



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 654**

51 Int. Cl.:
C07J 63/00 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03704494 .8**
96 Fecha de presentación : **30.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1474437**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

54 Título: **Procedimiento de producción mejorado para la obtención de ácido betulínico.**

30 Prioridad: **02.02.2002 DE 102 04 271**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.03.2010

73 Titular/es:
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG.
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

72 Inventor/es: **Sauter, Markus**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

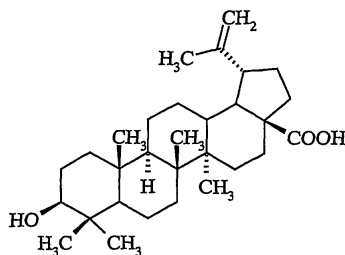
DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción mejorado para la obtención de ácido betulínico.

La presente invención, se refiere a un procedimiento mejorado para la obtención de ácido betulínico cristalino, de alta pureza, a partir de un extracto metanólico de corteza de plátano molida.

Antecedentes y trasfondo de la invención

El ácido betulínico, es el ácido 3β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico de la fórmula



25

Se conoce el hecho de que, el ácido betulínico, presenta una acción frente al crecimiento de las células del melanoma (por ejemplo, Pisha *et al.*, Nature Medicine 1, 1995, páginas 1046 y siguientes), así como frente a otras células cancerosas (por ejemplo, Sunder *et al.*, patente estadounidense US 6.048.847). Adicionalmente, además, sus amidas, deben poderse aplicar contra el HIV (por ejemplo, Evers *et al.*, J. Med. Chem. 29, 1996, página 1056 y siguientes; o Soler *et al.*, J. Med. Chem. 39, 1996, páginas 1069 y siguientes). Así, por lo tanto, existe una gran necesidad en cuanto al hecho de poder disponer del ácido betulínico.

Además de su fabricación sintética (por ejemplo, L. Ruzicka *et al.*, Helv. Chim. Acta 21, 1938, páginas 1076 y siguientes), el ácido betulínico, puede obtenerse a partir de diversas plantas, de una forma particular, de árboles, como por ejemplo, a partir de la corteza del *Picramnia pentandra* (como por ejemplo, Herz *et al.*, Pytochemistry 11, 1972, páginas 3061 y siguientes), a partir de la corteza del *Arbutus menziesii* (Robinson *et al.*, Phytochemistry 9, 1970, páginas 907 y siguientes), y a partir de la corteza del *Ziziphus mauritiana* (como por ejemplo, Pisha *et al.*, Nature Medicine 1, 1995, páginas 1046 y siguientes).

40

A partir de estos materiales de partida, el ácido betulínico, solamente puede aislarse de una forma muy difícil. Comparativamente, parece tener mayores perspectivas su obtención a partir de la corteza y / o cáscara del plátano (*Platanus ecerifolia*). En la patente alemana DE 197 13 768, se sugiere un procedimiento para la obtención del ácido betulínico, según el cual, se procede a extraer una materia en polvo obtenida a partir de la cáscara del plátano, con un disolvente polar medio, como por ejemplo, el diclorometano, el cloroformo o el éter dietílico.

45

Este procedimiento, no es no obstante apropiado para una obtención a escala industrial, correspondiente a grandes cantidades de ácido betulínico, ya que deben aplicarse grandes volúmenes de disolventes de polaridad media, con objeto de extraer el ácido betulínico (aplicaciones de 7 litros de diclorometano sobre 150 g de cáscara de plátano en polvo).

50

Bruckner *et al.*, J. Chem. Soc., 1948, páginas 948-951, describen un procedimiento para la obtención del ácido betulínico, a partir de cáscara de plátano, a cuyo efecto, las cortezas o cáscaras molidas, se extraen con metanol, el extracto obtenido, se concentra por evaporación y, el concentrado, se recrystaliza varias veces, en metanol, en presencia de carbón. El ácido betulínico de esta forma obtenido, presenta, no obstante, todavía, una gran cantidad de impurezas.

55

La presente invención, tiene por lo tanto la finalidad un procedimiento mejorado para la obtención, a gran escala técnica, de ácido betulínico cristalino, de alta pureza, a partir de cáscaras y/o corteza de plátano, el cual evite los inconvenientes de los procedimientos conocidos.

