

(11) Número de Publicação: **PT 1558622 E**

(51) Classificação Internacional:
C07G 3/00 (2007.10) **C07G 5/00** (2007.10)
C07D 498/18 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.07.26	(73) Titular(es): TEVA GYÓGYSZERGYÁR ZÁRTKÖRŰEN MŰKÖDŐ RÉSZVÉNYTÁRSASÁG PALLAGI ÚT 13 4042 DEBRECEN	HU
(30) Prioridade(s): 2003.07.24 US 490070 P 2004.01.26 US 539363 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.08.03	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2007.11.14 135/2007	VILMOS KERI	HU
	ZOLTAN CZOVEK	HU
	FERENC RANTAL	HU
	ANDREA CSORVASI	HU
	(74) Mandatário:	
	PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA	
	RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE MACROLÍDOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE MACROLIDOS"

É proporcionado um método para a purificação de um macrolido, especialmente tacrolimus, que inclui alimentar o macrolido a um leito de resina de sorção e eluí-lo com um eluente adequado tal como uma combinação de água e tetra-hidrofurano.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE MACROLIDOS"

A presente invenção refere-se a um método para a purificação de macrolidos, especialmente tacrolimus, ascomicina, sirolimus, everolimus, ou pimecrolimus, por um método de separação que utiliza resinas de sorção.

PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica os benefícios do pedido provisório U.S. com o N° de Série 60/490070, apresentado em 24 de Julho de 2003 e do pedido provisório U.S. com o N° de Série 60/539363, apresentado em 26 de Janeiro de 2004, sendo o conteúdo de todos eles aqui dado como incorporado por citação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os macrolidos são anéis de lactonas com múltiplos membros que têm um ou mais desoxi açúcares como substituintes. A eritromicina, a azitromicina e a claritromicina são macrolidos que têm actividade bacteriostática e/ou bactericida.

O tacrolimus (FK 506) é também um antibiótico macrolido que também é um agente imunossupressor. Mais potente do que a ciclosporina, o tacrolimus tem, alegadamente, um efeito inibidor selectivo sobre linfócitos T.

O pimecrolimus é uma macrolactama e é um derivado de ascomicina que alegadamente inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por células T e mastócitos. *The Merck Index* 1331

(Maryadele J. O'Neil *et al.*, eds., 13^a ed. 2001). O pimecrolimus é alegadamente utilizado como imunossupressor. *Id.*

Está descrito que o sirolimus, outro macrolido, é um imunossupressor. O sirolimus foi administrado com ciclosporina e corticosteróides após transplante para evitar a rejeição de enxertos. *Martindale: The Complete Drug Reference* 568 (Sean C. Sweetman ed., Pharmaceutical Press 33^a ed. 2002).

Está descrito que o everolimus, um derivado do sirolimus, é um imunossupressor utilizado no transplante de órgãos. *Martindale* em 539.

Os macrolidos são tipicamente obtidos por fermentação, embora sejam conhecidas vias sintéticas para alguns deles. Os macrolidos, tal como obtidos, tipicamente contêm várias impurezas que podem ser detectadas por vários meios, por exemplo cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A presença de impurezas num composto farmacêutico é indesejável, e as autoridades de saúde em muitas jurisdições (e. g. a Food and Drug Administration nos Estados Unidos) estabeleceram directrizes relacionadas com os níveis aceitáveis de impurezas em produtos farmacêuticos. A necessidade e a utilidade comercial de métodos para a redução do nível de impurezas em qualquer fármaco falam por si.

Song, Z. *et al.* (*J. Org. Chem.*, 1999, 64, 1859-1867) descrevem um processo utilizando resina HP-20S e eluente de acetonitrilo-água para a separação do macrolido sintético, L733,735 de ascomicina, sendo este último um material de partida para a síntese de L733,735.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num aspecto, a presente invenção refere-se a um processo para a separação de impurezas (*i. e.* redução do nível de impurezas) de um macrolido, especialmente tacrolimus, ascomicina, sirolimus (rapamicina), everolimus e pimecrolimus. O método compreende os passos de:

a) alimentação de uma carga do macrolido com um nível de impurezas inicial,

b) colocação da carga alimentada sobre um leito de resina de sorção,

c) eluição do leito de resina de sorção alimentada com um eluente compreendendo água e tetra-hidrofurano, e adicionalmente, quando o macrolido é tacrolimus, o eluente pode compreender água, acetonitrilo e ácido fosfórico, para se obter um efluente, e

d) recolha de, pelo menos, uma fracção de efluente compreendendo o macrolido.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Tal como aqui utilizado, o termo temperatura ambiente refere-se a uma temperatura de 0 °C a 40 °C, de um modo preferido 10 °C a 35 °C.

Tal como aqui utilizado, o termo pressão reduzida refere-se a uma pressão inferior a 760 mm Hg.

Tal como aqui utilizado, o termo anti-solvente refere-se a uma substância, normalmente líquida à temperatura ambiente, em que o macrolido é quando muito fracamente solúvel.

Tal como aqui utilizado, o termo "impureza" refere-se a qualquer composto com um tempo de retenção diferente do do macrolido desejado. O tempo de retenção diferente pode ser determinado, por exemplo, pelo método de HPLC aqui descrito adiante.

Tal como aqui utilizados, os termos RRT0.95 e RRT1.25 referem-se a ascomicina e di-hidrotacrolimus, respectivamente, que são impurezas em tacrolimus, com tempos de retenção relativos (ao tacrolimus) de cerca de 0,95 e 1,25 na análise por HPLC, tal como a aqui descrita adiante.

Tal como aqui utilizado em relação a misturas ou combinações de líquidos, o termo percentagem em volume (% vol) refere-se à fracção do volume calculada como se segue (ilustrada para a espécie A):

$$\%_A \text{ vol} = Wt_A \times \rho_A / (Wt_A \times \rho_A + Wt_B \times \rho_B)$$

em que:

Wt_A e Wt_B são as massas em gramas das espécies A e B, respectivamente, e

ρ_A e ρ_B são as densidades, em g/mL, da espécie A e B, respectivamente.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona um método cromatográfico para separação de macrolidos seleccionados de tacrolimus, como ascomicina, sirolimus, everolimus e pimecrolimus, de impurezas neles presentes (*i. e.* para redução do nível de impurezas no macrolido). A separação (redução) é efectuada por alimentação do macrolido a um leito de resina de sorção e eluição com um solvente que contém THF e água. Quando o macrolido é tacrolimus, o eluente pode compreender água, acetonitrilo e ácido fosfórico. Quando

tacrolimus é o macrolido, as impurezas reduzidas incluem pelo menos ascomicina e di-hidrotacrolimus, cuja quantificação por HPLC está aqui descrita adiante. Quando ascomicina é o macrolido, as impurezas reduzidas incluem pelo menos tacrolimus. O macrolido utilizado pode ser proveniente de qualquer fonte.

