la posición 1- α , a menudo considerados compuestos de vitamina D activados, han recibido una considerable atención en los últimos años debido a sus potentes actividades. Sin embargo, los compuestos de vitamina D activados se conocen también 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-hidroxivitamina D₂ y cis-1 α -hidroxivitamina D₂ por recristalización en formiato de metilo, y los resultados del ensayo de estabilidad de las mismas.

El documento JPH 06 316 558 desvela un método para producir un derivado de 1- α -hidroxivitamina D₂ de fórmula V



a partir de un compuesto de fórmula I



El documento EP 0 337 305 desvela un proceso para la preparación de 1- α ,25-dihidroxivitamina D₂ y el 24-epímero de la misma, que comprende la irradiación de (22E)-5,7,22-ergostatrieno-1- α ,3 β ,25-triol o el 24-epímero del mismo, seguida de isomerización.

J. Org. Chem (1993), vol. 58, no. 1, págs. 124-131 presenta estudios acerca de la apertura de moldes de dioxanona y acetal y la aplicación a la síntesis de 1- α ,25-dihidroxivitamina D₂.

Bull. Chem Soc. Jpn. (1989) vol. 62, n.º 10, págs. 3122-3137 desvela una nueva síntesis de 1 α ,25-dihidroxivitamina D₂ y su 24R-epímero.

Los cuatro documentos anteriores desvelan la cristalización de 1,25-dihidroxi-vitamina D₂ a partir de disolventes orgánicos que contienen éter.

Sumario

La invención reivindicada proporciona una composición de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada, caracterizada por que está exenta de disolventes de éster de formiato, incluyendo que está exenta de formiato de metilo y que tiene

una cantidad de disolvente residual total del 0,5 % o menos. La invención reivindicada también proporciona una composición que comprende 1,25-dihidroxitamina D₂ en un sistema de disolventes exento de disolventes de éster de formiato, en la que el sistema de disolventes comprende una mezcla de disolvente orgánico y agua, seleccionándose el disolvente orgánico entre el grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, butanol, dietil cetona, etanol, éter, etilenglicol, heptano, metanol, metil etil cetona, propanol, tetrahidrofurano, y combinaciones de los mismos.

Se describe, pero no se reivindica, un método eficiente para cristalizar 1,25-dihidroxitamina D₂ para producir una 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada con un rendimiento relativamente alto, incluyendo el método la cristalización en una mezcla de 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 entre los diversos ejemplos proporcionados 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 que está exenta de formiato de metilo y tiene 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 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 puede tener 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. La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada está exenta de disolventes de éster de formiato, incluyendo que está exenta de formiato de metilo y tiene una cantidad de disolvente residual total del 0,5 % o menos. 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.

En la invención reivindicada, la 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada tiene una cantidad de disolvente residual total del 0,5 % o menos. En consecuencia, la 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada 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 ácidos 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 dichos componentes residuales preferentemente es menor de 1.000 ppm, 500 ppm, o 100 ppm. La 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada también está exenta de, o sustancialmente exenta de, uno o más de los siguientes: disolventes halogenados, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y ácidos. Por ejemplo, el nivel de dichos disolventes halogenados residuales preferentemente es menor de 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, tiene una pureza de al menos el 97 % (o al menos el 98 % o al menos el 98,5 %), así como un contenido de disolventes residuales del 0,5 % o menos, y adicionalmente opcionalmente puede tener un contenido de impurezas totales del 1,5 % o menos, 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 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 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

Periodo de tiempo	Porcentaje de la cantidad inicial de 1,25-dihidroxitamina D ₂ que queda después de un periodo de tiempo prolongado		
	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 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. Dichas 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 normalmente 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 un disolvente orgánico adecuado o una mezcla adecuada de disolvente orgánico y agua, coherente con la divulgación del 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 adecuados, además de acetona/agua, incluyen acetonitrilo, butanol, dietil cetona, etanol, éter, etilenglicol, heptano, metanol, metil etil cetona, propanol, tetrahidrofurano, agua 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 preferido de acuerdo con la divulgación en el presente documento, para retirar los componentes residuales no deseados.

