



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900616449
Data Deposito	05/08/1997
Data Pubblicazione	05/02/1999

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	H		

Titolo

PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI ACARBOSIO

5309 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

MS/as "PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI ACARBOSIO"

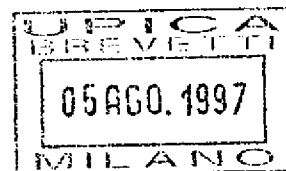
a nome : UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS LOWELL

MI 97 A 1880

con sede in: Lowell - Massachusetts (U.S.A.)

* * *

DESCRIZIONE



La presente invenzione si riferisce a un procedimento per la purificazione di prodotti farmaceutici, in particolare per la purificazione di acarbosio.

Sfondo dell'invenzione

L'acarbosio è un inibitore del complesso enzimatico saccarasi nell'intestino umano ed è utilizzato in medicinali per il trattamento del diabete.

Chimicamente, l'acarbosio è l' 0-4,6-dideossi-4-[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-triidrossi-3-(idrossimetil)-2-cicloesen-1-il-amminoglucopiranosil-(1->4)-D-glucopiranosio.

DE 2209832, DE 2209834 e DE 2064092 descrivono la preparazione di acarbosio per fermentazione di specie Actinoplanes.

Procedimenti dedicati alla purificazione dell'acarbosio sono descritti in DE 2347782 e DE 2719912 attraverso l'uso di scambiatori cationici forti. Tali scambiatori sono gel e gel macroreticolari, hanno basso trasferimento di massa e l'eluizione dà luogo a picchi larghi, perciò i livelli di purezza che si riescono ad ottenere sono bassi. La purezza del prodotto risultante è

dell'ordine del 77-88% di acarbosio sul residuo secco (metodo HPLC), insoddisfacente per l'uso in medicina umana.

US 4767850 e US 4666776 descrivono l'uso di scambiatori cationici forti a base di comonomeri idrofili e comonomeri stirenici.

Gli scambiatori cationici fortemente acidi della tecnica nota non assicuravano soddisfacenti livelli di purezza. Era quindi suggerito l'utilizzo di uno scambiatore cationico debolmente acido. Tuttavia, l'arte nota riteneva impossibile la semplice sostituzione degli scambiatori fortemente acidi con quelli debolmente acidi, perché gli scambiatori debolmente acidi non legano in misura adeguata l'acarbosio, che è una base debole.

EP 0226121 descrive un procedimento per la purificazione di acarbosio utilizzando una colonna cromatografica impaccata con uno scambiatore cationico debolmente acido, il quale porta gruppi carbossilici ed è a base di destrano o agarosio o cellulosa oppure uno scambiatore derivato dal primo ma derivatizzato con poliacrilammide. La purezza dell'acarbosio è non inferiore al 90% in peso, dove il componente secondario di natura zuccherina è presente per meno del 10% in peso, ma non è del tutto assente. In questo brevetto vi sono degli esempi di attuazione che mostrano una purezza di fino al 98%. Il brevetto qui citato risolveva il problema facendo ricorso a uno scambiatore cationico debolmente acido molto particolare, dotato di carattere idrofilo ed eseguendo la cromatografia in un intervallo di pH molto ristretto.

L'utilizzo di uno scambiatore cationico debolmente acido permette

di ottenere elevate purezze, tuttavia, è di difficile uso su una scala industriale, dato che l'acarbosio non viene legato allo scambiatore, piuttosto ne viene ritardata l'eluizione. Per di più, la temperatura dello scambiatore deve essere tenuta sotto controllo.

Sommario dell'invenzione

E' stato ora sorprendentemente trovato che un tipo di scambiatore cationico fortemente acido, di tipo diverso da quelli sinora utilizzati nella purificazione dell'acarbosio, permette una purificazione su scala industriale con tenori di purezza di almeno il 98%.

Pertanto, è un oggetto della presente invenzione un procedimento per la purificazione di acarbosio che comprende il porre a contatto una soluzione di acarbosio con uno scambiatore cationico fortemente acido non aromatico, idrofilo e dotato di un elevato trasferimento di massa.

Descrizione dell'invenzione

Il procedimento per la purificazione dell'acarbosio comprende essenzialmente:

- il caricare una soluzione di acarbosio prepurificato in una colonna per cromatografia impaccata con uno scambiatore cationico fortemente acido non aromatico idrofilo dotato di un elevato trasferimento di massa; e successiva eluizione.

La raccolta delle frazioni arricchite di acarbosio e il suo isolamento rientrano nelle comuni conoscenze del tecnico medio.

Per la realizzazione della presente invenzione, l'acarbosio prepurificato viene preparato rimuovendo le impurezze che derivano dal procedimento di fermentazione. Questa operazione è generalmente condotta

in due stadi:

- adsorbimento: il brodo filtrato viene portato a pH 2.5 con un acido e poi estratto con carbone attivo per rimuovere le impurezze scure, successivamente il pH della soluzione viene portato a 7.0 mediante uno scambiatore anionico forte sotto forma idrossido;
- scambio ionico: il brodo, mantenendo il pH a 7.0, è posto a contatto con uno scambiatore cationico debole per abbassare la conduttività del brodo.