Na prática da presente invenção, a redução (separação) é efectuada por eluição de uma resina de sorção, alimentada com uma carga de macrolido, com um eluente para se obter um efluente. As resinas de sorção úteis na prática da presente invenção são bem conhecidas na técnica e são, de um modo preferido reticuladas, materiais não iónicos de estireno-divinil benzeno, mas podem ser modificadas quimicamente. Também são conhecidas resinas de sorção de tipo acrílico. As resinas de sorção têm estruturas altamente porosas cujas superfícies podem absorver - e depois desorver - várias espécies químicas. A absorção e desorção são influenciadas pelo ambiente, por exemplo o solvente utilizado. Na presença de solventes polares (e. g. água) as resinas de sorção apresentam comportamento hidrófobo. Quando se utiliza solventes não polares (e. g. hidrocarbonetos), as resinas de sorção podem apresentar comportamento polar. Tipicamente, as resinas de sorção têm uma estrutura macrorreticulada e têm áreas superficiais de, pelo menos, 300 m²/g.

As resinas de sorção úteis na prática da presente invenção incluem as resinas Amberlite[®] XAD disponíveis de Rohm and Haas; XAD 4, XAD 7 HP, XAD 16 HP, XAD 761 e XAD 1180, para mencionar apenas algumas. Também são úteis as resinas de sorção Diaion disponíveis de Mitsubishi; BP 10, HP 20, HP 21, HP 30, HP 40, HP 50, SP 800, SP 825, SP 850, SP 875, SP 205, SP 206, SP 207, HP1MG e HP2MG, para mencionar apenas algumas. A Amberlite[®] XAD 1180 é um exemplo de uma resina de sorção preferida para utilização na prática da presente invenção. A Amberlite XAD 1180 é um polímero aromático reticulado macrorreticulado. É um polímero não iónico, hidrófobo, reticulado que deriva as suas

propriedades adsorventes da sua estrutura macrorreticulada patenteada (contendo uma fase contínua de polímero e uma fase contínua de poros), área superficial elevada e a natureza aromática da sua superfície. A área superficial é 500 m²/g ou superior. A porosidade é 0,60 mL/mL ou superior. A folha de especificações do produto PDS 0205 A-Jan.98-1/2 dá mais informação sobre esta resina.

Num primeiro passo do método da presente invenção, a carga do macrolido é alimentada a um leito de resina de sorção. A carga de alimentação pode ser proporcionada como uma solução do macrolido num solvente orgânico, combinado com um anti-solvente.

Alternativamente, a carga de alimentação do macrolido é adsorvida (depositada) numa carga de alimentação de resina de sorção antes de ser alimentada ao leito de resina de sorção. Uma solução do macrolido num solvente orgânico, opcionalmente contendo água, é combinada com uma porção de resina de sorção e um anti-solvente. A resina de sorção pode ser a mesma que a utilizada para preparar o leito, ou pode ser uma resina de sorção diferente. A porção de alimentação de resina de sorção pode ser 33% a 50% do volume do leito. A porção de alimentação é então colocada sobre um leito de sorção por via húmida para proporcionar um leito carregado com a carga de alimentação.

O solvente orgânico utilizado para preparar a solução a partir da qual a carga de alimentação é alimentada ou depositada é, de um modo preferido seleccionado do grupo que consiste em tetra-hidrofurano (THF), acetona, acetonitrilo (ACN), metanol, etanol, n-butanol, n-propanol, iso-propanol, ésteres (e. g. acetato de etilo), e solventes apróticos dipolares como dimetilformamida (DMF). De um modo mais preferido, o solvente orgânico é THF, acetona ou ACN. Quando o macrolido é tacrolimus, THF e ACN são solventes preferidos. De um modo preferido, o anti-solvente é água ou um alcano linear ou ramificado ou cicloalcano como hexano, heptano ou ciclo-hexano. A adição de um

anti-solvente reduz a solubilidade do macrolido na solução e, crê-se, facilita a adsorção da amostra à porção de alimentação de resina de sorção. O anti-solvente é adicionado lentamente para evitar grandes gradientes de concentração que podem resultar em precipitação em bruto parcial do macrolido, que pode levar a depósitos e entupimento. De um modo preferido, a proporção de solvente:anti-solvente é 40% ou menos.

A combinação da solução do macrolido, porção de alimentação de resina de sorção e anti-solvente pode ser realizada em qualquer recipiente conveniente equipado com um agitador (e. g. um reactor em tanque com agitação).

Numa forma de realização particular, a porção de alimentação de resina de sorção está contida numa coluna e faz-se contactar com um caudal de solução de macrolido através da coluna num sistema de recirculação. O anti-solvente é gradualmente introduzido no caudal da solução que flui através e em torno da porção de alimentação de resina de sorção, com o que a amostra do macrolido é gradualmente adsorvida na porção de alimentação de resina de sorção.

A título de exemplo, quando o macrolido é tacrolimus, a solução pode ter cerca de 100 g/L e o volume de anti-solvente pode ser, pelo menos, cinco vezes o volume de solução. O volume em massa da porção de alimentação de resina de sorção pode ser aproximadamente igual ao volume de solução. O técnico experiente saberá otimizar as proporções por experimentação em rotina para obter adsorção do macrolido na porção de alimentação da resina de sorção.

Depois de a adsorção estar substancialmente completa, o que pode ser monitorizado por monitorização da concentração de macrolido remanescente na solução, a carga de alimentação é separada da solução remanescente. A separação pode ser por filtração. Quando se utiliza o método da coluna com recirculação

para preparar a carga de alimentação, a coluna é simplesmente desacoplada do sistema com recirculação.

Num passo subsequente desta forma de realização, a porção de alimentação agora carregada com macrolido é sobreposta num leito preparado de resina de sorção húmida. O leito está confinado num recipiente adequado. De um modo preferido, o leito está confinado dentro de uma coluna, de um modo preferido com secção transversal circular. Para preparar o leito, a quantidade de resina de sorção desejada é suspensa em água ou numa mistura de água e um solvente (e. g. THF ou ACN). A combinação de água e solvente é vantajosa quando o leito vai ter um diâmetro grande. A suspensão é, então, transferida para o recipiente desejado, de um modo preferido uma coluna cilíndrica como a que é utilizada para cromatografia em coluna. A água (ou combinação de água e solvente) é esgotada para deixar um leito de resina de sorção húmida. A prática de preparação e empacotamento de colunas de cromatografia é bem conhecida tanto pelo técnico experiente como por quem tem prática corrente, e as práticas conhecidas são facilmente adaptadas à prática da presente invenção.