60

Descripción detallada de la invención

De una forma sorprendente, se ha encontrado ahora el hecho de que, el ácido betulínico, cristalino, de alta pureza, puede extraerse a partir de un extracto metanólico de corteza de plátano y/o cáscara de plátano, mediante la concentración por evaporación del extracto, y cristalización en un alcohol, caracterizado por el hecho de que, el residuo de la cristalización, se lava con un diluyente no polar.

65

ES 2 335 654 T3

El concepto “ácido betulínico”, tal y como se ha utilizado anteriormente, o se utilizará a continuación, en este documento, abarca tanto al ácido betulínico, tal cual, como a sus hidratos y solvatos, de una forma preferible, el ácido betulínico, el cual se encuentra solvatado con 1 a 2 equivalentes de un alcohol, de una forma especial, un equivalente de etanol.

Un objeto adicional de la invención, es el ácido betulínico cristalino de alta pureza, el cual se encuentra solvatado con equivalente de etanol.

Como plátanos especialmente apropiados, se han evidenciado los plátanos occidentales (*Platanus occidentalis*).

Como alcoholes para la recrystalización, se utiliza el etanol.

Como diluyentes no polares, son apropiados, por regla general, los hidrocarburos alifáticos, cicloalifáticos o aromáticos, o mezclas de éstos, de una forma preferible, los hidrocarburos alifáticos con 5 a 8 átomos de carbono, de una forma especial, pentano, hexano ó heptano, de una forma muy especialmente preferible, n-hexano, hidrocarburos cicloalifáticos con 5 a 8 átomos de carbono, de una forma especial, ciclopentano, ciclohexano, metilciclohexano, o hidrocarburos aromáticos con 6 a 9 átomos de carbono, de una forma especial, tolueno ó xileno.

Siempre y cuando, a efectos de simplicidad, se facilite la relación de dos materias, precedentemente o a continuación, en forma de “una cantidad de x hasta y veces”, en donde, x e y, significan respectivamente el límite inferior y el límite superior de las cantidades facilitadas, este dato se referirá a “x hasta y” partes en peso de una de las materias, referido a una (1) parte en peso de la otra materia.

(A) En concordancia con la presente invención, se realizan, una después de otra, las siguientes etapas, para el lavado y el aislamiento del residuo del extracto metanólico.

(i) Calentamiento del residuo, en un diluyente no polar;

(ii) Separación del residuo, del diluyente;

(iii) Calentamiento del residuo en etanol, aclarado de la fase etanólica mediante la adición de carbón activo y separación del carbón activo, de la fase etanólica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 60 y 95°C; y

(iv) Cristalización y separación del ácido betulínico, de la fase etanólica;

(B) En concordancia con la presente invención, la corteza o cáscara de plátano molida, se extrae de una vez, con una cantidad de 2 a 5 veces de metanol, durante un transcurso de tiempo de 0,5 a 5,0 horas, mediante calentamiento hasta la ebullición, se filtra el extracto obtenido, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 40 y 60°C, se concentra, por evaporación hasta un 30 a un 70% de su volumen, y se cristaliza a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre -10 y +10°C. Son formas preferidas de la invención, las siguientes:

(C) Procedimiento, según el cual, se procede a incorporar el residuo del extracto metanólico en una cantidad de 2 a 8 veces de un hidrocarburo alifático, de una forma preferible, ciclohexano, metilciclohexano ó n-hexano, de una forma particular, n-hexano, y se calienta la mezcla hasta la ebullición.

(D) Procedimiento, según el cual, en la etapa (ii), se procede a separar el residuo, mediante centrifugación o mediante filtrado por succión, del diluyente.

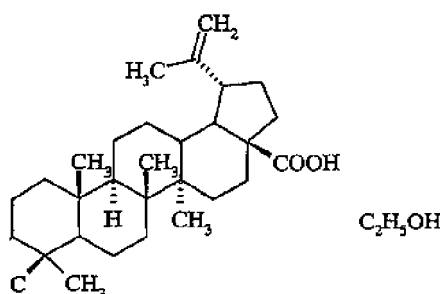
(E) Procedimiento, según el cual, en la etapa (iii), se procede a incorporar el residuo en una cantidad de 20 a 100 veces, de una forma preferida, en una cantidad de 30 a 80 veces, de una forma particular, de 40 a 60 veces, de etanol, y se calienta hasta la ebullición.