La 1,25-dihidroxitamina D₂ parcialmente pura preferentemente se cristaliza en un disolvente que está exento de formiato de metilo, preferentemente además exento de al menos uno de los siguientes disolventes seleccionados entre el 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 relación 1:1. Aunque pueden usarse otros disolventes, 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-dihidroxitamina D₂. Se encontró que cada etapa de cristalización en acetona/agua proporcionaba un rendimiento mayor del 90 % en comparación con la cristalización en formiato de metilo, que se encontró que proporcionaba rendimientos en el intervalo del 50 % al 60 %.

Si se realiza un método de cristalización multietapa para purificar la 1,25-dihidroxitamina D₂, entonces preferentemente los disolventes identificados en el presente documento (por ejemplo, exentos de formiato de metilo, además, preferentemente exentos de al menos uno de los siguientes disolventes seleccionados entre el 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 de 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

(continuación)

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

5 Ejemplo 1 - Preparación de 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada

Se prepara 1,25-dihidroxitamina 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 tetrahidrofurano 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 del 99,4 % (HPLC); ninguna impureza conocida era mayor del 0,5 % (1β,25-dihidroxitamina D₂, 5,6-trans-1,25-dihidroxitamina D₂, 22-cis-1,25-dihidroxitamina 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 mano de mortero 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.

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

Las muestras de 1,25-dihidroxitamina D₂ estabilizada de acuerdo con el Ejemplo 1 y la 1,25-dihidroxitamina D₂ obtenida en el mercado (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

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

Se prepararon muestras adicionales de 1,25-dihidroxitamina D₂ (SAFC Madison, Wisconsin, EE.UU.), que estaban sustancialmente exentas de 1,25-dihidroxi-previtamina 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 sometieron a ensayo periódicamente para determinar su pureza por HPLC. Se prepararon también otras muestras de 1,25-dihidroxitamina D₂ preparadas de acuerdo con la divulgación del presente documento, y sin formiato de metilo, y se sometieron a ensayo 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-dihidroxivitamina D ₂	99,48 %	97,99 % (3-1/2M)				
B	16 ppm de formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxivitamina D ₂	99,8 %				93,76 % (11M)	
C	78 ppm de formiato de metilo, 0,04 % de 1,25-dihidroxivitamina D ₂	97,54 %		94,3 % (7M)			
D	4.061 ppm de formiato de metilo, 0,21 % de 1,25-dihidroxivitamina D ₂	95,55 %	94,36 %		80,98 %		
E	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxivitamina	97,7 %		97,7 %			
F	sin formiato de metilo, 2 % de 1,25-dihidroxivitamina D ₂	99,5 %	99,5 %			98,7 %	
G	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxivitamina	99,36 %			99,42 %		99,40 %
H	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxivitamina	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-dihidroxivitamina D ₂	100 %	98,50 % (3-1/2M)				
B	16 ppm de formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxivitamina D ₂	100 %				93,95 % (11M)	
C	78 ppm de formiato de metilo, 0,04 % de 1,25-dihidroxivitamina D ₂	100 %		96,68 % (7M)			
D	4.061 ppm de formiato de metilo, 0,21 % de 1,25-dihidroxivitamina D ₂	100 %	98,75 %		84,75 %		
E	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxivitamina	100 %		100 %			
F	sin formiato de metilo, 2 % de 1,25-dihidroxivitamina D ₂	100 %	100 %			99,2 %	
G	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxivitamina	100 %			100 %		100 %
H	sin formiato de metilo, sin 1,25-dihidroxivitamina	100 %		100 %		100 %	