Metodi adeguati per preparare una soluzione di acarbosio prepurificato sono descritti in US 4904769 e US 4767850.

Il processo di fermentazione è descritto in US 4062950.

La parte caratterizzante il procedimento della presente invenzione è la purificazione della soluzione di acarbosio prepurificato con uno scambiatore cationico fortemente acido non aromatico, il quale è idrofilo ed è dotato di un elevato trasferimento di massa.

Il pH della soluzione di acarbosio prepurificato è preferibilmente non inferiore a 3.0 con un acido. Successivamente la soluzione viene posta a contatto con lo scambiatore secondo la presente invenzione ed eluito con un opportuno mezzo.

Un esempio preferito di mezzo eluente è ammoniaca.

Altri mezzi eluenti adatti sono, ad esempio, acido cloridrico, idrossido di sodio o cloruro di sodio.

Lo scambiatore cationico secondo la presente invenzione viene preparato lavando con acido cloridrico 1N, quindi con acqua fino a che il pH dell'effluente è superiore a 4.

In una prima realizzazione preferita della presente invenzione, lo scambiatore cationico fortemente acido non aromatico, avente carattere idrofilo e dotato di un elevato trasferimento di massa è rappresentato da una matrice di allumina rivestita di polimero. Il polimero è ottenuto da monomeri reattivi di piridinio e i gruppi funzionali sono propil solfonato. Scambiatori cationici di questo tipo sono disponibili sul mercato con il marchio BioProtocol Bio S della Cohesive Biotechnologies Inc., Acton, Massachusetts.

In alternativa, si possono utilizzare altri scambiatori cationici fortemente acidi che rientrano nella presente invenzione.

In una seconda realizzazione della presente invenzione, lo scambiatore cationico è costituito da una resina di sulfoetossietil cellulosa, ad esempio Whatman Express-ion Exchanger, della Whatman.

In una terza realizzazione della presente invenzione, lo scambiatore cationico è costituito da una resina di copolimero metacrilato solfonato, ad esempio Macro-Prep high S, della Bio Rad.

L'isolamento dell'acarbosio può essere condotto con tecniche convenzionali note all'esperto del settore. Ad esempio, le frazioni arricchite in acarbosio possono essere concentrate a sovrassaturazione mediante evaporazione sotto vuoto, quindi il prodotto è precipitato da un opportuno mezzo, quale acetone.

La purezza del prodotto finale è almeno del 98%.

Le preparazioni contenenti acarbosio con un contenuto di almeno 98% in peso, nelle quali un componente secondario identificabile come zucchero è presente per un massimo del 2%, eventualmente acqua,

ottenibili con il procedimento secondo la presente invenzione rientrano nell'ambito delle rivendicazioni.

Analogamente, composizioni farmaceutiche contenenti una quantità terapeuticamente efficace di una preparazione come sopra descritta sono un altro oggetto delle presente invenzione.

Composizioni farmaceutiche e relative preparazioni sono descritte in EP 0226121.

Ancora un oggetto della presente invenzione è l'uso della preparazione di cui sopra per la fabbricazione di un medicamento avente attività inibitrice del complesso enzimatico saccarasi dell'intestino umano, utile, ad esempio, per il trattamento del diabete.

I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

Esempio 1

a) acarbosio prepurificato

100 ml di una soluzione proveniente dalla fermentazione furono acidificati con HNO_3 a pH 2,5. La miscela fu tenuta sotto agitazione per 10 minuti con 0,5 g di carbone attivo, quindi centrifugata per 30 minuti a 5000 gpm. La soluzione fu quindi neutralizzata aggiungendo 2,5 g di Amberlite IRA 410 (forma idrossido). Il surnatante neutro fu quindi posto a contatto con 2,5 g di IRC-50 per abbassare la conduttività.

b) Cromatografia.

Una colonna cromatografica di diametro 4,6 mm e lunghezza 100 mm (volume 1,7 ml) fu impaccata con una resina cationica fortemente acida (Bio Protocol Bio S) in acqua distillata. La colonna fu lavata con 10 volumi colonna di HCl 0,01 N, seguiti da 10 volumi colonna di acqua