A porção de alimentação pode ser sobreposta no leito de resina de sorção húmida, simplesmente como uma camada colocada sobre ela. Quando a carga de alimentação é preparada num sistema com recirculação, o recipiente contendo a carga de alimentação pode ser acoplado ao recipiente que contém o leito de resina de sorção húmida por quaisquer meios que estabeleçam comunicação fluida entre eles.

A separação do macrolido (*i. e.* tacrolimus, ascomicina, sirolimus, everolimus ou pimecrolimus) e impurezas, através da qual é reduzido o nível de impurezas no macrolido, é realizada por passagem de um eluente através da carga de alimentação e, subsequentemente, através do leito de resina de sorção nela sobreposto e em comunicação fluida com ela.

O eluente inclui água e THF. Adicionalmente, quando o macrolido é tacrolimus, o eluente pode compreender água, acetonitrilo e ácido fosfórico. Um eluente preferido, especialmente quando tacrolimus é o macrolido, é essencialmente uma mistura de THF e água, com 20% em volume a 50% em volume, de um modo mais preferido 31% em volume a 40% em volume, de THF. Quando se utiliza um solvente orgânico, tais como metanol, acetonitrilo, acetona ou n-butanol, com o eluente THF-água, o teor de THF é inferior a 38% em volume, de um modo preferido entre 4 e 38% em volume. Outro eluente preferido para tacrolimus é uma mistura de acetonitrilo e água com 30% em volume a 70% em volume, de um modo mais preferido, 40% em volume a 65% em volume de acetonitrilo, e ácido fosfórico, de um modo preferido 0,0005 a 0,003 partes de ácido fosfórico para 1 parte de eluente.

O eluente é eluído através da porção de alimentação e leito de resina de sorção nela sobreposto, com um caudal que depende da área da secção transversal bruta do leito (medida perpendicularmente ao fluxo do eluente). De um modo preferido, o caudal (em relação à área da secção transversal) é inferior a 25 cm/h, de um modo preferido inferior a 15 cm/h. As velocidades de eluição menores aumentam o tempo, mas melhoram a eficiência da separação. Uma velocidade de eluição para eficiência de separação aumentada é cerca de 90 mL/hora.

O eluente que sai da resina de sorção (*i. e.* o efluente) é recolhido em uma ou mais fracções, como é habitual para o técnico experiente que utiliza métodos de separação, como a cromatografia, que dependem da retenção preferencial de espécies químicas numa fase estacionária (*e. g.* um leito estático). Pode adicionar-se um ácido inorgânico, tal como o ácido fosfórico, ao efluente.

De um modo preferido, após a eluição do leito com uma quantidade de eluente, o leito é posto em comunicação fluida com um segundo leito, de modo que o efluente do primeiro leito elua

através do segundo leito. Após a eluição do primeiro e segundo leitos, o segundo leito pode ser e, de um modo preferido é desacoplado do primeiro leito (*i. e.* é quebrada a comunicação fluida) e a eluição é prosseguida só através do segundo leito. O eluente é uma mistura de THF e água com 33% em volume a 35% em volume de THF e o eluente preferido.

Opcionalmente, pode ligar-se colunas adicionais ao sistema.

A concentração e composição das fracções podem ser monitorizadas por quaisquer meios convenientes. A detecção e quantificação de impurezas num macrolido, em particular ascomicina e di-hidrotacrolimus em tacrolimus, podem ser realizadas pelo método por HPLC aqui descrito adiante.

Dependendo, *inter alia*, da carga da coluna e da composição e caudal do eluente, é recolhida uma fracção principal (corte principal) de efluente incluindo mais de 60%, de um modo preferido entre 60% em peso e 90% em peso do macrolido originalmente presente na solução. Quando o tacrolimus é o macrolido e THF-água (31 a 40% em volume de THF) é o eluente, a fracção principal é recolhida de tal modo que o produto final isolado tem 0,1% de área ou menos (por HPLC descrito adiante) da impureza RRT0.95.

Se desejado, o macrolido separado das impurezas e tendo, portanto, um nível reduzido de impurezas pode ser isolado do efluente por quaisquer meios convencionais (*e. g.* extracção, liofilização, evaporação, adição de anti-solvente). Pode mencionar-se água, alcanos e cicloalcanos como anti-solventes úteis. Os métodos de isolamento podem ser combinados. Por exemplo pode combinar-se anti-solvente com eluente concentrado.

Um método de isolamento preferido inclui a concentração da fracção principal a 70 °C ou menos, de um modo preferido a 60 °C ou menos, de um modo preferido a uma pressão de 760 mm Hg, a

cerca de 50% do seu volume inicial, com o que se obtém cristais de produto. De um modo preferido adiciona-se ácido, 1 a 10 mL por litro de eluente, antes da concentração para estabilizar o macrolido.

Opcionalmente, a fracção principal concentrada é mantida à temperatura ambiente durante um tempo de espera. Quando se utiliza um tempo de espera, um tempo de espera preferido é 1-4 dias. Os cristais de macrolido com teor de impurezas reduzido são recuperados por quaisquer meios convencionais, por exemplo, filtração (gravidade ou vácuo).

Pode conseguir-se uma redução adicional de impurezas submetendo o produto recuperado a vários tratamentos adicionais de acordo com o método da presente invenção.

A redução de impurezas num macrolido realizada pelo método da presente invenção pode ser monitorizada pelo método por HPLC aqui descrito adiante.

Noutra forma de realização, o macrolido é tacrolimus e, pelo menos, são reduzidos os níveis das impurezas ascomicina e di-hidrotacrolimus. Os níveis de outras impurezas também são reduzidos. O método inclui os passos de: preparação de uma carga de alimentação de tacrolimus compreendendo uma solução de tacrolimus com ou sem uma porção de alimentação da resina de sorção, especialmente uma resina macrorreticulada como Amberlite® YAD 1180 e Diaion HP 20; alimentação da carga de alimentação à resina de sorção húmida, especialmente Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20 que pode estar contida num recipiente, especialmente uma coluna; eluição da porção de alimentação e resina de sorção com um eluente que é uma mistura de tetra-hidrofurano (THF) e água, 20% em volume a 50% em volume, especialmente 31% em volume a 40% em volume de THF, ou uma mistura de acetonitrilo (ACN), água e ácido fosfórico, em que o acetonitrilo está presente numa quantidade de 30% em volume a

70% em volume e muito especialmente em 40% em volume a 65% em volume; recolha de pelo menos uma fracção principal (corte principal) de eluente que contém mais do que 60%, de um modo preferido entre 60% e 90% do tacrolimus inicial (dependendo da pureza inicial) e, opcionalmente, isolamento da fracção principal do tacrolimus com teor de impurezas reduzido por, por exemplo, concentração da ou das fracções principais, por exemplo a pressão reduzida na presença de um ácido, e opcionalmente recuperação do produto assim obtido.