(F) Procedimiento, según el cual, en la etapa (iv), la fase etanólica, se enfría a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de -10 hasta +10°C, enfriándose, de una forma preferible, a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 0 a +5°C, se separa el ácido betulínico precipitado mediante centrifugación o mediante filtrado por succión, y se seca.

(G) Procedimiento, según el cual, el ácido betulínico obtenido, se encuentra a disposición como monoetanolato.

ES 2 335 654 T3

Se prefiere especialmente, el ácido betulínico cristalino, de alta pureza, el cual se encuentra solvatado con un equivalente de etanol, de una forma especial, el etanolato del ácido betulínico, de la fórmula



En una forma de presentación muy especialmente preferida del procedimiento en concordancia con la presente invención, se procede a suspender la corteza de plátano, en polvo, en una cantidad de 2 a 5 veces, de una forma preferible, en una cantidad de 3 a 4 veces, en metanol, y se calienta durante un transcurso de tiempo de 1 a 5 horas, de una forma particular, aproximadamente 1 a 5 horas, de una forma especial, aproximadamente 2 horas, de una forma preferible, a reflujo. La suspensión, se filtra a una temperatura de 40 a 60°C, de una forma especial, a una temperatura de aproximadamente 50°C, y el extracto en metanol, se concentra por evaporación, a una concentración del 40 al 40%, de una forma particular, a una concentración del 50% de su volumen. El extracto concentrado, se enfría a una temperatura de 0 a 10°C, de una forma particular, a una temperatura de 5°C, se separa mediante filtrado, y se lava con metanol frío. El residuo, se seca, de una forma preferible, al vacío, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van desde 40 hasta 70°C, de una forma especial, a una temperatura de aproximadamente 50°C.

Así, de este modo, se obtiene el ácido betulínico crudo, como una materia en polvo, incolora (aproximadamente el 2,0 hasta el 2,5%, calculado sobre la cáscara o corteza de plátano). Éste se suspende en una cantidad de 4 a 8 veces, de una forma particular, de 5 a 6 veces, de n-hexano, ciclohexano ó metilciclohexano, y se calienta durante un transcurso de tiempo de 0,5 a 2 horas, de una forma particular, durante 1 hora, de una forma particular, a reflujo. La suspensión obtenida, se centrifuga o se succiona, se vuelve a lavar con una cantidad de 1,5 a 4,5 veces, de una forma particular, con una cantidad de aproximadamente 3 veces, de hexano, ciclohexano ó metilciclohexano y, el residuo, se seca durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de aproximadamente 40°C, de una forma preferible, al vacío.

El ácido betulínico de esta forma obtenido, se disuelve, en una cantidad de 30 a 50 veces de etanol, mediante la acción del calor. Se procede a añadir carbón activo, y se separa mediante filtrado, en caliente. Mediante enfriamiento, se establece la cristalización. La mezcla, se enfría a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 0 a 10°C, de una forma particular, a una temperatura de 5°C, se succiona o se centrifuga, y se vuelve a lavar. Así, de este modo, se obtiene ácido betulínico cristalino, de alta pureza, el cual se solvata con un mol de etanol.

El ejemplo que se facilita a continuación, sirve para la ilustración de un procedimiento, realizado a título de ejemplo, para la obtención del ácido betulínico. Éste se entenderá, únicamente, como una posible forma de realización representada a título de ejemplo, sin limitar la invención, en cuanto a lo referente a su contenido.

Ejemplo 1

IA Extracción de la corteza de plátano

Se procede suspender 4500 g de cortezas de plátano, en polvo (molidas mediante un molino de aserradero), en 15 l de metanol, y a cocerlas, a reflujo, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. La suspensión, se filtra a una temperatura de aproximadamente 50°C y, el extracto en metanol, se concentra por evaporación, a un 50% de su volumen (7,54 l). El extracto concentrado, se enfría a una temperatura de 5°C, se separa por filtración, y se lava con 2 l de metanol frío. El residuo, se seca, al vacío, a una temperatura de 50°C.