- 5 Aparte de las excepciones observadas a los 3,5 meses, 7 meses y 11 meses, las muestras se sometieron a ensayo 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-dihidroxivitamina 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-dihidroxivitamina 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.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición de 1,25-dihidroxivitamina D₂, **caracterizada por que** está exenta de disolventes de éster de formiato, incluyendo que está exenta de formiato de metilo, y por que tiene una cantidad de disolvente residual total del 0,5 % o menos.
2. La composición de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la reivindicación 1, pudiendo obtenerse dicha composición mediante un método que comprende cristalizar 1,25-dihidroxivitamina D₂ en un sistema de disolventes exento de disolventes de éster de formiato, en la que el sistema de disolventes comprende una mezcla de disolvente orgánico y agua, seleccionándose el disolvente orgánico entre el grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, butanol, dietil cetona, etanol, éter, etilenglicol, heptano, metanol, metil etil cetona, propanol, tetrahidrofurano y combinaciones de los mismos.
3. La composición de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la reivindicación 2, en la que en dicho método el sistema de disolventes es una mezcla de acetona/agua.
4. La composición de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada de acuerdo con la reivindicación 3, en la que en dicho método la 1,25-dihidroxivitamina D₂ cristalizada se lava con una solución de acetona/agua y la 1,25-dihidroxivitamina D₂ cristalizada se seca para retirar los disolventes residuales.
5. Una composición farmacéutica que comprende un componente activo que es la composición de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. La composición de la reivindicación 5, que se selecciona entre el grupo que consiste en un comprimido, una cápsula de gelatina blanda, una solución no acuosa y una suspensión no acuosa.
7. La composición de la reivindicación 5, que comprende una solución de una cantidad eficaz de la 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada en un aceite, estando la solución contenida en una cápsula de gelatina blanda.
8. La composición de la reivindicación 5, en forma de dosificación unitaria, que tiene un contenido de componente activo de 0,1 µg a 25 µg.
9. La composición de la reivindicación 8, que comprende una solución de una cantidad eficaz de la 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada en un aceite que comprende aceite de coco fraccionado, estando la solución contenida en una cápsula de gelatina blanda y que comprende adicionalmente un antioxidante seleccionado entre el grupo que consiste en hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) o vitamina E.
10. La composición de la reivindicación 5, que comprende una preparación farmacéutica sólida de una cantidad eficaz de la composición de 1,25-dihidroxivitamina D₂ estabilizada, en la que la preparación farmacéutica sólida está en forma de un comprimido, una cápsula, un gránulo o un polvo.
11. Una composición que comprende 1,25-dihidroxivitamina D₂ en un sistema de disolventes exento de disolventes de éster de formiato, en la que el sistema de disolventes comprende una mezcla de disolvente orgánico y agua, seleccionándose el disolvente orgánico entre el grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, butanol, dietil cetona, etanol, éter, etilenglicol, heptano, metanol, metil etil cetona, propanol, tetrahidrofurano y combinaciones de los mismos.