Ainda noutra forma de realização, o macrolido é ascomicina e, pelo menos, são reduzidos os níveis da impureza tacrolimus. Também são reduzidos os níveis de outras impurezas. O método inclui os passos de: preparação de uma carga de alimentação de ascomicina compreendendo uma solução de ascomicina com ou sem uma porção de alimentação de uma resina de sorção, especialmente uma resina macrorreticulada como Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20; alimentação da carga de alimentação à resina de sorção húmida, especialmente Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20, que pode estar contida num recipiente, especialmente uma coluna; eluição da porção de alimentação e resina de sorção com um eluente que é uma mistura de tetra-hidrofurano (THF) e água, 20% em volume a 50% em volume, especialmente 31% em volume a 40% em volume de THF; recolha de, pelo menos, uma fracção principal (corte principal) de eluente que contém mais do que 60%, de um modo preferido entre 60% e 90% da ascomicina inicial (dependendo da pureza inicial) e, opcionalmente, isolamento de ascomicina com um teor de impurezas reduzido da fracção principal por, por exemplo, concentração da fracção ou fracções principais, por exemplo a pressão reduzida na presença de um ácido, e opcionalmente recuperação do produto assim obtido.

Ainda noutra forma de realização, o macrolido é sirolimus. O método para a separação de impurezas de sirolimus inclui os passos de: preparação de uma carga de alimentação de sirolimus compreendendo uma solução de sirolimus com ou sem uma porção de

alimentação de uma resina de sorção, especialmente uma macrorreticulada como Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20; alimentação da carga de alimentação a resina de sorção húmida, especialmente Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20 que pode estar contida num recipiente, especialmente uma coluna; eluição da porção de alimentação e resina de sorção com um eluente que é uma mistura de tetra-hidrofurano (THF) e água, 20% em volume a 50% em volume, especialmente 31% em volume a 40% em volume de THF; recolha de, pelo menos, uma fracção principal (corte principal) de eluente que contém mais do que 60%, de um modo preferido entre 60% e 90% do sirolimus inicial (dependendo da pureza inicial) e, opcionalmente, isolamento da fracção principal do sirolimus com um teor de impurezas reduzido por, por exemplo, concentração da fracção ou fracções principais, por exemplo a pressão reduzida na presença de um ácido, e opcionalmente recuperação do produto assim obtido.

Ainda noutra forma de realização, o macrolido é everolimus. O método para a separação de impurezas do everolimus inclui os passos de: preparação de uma carga de alimentação de everolimus compreendendo uma solução de everolimus com ou sem uma porção de alimentação de uma resina de sorção, especialmente uma macrorreticulada como Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20; alimentação da carga de alimentação a resina de sorção húmida, especialmente Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20 que pode estar contida num recipiente, especialmente uma coluna; eluição da porção de alimentação e resina de sorção com um eluente que é uma mistura de tetra-hidrofurano (THF) e água, 20% em volume a 50% em volume, especialmente 31% em volume a 40% em volume de THF; recolha de, pelo menos, uma fracção principal (corte principal) de eluente que contém mais do que 60%, de um modo preferido entre 60% e 90% do everolimus inicial (dependendo da pureza inicial) e, opcionalmente, isolamento da fracção principal do everolimus com teor reduzido de impurezas por, por exemplo, concentração da fracção ou fracções principais, por exemplo a pressão reduzida na presença de um ácido, e

opcionalmente recuperação do produto assim obtido.

Ainda noutra forma de realização, o macrolido é pimecrolimus. O método para a separação de impurezas do pimecrolimus inclui os passos de: preparação de uma carga de alimentação de pimecrolimus compreendendo uma solução de pimecrolimus com ou sem uma porção de alimentação de uma resina de sorção, especialmente uma macrorreticulada como Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20; alimentação da carga de alimentação a resina de sorção húmida, especialmente Amberlite® XAD 1180 e Diaion HP 20 que pode estar contida num recipiente, especialmente uma coluna; eluição da porção de alimentação e resina de sorção com um eluente que é uma mistura de tetra-hidrofurano (THF) e água, 20% em volume a 50% em volume, especialmente 31% em volume a 40% em volume de THF; recolha de, pelo menos, uma fracção principal (corte principal) de eluente que contém mais do que 60%, de um modo preferido entre 60% e 90% do pimecrolimus inicial (dependendo da pureza inicial) e, opcionalmente, isolamento da fracção principal do pimecrolimus com teor reduzido de impurezas por, por exemplo, concentração da fracção ou fracções principais, por exemplo a pressão reduzida na presença de um ácido, e opcionalmente recuperação do produto assim obtido.

Condições cromatográficas:

Coluna: ZORBAX SB-C18 75 x 4,6 mm; 3,5 µm

Pré-coluna: SymmetryShield RP18 3,9 x 20 mm; 5 µm

Eluente:

A: Medir 200 mL de acetonitrilo para um balão volumétrico de 2000 mL, depois diluir para o volume com água destilada até ao volume total de 2000 mL. Em seguida adicionar 100 µL de ácido acético a 50%.

B: Adicionar 100 µL de ácido acético a 50% a 2000 mL de acetonitrilo.

Tabela de gradientes

Tempo (min)	Eluente "A" (% p/p)	Eluente "B" (% p/p)	Caudal (mL/min)
0	60	40	2,3
15	55	45	2,3
25	30	70	1,8
25,1	60	40	1,8
27	60	40	1,8

Caudal: 2,3 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 210 nm

Volume injectado: 20 µL

Solvente da amostra: acetonitrilo

Temp. da unidade da coluna: 60 °C

Tempo de análise: 27 min

Tempo de retenção do tacrolimus: aproximadamente 14 min.

Os tempos de retenção das impurezas ascomicina (RRT0.95) e di-hidrotacrolimus (RRT1.25) são relativos ao tacrolimus e expressos como uma percentagem da área em relação à área de todos os picos no cromatograma.

O tempo de retenção do tacrolimus (RRT1.00) é relativo a ascomicina e expresso como uma percentagem da área em relação à área de todos os picos no cromatograma.

O método da presente invenção pode ser exemplificado pelos seguintes exemplos não limitativos.