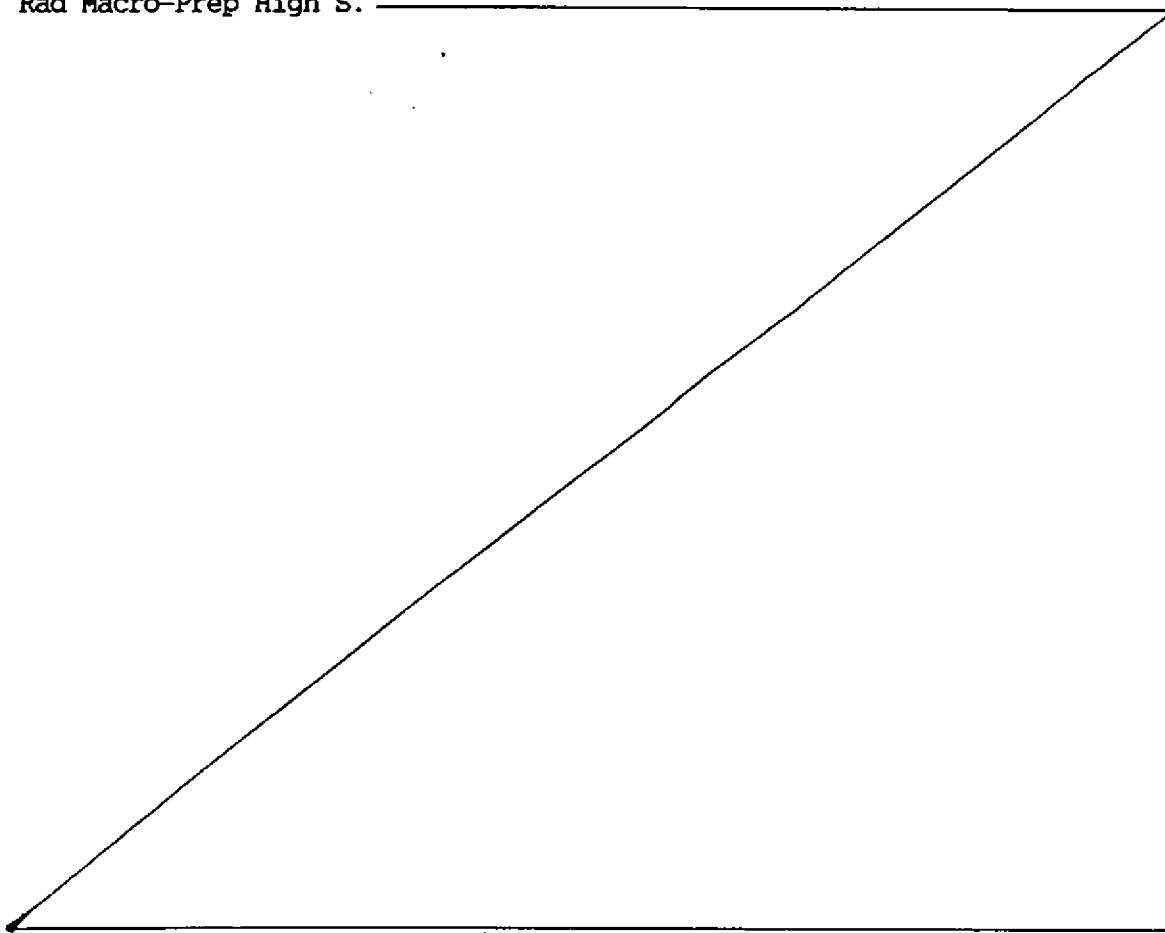
distillata a un flusso di 3 ml/min. 800 µl della soluzione di acarbosio prepurificato preparata al punto a) furono iniettati nella colonna. La colonna fu lavata con 10 volumi colonna di NH_4OH 0,2 N. L'eluato fu raccolto e analizzato con HPLC (metodo descritto in US 4904769) e la purezza risultante fu del 98% sul residuo secco.

Esempio 2

La procedura dell'esempio 1 fu ripetuta con l'eccezione che lo scambiatore cationico fortemente acido era costituito dalla resina Whatman Sulfoethoxyethyl (SE) Cellulose Express-Ion Exchanger.

Esempio 3

La procedura dell'esempio 1 fu ripetuta con l'eccezione che lo scambiatore cationico fortemente acido era costituito dalla resina Bio-Rad Macro-Prep High S.



RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la purificazione di acarbosio comprendente il caricare una soluzione di acarbosio prepurificato in una colonna per cromatografia impaccata con uno scambiatore cationico fortemente acido non aromatico idrofilo e successiva eluizione.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, nel quale detto scambiatore cationico è formato da una matrice di allumina rivestita di polimero, detto polimero essendo ottenuto da monomeri reattivi di piridinio e recante gruppi funzionali propil solfonato.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, nel quale detto scambiatore cationico è formato da una resina di sulfossietil cellulosa.
4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, nel quale detto scambiatore cationico è formato da un copolimero metacrilato solfonato.
5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, nel quale detta eluizione è condotta con ammoniaca.
6. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, nel quale detta eluizione è condotta con idrossido di sodio.
7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, nel quale detta eluizione è condotta con acido cloridrico.
8. Una preparazione contenente acarbosio con un contenuto non inferiore al 98% in peso, un componente secondario identificabile come zucchero presente per un massimo del 2%, eventualmente acqua, ottenibili con il procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7.
9. Composizioni farmaceutiche comprendenti una quantità efficace di una preparazione della rivendicazione 8.

10. Uso di una preparazione della rivendicazione 8 per la fabbricazione di un medicamento avente attività di inibizione del complesso enzimatico saccarasi nell'intestino umano.

11. Uso secondo la rivendicazione 10, dove detto medicamento è utile per il trattamento del diabete.

Milano, 5 agosto 1997

Il Mandatario
(Spadaro Marco)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