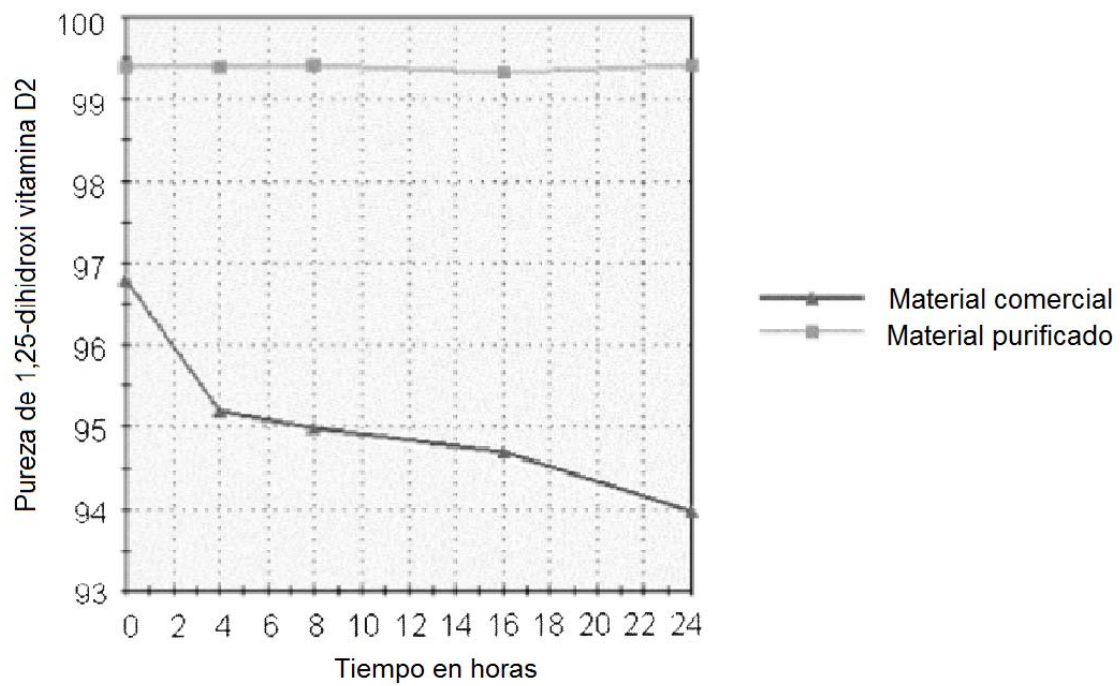


Figura 1

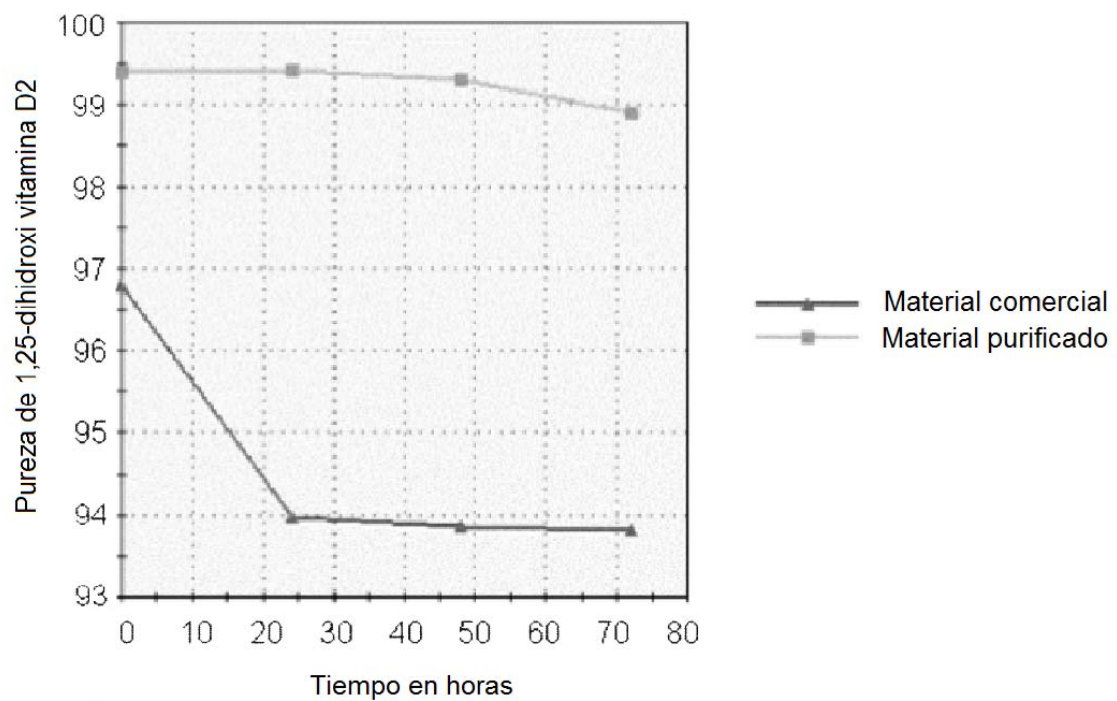


Figura 2