Exemplo 1:

As áreas percentuais referem-se à percentagem da área de cromatogramas de HPLC obtidos pelo método aqui descrito acima.

O processo descrito adiante foi realizado a 28 °C até 32 °C.

Preparou-se um leito de resina de sorção (Amberlite® XAD 1180) numa coluna (45 cm de diâmetro) utilizando água:THF para alimentar a coluna (ca. de 100 L de resina de sorção húmida).

Adicionou-se água (86 L) lentamente, com agitação, a uma solução de tacrolimus (1227 g) em acetonitrilo (10 L) em que foi suspensa a resina de sorção (Amberlite® XAD 1180; 9 L) com agitação. O tacrolimus utilizado continha cerca de 2,6% da área de RRT0.95 e cerca de 2,9% da área de RRT1.25. Quando a adição da água estava completa, a carga de alimentação de resina de sorção foi recolhida por filtração.

A carga de alimentação recolhida foi alimentada (sobreposta) como uma camada sobre o leito da resina de sorção húmida.

A coluna foi primeiro eluída com cerca de 1800 L de um primeiro eluente constituído por THF/água (33% em volume de THF). A coluna foi então eluída com segundo eluente constituído por THF/água (40% em volume de THF). A velocidade de eluição foi cerca de 11 a 13 L/h (6,9 a 8,2 cm/h). Foi recolhida uma fracção principal de cerca de 460 L contendo cerca de 820 g de tacrolimus (67% de rendimento). Também foi recolhida uma pré-fracção com cerca de 80 L, contendo 190 g de tacrolimus.

A fracção principal (460 L) foi combinada com ácido fosfórico a 85% (460 mL), e concentrada a pressão reduzida até um volume de cerca de 230 L. O concentrado foi mantido à

temperatura ambiente durante um dia. (*N.b.*, foram experimentados tempos de espera mais longos em experiências subsequentes. Os cristais foram filtrados mais facilmente do que os obtidos neste caso). Os cristais foram lavados com hexano e secos a 40 °C.

O produto isolado da fracção principal tinha cerca de 0,1% de área de RRT0.95 e cerca de 1,7% de área de RRT1.25.

O produto isolado da pré-fracção tinha cerca de 3% de área de RRT0.95 e cerca de 0,3% de área de RRT1.25.

Exemplo 2:

Repetiu-se o processo geral do exemplo 1 para investigar o efeito da composição e do caudal do eluente.

Através destas experiências, foi possível estabelecer que a redução do caudal de eluição aumenta a eficiência de separação da cromatografia. O aumento do caudal de eluição reduziu a eficiência da cromatografia. Um caudal de 25 cm/cm². hora (em vez de 6,9-8,2 cm/cm².hora) resultou numa redução significativa da eficiência, mas foi possível recolher a fracção principal com a qualidade da descrita no Exemplo 1.

Estabeleceu-se ainda que o primeiro eluente de 34% em volume de THF (em vez de 33% em volume) aumentou o rendimento da cromatografia. O rendimento foi 69%. O nível da impureza RRT:0.95 da fracção principal era 0,10% da área.

Quando se utilizou um eluente com 31% em volume de THF, o tempo de eluição do tacrolimus foi aumentado. Verificou-se que as concentrações de eluente mencionadas (31%, 33%, 34%, 40% em volume de tetra-hidrofurano) eram utilizáveis para eluição do tacrolimus, sem aumentar a concentração de solvente.

Estas experiências adicionais também estabeleceram que as misturas eluentes de água:tetra-hidrofurano:solventes também eram eficazes. Os solventes testados utilizados para eluentes de água:tetra-hidrofurano:solvente foram metanol, acetonitrilo, acetona, n-propanol e n-butanol. Em todos os casos se obteve qualidade adequada.

Exemplo 3

As áreas percentuais referem-se à área percentual dos cromatogramas de HPLC obtidos pelo método aqui descrito acima.

O processo adiante foi realizado a 20 °C até 25 °C.

Preparou-se um leito de resina de sorção (Diaion SP 207) numa coluna (3,2 cm de diâmetro) utilizando água para carregar a coluna (ca. 550 mL de resina de sorção húmida).

Dissolveu-se tacrolimus (7,2 g) numa mistura de acetonitrilo (30 mL) e água (20 mL). O tacrolimus continha cerca de 2,6% da área de RRT0.95 (ascomicina) e cerca de 2,9% da área de RRT1.25 (di-hidrotacrolimus).

A solução de tacrolimus foi alimentada como uma camada sobre o leito de resina de sorção húmida.

A coluna foi eluída com cerca de 8 L de eluente constituído por acetonitrilo/água/ácido fosfórico (600:400:1). O caudal de eluição era de 90 mL/hora.

As fracções 32-45 foram combinadas. As fracções combinadas continham 1,9 g de tacrolimus. O teor de impurezas das fracções combinadas era cerca de 2,9% da área de RRT0.95 (ascomicina) e cerca de 1,2% da área de RRT1.25 (di-hidrotacrolimus).

O processo de purificação descrito é adequado para redução de di-hidrotacrolimus. De um modo preferido, o eluente tem um teor de acetonitrilo de cerca de 30% a 70%, de um modo preferido cerca de 40% a 65%.

O teor de ácido inorgânico é utilizado para impedir a decomposição do tacrolimus durante a cromatografia. De um modo preferido, o ácido inorgânico é ácido fosfórico. De um modo preferido, o teor de ácido fosfórico está entre cerca de 0,0005 a 0,003 partes de ácido para 1 parte de eluente.

O método de purificação descrito aumenta a eficiência dos métodos descritos nos exemplos 1 e 2.

Exemplo 4

Preparou-se duas colunas para cromatografia de acordo com o exemplo 1. Antes da cromatografia, adsorveu-se 3000 g de substância activa contendo tacrolimus em resina de sorção XAD 1180 de acordo com o procedimento seguinte. O tacrolimus foi dissolvido em 15 L de acetona. Adicionou-se resina de sorção (33 L) à solução, e adicionou-se lentamente 90 L de água à mistura de solução/resina com agitação contínua. A carga de alimentação de resina de sorção foi colocada (sobreposta) como uma camada por cima da resina de sorção contida na primeira coluna.

A primeira coluna foi eluída com mistura de tetra-hidrofurano:água (34% em volume de THF). O caudal de eluição era 15 L/hora. Foram recolhidas fracções de 20 L cada. O volume de cada fracção era 20 L. Após a eluição da 35^a fracção, a segunda coluna foi ligada (acoplada fluidamente) em série à primeira coluna, e a eluição foi continuada nas colunas em série.

Depois de eluída a 95^a fracção, a primeira coluna foi desligada e a eluição foi prosseguida só na segunda coluna. As

fracções purificadas adequadas foram combinadas.

A maior parte do THF foi removido das fracções combinadas por evaporação a pressão reduzida. O concentrado foi extraído com acetato de etilo e as fases foram separadas. A fase de acetato de etilo separada foi concentrada a pressão reduzida (aproximadamente 1 parte de tacrolimus e 1 parte de acetato de etilo). Adicionou-se lentamente ciclo-hexano e água ao extracto de acetato de etilo concentrado. O tacrolimus precipitado foi recuperado da mistura a 0-30 °C. Os cristais foram filtrados e secos.

A substância de partida continha, aproximadamente, 0,5% da área de ascomicina (RRT0.95) e, aproximadamente, 1,3% de di-hidrotacrolimus (RRT1.25). Os cristais produzidos continham menos do que 0,1% da área de ascomicina e aproximadamente 0,4% da área de di-hidrotacrolimus.

Exemplo 5

Dissolveu-se o tacrolimus numa mistura de água:tetra-hidrofurano (67:33 em volume). A concentração obtida no solvente era de, aproximadamente, 30 g/litro. A solução foi passada em resina de sorção XAD 1180. A resina de sorção adsorveu o tacrolimus.

Após a adsorção, a eluição do tacrolimus foi prosseguida como no exemplo 1.

Exemplo 6

Dissolveu-se o tacrolimus numa mistura de água:tetra-hidrofurano (67:33 em volume). A concentração obtida no solvente era de, aproximadamente, 30 g/litro. A solução foi passada em

resina de sorção HP20. A resina de sorção adsorve o tacrolimus.

Após a adsorção, a eluição do tacrolimus é prosseguida como no exemplo 1.

Exemplo 7

O processo a seguir é realizado a 28 °C até 32 °C.

Prepara-se um leito de resina de sorção (Amberlite® XAD 1180) numa coluna (45 cm de diâmetro), utilizando água:THF para carregar a coluna (ca. 100 L de resina de sorção húmida).

Adiciona-se água (86 L) lentamente, com agitação, a uma solução de ascomicina (1227 g) em acetonitrilo (10 L) em que é suspensa resina de sorção (Amberlite® XAD 1180; 9 L) com agitação. A ascomicina utilizada contém RRT1.00 (tacrolimus). Quando a adição de água está completa, a carga de alimentação de resina de sorção é recolhida por filtração.

A carga de alimentação recolhida é colocada (sobrepota) como uma camada sobre o leito de resina de sorção húmida.

A coluna é primeiro eluída com cerca de 1800 L de um primeiro eluente constituído por THF/água (33% em volume de THF). A coluna é depois eluída com um segundo eluente constituído por THF/água (40% em volume de THF). O caudal de eluição é cerca de 11 a 13 L/h (6,9 a 8,2 cm/h). Recolhe-se uma fracção principal, cerca de 460 L, contendo ascomicina. Também se recolhe uma pré-fracção de cerca de 80 L contendo ascomicina.

A fracção principal (460 L) é combinada com ácido fosfórico, 85% (460 mL), e concentrada a pressão reduzida até um volume de cerca de 230 L. O concentrado é mantido à temperatura ambiente durante um dia. Os cristais são lavados com hexano e

secos a 40 °C.

Exemplo 8

Prepara-se duas colunas para cromatografia de acordo com o exemplo 1. Antes da cromatografia, adsorve-se 3000 g de substância activa contendo ascomicina em resina de sorção XAD 1180 de acordo com o processo seguinte. A ascomicina é dissolvida em 15 L de acetona. Adiciona-se resina de sorção (33 L) à solução, e adiciona-se lentamente 90 L de água à mistura de solução/resina com agitação contínua. A carga de alimentação de resina de sorção é colocada (sobreposta) como uma camada sobre a resina de sorção contida na primeira coluna.

A primeira coluna é eluída com mistura de tetra-hidrofurano:água (34% em volume de THF). A taxa de eluição é 15 L/hora. Recolhe-se fracções de 20 L cada uma. O volume de cada fracção era 20 L. Após a eluição da 35^a fracção, a segunda coluna é ligada (acoplamento de fluido) em série à primeira coluna, e a eluição é continuada nas colunas em série.

Depois de eluída a 95^a fracção, a primeira coluna é desligada e a eluição é prosseguida só na segunda coluna. As fracções purificadas adequadas são combinadas.

A maior parte do THF é removido das fracções combinadas por evaporação a pressão reduzida. O concentrado é extraído com acetato de etilo e as fases são separadas. A fase de acetato de etilo separada é concentrada a pressão reduzida (aproximadamente 1 parte de ascomicina e 1 parte de acetato de etilo). Adiciona-se lentamente ciclo-hexano e água ao extracto de acetato de etilo concentrado. A ascomicina precipitada é recuperada da mistura a 0-30 °C. Os cristais são filtrados e secos.

Exemplo 9

O procedimento a seguir é realizado a 28°C a 32°C.

Prepara-se um leito de resina de sorção (Amberlite® XAD 1180) numa coluna (45 cm de diâmetro) utilizando água:THF para carregar a coluna (ca. 100 L de resina de sorção húmida).

Adiciona-se água (86 L) lentamente, com agitação, a uma solução de sirolimus (1227 g) em acetonitrilo (10 L) em que é suspensa resina de sorção (Amberlite® XAD 1180; 9 L) com agitação. O sirolimus utilizado contém impurezas. Quando a adição de água está completa, a carga de alimentação de resina de sorção é recolhida por filtração.

A carga de alimentação recolhida é colocada (sobreposta) como uma camada sobre o leito de resina de sorção húmida.

A coluna é primeiro eluída com cerca de 1800 L de um primeiro eluente constituído por THF/água (33% em volume de THF). A coluna é depois eluída com um segundo eluente constituído por THF/água (40% em volume de THF). O caudal de eluição é cerca de 11 a 13 L/h (6,9 a 8,2 cm/h). Recolhe-se uma fracção principal, cerca de 460 L, contendo sirolimus. Também se recolhe uma pré-fracção de cerca de 80 L contendo sirolimus.

A fracção principal (460 L) é combinada com ácido fosfórico, 85% (460 mL), e concentrada a pressão reduzida até um volume de cerca de 230 L. O concentrado é mantido à temperatura ambiente durante um dia. Os cristais são lavados com hexano e secos a 40 °C.

Exemplo 10

Prepara-se duas colunas para cromatografia de acordo com o

exemplo 1. Antes da cromatografia, adsorve-se 3000 g de substância activa contendo sirolimus em resina de sorção XAD 1180 de acordo com o processo seguinte. O sirolimus é dissolvido em 15 L de acetona. Adiciona-se resina de sorção (33 L) à solução, e adiciona-se lentamente 90 L de água à mistura de solução/resina com agitação contínua. A carga de alimentação de resina de sorção é colocada (sobreposta) como uma camada sobre a resina de sorção contida na primeira coluna.

A primeira coluna é eluída com mistura de tetra-hidrofurano:água (34% em volume de THF). A taxa de eluição é 15 L/hora. Recolhe-se fracções de 20 L cada uma. O volume de cada fracção era 20 L. Após a eluição da 35^a fracção, a segunda coluna é ligada (acoplamento de fluido) em série à primeira coluna, e a eluição é continuada nas colunas em série.

Depois de eluída a 95^a fracção, a primeira coluna é desligada e a eluição é prosseguida só na segunda coluna. As fracções purificadas adequadas são combinadas.

A maior parte do THF é removido das fracções combinadas por evaporação a pressão reduzida. O concentrado é extraído com acetato de etilo e as fases são separadas. A fase de acetato de etilo separada é concentrada a pressão reduzida (aproximadamente 1 parte de sirolimus e 1 parte de acetato de etilo). Adiciona-se lentamente ciclohexano e água ao extracto de acetato de etilo concentrado. O sirolimus precipitado é recuperado da mistura a 0-30 °C. Os cristais são filtrados e secos.

Exemplo 11

O processo a seguir é realizado a 28 °C até 32 °C.

Prepara-se um leito de resina de sorção (Amberlite[®] XAD 1180) numa coluna (45 cm de diâmetro) utilizando água:THF para

carregar a coluna (ca. 100 L de resina de sorção húmida).

Adiciona-se água (86 L) lentamente, com agitação, a uma solução de everolimus (1227 g) em acetonitrilo (10 L) em que é suspensa resina de sorção (Amberlite® XAD 1180; 9 L) com agitação. O everolimus utilizado contém impurezas. Quando a adição de água está completa, a carga de alimentação de resina de sorção é recolhida por filtração.

A carga de alimentação recolhida é colocada (sobreposta) como uma camada sobre o leito de resina de sorção húmida.

A coluna é primeiro eluída com cerca de 1800 L de um primeiro eluente constituído por THF/água (33% em volume de THF). A coluna é depois eluída com um segundo eluente constituído por THF/água (40% em volume de THF). O caudal de eluição é cerca de 11 a 13 L/h (6,9 a 8,2 cm/h). Recolhe-se uma fracção principal, cerca de 460 L, contendo everolimus. Também se recolhe uma pré-fracção de cerca de 80 L contendo everolimus.

A fracção principal (460 L) é combinada com ácido fosfórico, 85% (460 mL), e concentrada a pressão reduzida até um volume de cerca de 230 L. O concentrado é mantido à temperatura ambiente durante um dia. Os cristais são lavados com hexano e secos a 40 °C.

Exemplo 12

Prepara-se duas colunas para cromatografia de acordo com o exemplo 1. Antes da cromatografia, adsorve-se 3000 g de substância activa contendo everolimus em resina de sorção XAD 1180 de acordo com o processo seguinte. O everolimus é dissolvido em 15 L de acetona. Adiciona-se resina de sorção (33 L) à solução, e adiciona-se lentamente 90 L de água à mistura de solução/resina com agitação contínua. A carga de alimentação de

resina de sorção é colocada (sobrepota) como uma camada sobre a resina de sorção contida na primeira coluna.

A primeira coluna é eluída com mistura de tetra-hidrofurano:água (34% em volume de THF). A taxa de eluição é 15 L/hora. Recolhe-se fracções de 20 L cada uma. O volume de cada fracção era 20 L. Após a eluição da 35^a fracção, a segunda coluna é ligada (acoplamento de fluido) em série à primeira coluna, e a eluição é continuada nas colunas em série.

Depois de eluída a 95^a fracção, a primeira coluna é desligada e a eluição é prosseguida só na segunda coluna. As fracções purificadas adequadas são combinadas.

A maior parte do THF é removido das fracções combinadas por evaporação a pressão reduzida. O concentrado é extraído com acetato de etilo e as fases são separadas. A fase de acetato de etilo separada é concentrada a pressão reduzida (aproximadamente 1 parte de everolimus e 1 parte de acetato de etilo). Adiciona-se lentamente ciclo-hexano e água ao extracto de acetato de etilo concentrado. O everolimus precipitado é recuperado da mistura a 0-30 °C. Os cristais são filtrados e secos.

Exemplo 13

O processo a seguir é realizado a 28 °C até 32 °C.

Prepara-se um leito de resina de sorção (Amberlite® XAD 1180) numa coluna (45 cm de diâmetro) utilizando água:THF para carregar a coluna (ca. 100 L de resina de sorção húmida).

Adiciona-se água (86 L) lentamente, com agitação, a uma solução de pimecrolimus (1227 g) em acetonitrilo (10 L) em que é suspensa resina de sorção (Amberlite® XAD 1180; 9 L) com agitação. O pimecrolimus utilizado contém impurezas. Quando a

adição de água está completa, a carga de alimentação de resina de sorção é recolhida por filtração.

A carga de alimentação recolhida é colocada (sobreposta) como uma camada sobre o leito de resina de sorção húmida.

A coluna é primeiro eluída com cerca de 1800 L de um primeiro eluente constituído por THF/água (33% em volume de THF). A coluna é depois eluída com um segundo eluente constituído por THF/água (40% em volume de THF). O caudal de eluição é cerca de 11 a 13 L/h (6,9 a 8,2 cm/h). Recolhe-se uma fracção principal, cerca de 460 L, contendo pimecrolimus. Também se recolhe uma pré-fracção de cerca de 80 L contendo pimecrolimus.

A fracção principal (460 L) é combinada com ácido fosfórico, 85% (460 mL), e concentrada a pressão reduzida até um volume de cerca de 230 L. O concentrado é mantido à temperatura ambiente durante um dia. Os cristais são lavados com hexano e secos a 40 °C.

Exemplo 14

Prepara-se duas colunas para cromatografia de acordo com o exemplo 1.

Antes da cromatografia, adsorve-se 3000 g de substância activa contendo pimecrolimus em resina de sorção XAD 1180 de acordo com o processo seguinte. O pimecrolimus é dissolvido em 15 L de acetona. Adiciona-se resina de sorção (33 L) à solução, e adiciona-se lentamente 90 L de água à mistura de solução/resina com agitação contínua. A carga de alimentação de resina de sorção é colocada (sobreposta) como uma camada sobre a resina de sorção contida na primeira coluna.

A primeira coluna é eluída com mistura de tetra-hidrofurano:água (34% em volume de THF). A taxa de eluição é 15 L/hora. Recolhe-se fracções de 20 L cada uma. O volume de cada fracção era 20 L. Após a eluição da 35^a fracção, a segunda coluna é ligada (acoplamento de fluido) em série à primeira coluna, e a eluição é continuada nas colunas em série.

Depois de eluída a 95^a fracção, a primeira coluna é desligada e a eluição é prosseguida só na segunda coluna. As fracções purificadas adequadas são combinadas.

A maior parte do THF é removido das fracções combinadas por evaporação a pressão reduzida. O concentrado é extraído com acetato de etilo e as fases são separadas. A fase de acetato de etilo separada é concentrada a pressão reduzida (aproximadamente 1 parte de pimecrolimus e 1 parte de acetato de etilo). Adiciona-se lentamente ciclohexano e água ao extracto de acetato de etilo concentrado. O pimecrolimus precipitado é recuperado da mistura a 0-30 °C. Os cristais são filtrados e secos.

Lisboa, 22 de Novembro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a separação de um macrolido seleccionado do grupo consistindo de tacrolimus, ascomicina, sirolimus, everolimus e pimecrolimus de impurezas nele contidas compreendendo os passos de:
 - a) alimentação de uma carga do macrolido tendo um nível de impurezas inicial;
 - b) colocação da carga alimentada sobre um leito de resina de sorção,
 - c) eluição do leito de resina de sorção alimentada com um eluente compreendendo água e tetra-hidrofurano, e adicionalmente, quando o macrolido é tacrolimus, o eluente pode compreender água, acetonitrilo e ácido fosfórico, para se obter um efluente, e
 - d) recolha de, pelo menos, uma fracção de efluente compreendendo o macrolido.
2. Método da reivindicação 1, em que a carga de alimentação de um macrolido contém ainda uma porção de alimentação de uma resina de sorção.
3. Método da reivindicação 2, em que a carga de alimentação é depositada sobre a porção de alimentação a partir da sua solução num solvente orgânico num passo que inclui a combinação da solução com um anti-solvente.
4. Processo da reivindicação 3, em que o solvente orgânico é seleccionado do grupo consistindo de tetra-hidrofurano, acetona, acetonitrilo, metanol, etanol, n-butanol, n-propanol, iso-propanol, ésteres e solventes apróticos

dipolares.

5. Processo da reivindicação 4, em que o solvente orgânico é seleccionado do grupo consistindo de tetra-hidrofurano, acetona e acetonitrilo.
6. Processo de qualquer das reivindicações 3 a 5, em que o anti-solvente é seleccionado do grupo consistindo de água, alcanos lineares ou ramificados, ou cicloalcanos.
7. Processo da reivindicação 6, em que o anti-solvente é água.
8. Processo de qualquer das reivindicações 3 a 7, em que a proporção de solução combinada para anti-solvente combinado é 40% ou menos.
9. Método de qualquer das reivindicações 1 a 8 compreendendo ainda o passo de isolamento do macrolido da pelo menos uma fracção, em que o macrolido tem um nível final de impurezas que é inferior ao nível inicial de impurezas.
10. Método da reivindicação 9, em que o isolamento compreende o passo de concentração da pelo menos uma fracção a pressão atmosférica (cerca de 760 mm Hg) ou a pressão inferior a 760 mm Hg e uma temperatura de 70 °C ou menos, de um modo preferido 60 °C ou menos.
11. Método da reivindicação 10 compreendendo ainda o passo de, antes da concentração, combinação da pelo menos, uma fracção com um ácido inorgânico.
12. Método da reivindicação 11, em que o ácido inorgânico é ácido fosfórico.
13. Método da reivindicação 11 ou 12, em que a quantidade do ácido é 1 a 10 mL por litro de eluente.

14. Método de qualquer das reivindicações 9 a 13, em que o isolamento compreende o passo de combinação de um anti-solvente com a pelo menos uma fracção de eluente.
15. Método da reivindicação 14, em que, antes da combinação, a pelo menos uma fracção de efluente é concentrada a uma pressão inferior a 760 mm Hg.
16. Método de qualquer das reivindicações 1 a 15, em que a resina de sorção é uma resina macrorreticulada.
17. Método da reivindicação 16, em que a resina macrorreticulada é seleccionada do grupo consistindo em resinas Amberlite® XAD e resinas de sorção Diaion.
18. Método da reivindicação 17, em que a resina macrorreticulada é Amberlite® XAD 1180.
19. Método de qualquer das reivindicações 1 a 18, em que o leito de resina de sorção está confinado numa coluna.
20. Método de qualquer das reivindicações 1 a 19, em que o volume de efluente recolhido em, pelo menos, uma fracção, compreende 60% a 90% em peso do macrolido inicialmente presente na carga de alimentação.
21. Método de qualquer das reivindicações 1 a 20, em que o caudal do eluente é inferior a 25 cm/h.
22. Método da reivindicação 21, em que o caudal do eluente é inferior a 15 cm/h.
23. Método de qualquer das reivindicações 1 a 22, em que o macrolido é tacrolimus.

24. Método de qualquer das reivindicações 1 a 23, em que o eluente compreende uma mistura de tetra-hidrofurano e água com 20% em volume a 50% em volume de tetra-hidrofurano.
25. Método da reivindicação 24, em que o eluente tem 31% em volume a 40% em volume de tetra-hidrofurano, de um modo preferido 33% em volume a 35% em volume de tetra-hidrofurano.
26. Método de qualquer das reivindicações 1 a 23, em que o eluente compreende uma mistura de acetonitrilo e água com 30% em volume a 70% em volume de acetonitrilo, de um modo preferido 40% em volume a 65% em volume de acetonitrilo.
27. Método de qualquer das reivindicações 1 a 26 em que o eluente inclui até 0,003 partes em volume de ácido fosfórico por 1 parte em volume de eluente.
28. Método de acordo qualquer das reivindicações 1 a 27, em que a carga de alimentação é colocada sobre a porção de alimentação de resina de sorção num sistema de recirculação.
29. Método de qualquer das reivindicações anteriores, em que pelo menos um leito de resina de sorção adicional é ligado ao leito de resina de sorção do passo b.
30. Método da reivindicação 29, em que após séries adicionais de fracções de eluente o leito de resina do passo b é desligado.
31. Método de qualquer das reivindicações anteriores, em que o macrolido é tacrolimus e as impurezas nele contidas são ascomicina e di-hidrotacrolimus.

Lisboa, 22 de Novembro de 2007