Se obtienen 104 g de ácido betulínico como un polvo incoloro (2,3%, calculado sobre cáscaras o corteza de plátano). HPLC: 90,6%.

IB Extracción mediante agitación, con disolvente no polar

Se procede a suspender 93 g de ácido betulínico, obtenidos según el ejemplo 1A, en 600 ml de n-hexano, y se cuecen, a reflujo, durante un transcurso de tiempo de 1 hora. La suspensión, se absorbe mediante un filtro de vacío, se vuelve a lavar con 300 ml de n-hexano caliente y, el residuo, se seca a una temperatura de 40°C, al vacío.

ES 2 335 654 T3

Se obtienen 89,5 g (96,2%) de ácido betulínico, como una materia en polvo, incolora. HPCL: 94,75%.

De una forma análoga, pueden también aplicarse ciclohexano, metilciclohexano o mezclas de estos disolventes.

5 IC *Recristalización en etanol*

Se procede a calentar 89 g de ácido betulínico obtenidos según el ejemplo 1B, se calientan a reflujo, en 4 l de etanol, y se disuelven. Se añaden 40 g de carbón activo, y se filtran en caliente, a través de un filtro de vacío. Después de enfriarse a la temperatura ambiente, se establece la cristalización. La mezcla, se enfría a una temperatura de 5°C, se
10 succiona, y se vuelve a lavar con 500 ml de etanol frío. Se obtienen 63,5 g (71,3 g) de ácido betulínico cristalino, los cuales se solvatan con 1 mol de etanol. HPLC: 93,8% (porcentaje de superficie 100%). Punto de fusión = 296-298°, $[\alpha]_D = +8$, $c = 0,9$ en piridina.

15 ID *Procesado de la lejía madre*

Se procede a concentrar, por evaporación, al vacío, 4 l de la lejía etanólica madre y de lavado, obtenidas según el ejemplo 1C, para llegar a una concentración de 1 l, se succiona a una temperatura de 5°C, y se lava con etanol.

20 Se obtienen 20 g (22,5%) de ácido betulínico. HPLC: 96,5%.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento mejorado para la obtención de ácido betulínico cristalino, de alta pureza, a partir de un extracto metanólico de corteza de plátano y/o cáscara de plátano, mediante la concentración por evaporación del extracto, y cristalización en un alcohol, **caracterizado** por el hecho de que,

a) la corteza o cáscara de plátano molida, se extrae de una vez, con una cantidad de 2 a 5 veces de metanol, durante un transcurso de tiempo de 0,5 a 5,0 horas, mediante calentamiento hasta la ebullición, se filtra el extracto obtenido, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 40 y 60°C, se concentra, por evaporación hasta un 30 a un 70% de su volumen, y se cristaliza a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre -10 y +10°C.

b) se realizan, una después de otra, las siguientes etapas, para el lavado y el aislamiento del residuo del extracto metanólico.

(i) Calentamiento del residuo, en un diluyente no polar;

(ii) Separación del residuo, del diluyente;

(iii) Calentamiento del residuo en etanol, aclarado de la fase etanólica mediante la adición de carbón activo y separación del carbón activo, de la fase etanólica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 60 y 95°C; y

(iv) Cristalización y separación del ácido betulínico, de la fase etanólica.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que, se procede a incorporar el residuo del extracto metanólico en una cantidad de 2 a 8 veces de un hidrocarburo alifático, de una forma preferible, n-hexano, y se calienta la mezcla hasta la ebullición.

3. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** por el hecho de que, en la etapa (ii), se procede a separar el residuo, mediante centrifugación o mediante filtrado por succión, del diluyente.

4. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, en la etapa (iii), se procede a incorporar el residuo en una cantidad de 20 a 100 veces, de etanol, y se calienta hasta la ebullición.

5. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por el hecho de que, en la etapa (iv), la fase etanólica, se enfría a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de -10 hasta +10°C, enfriándose, de una forma preferible, a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 0 a +5°C, se separa el ácido betulínico precipitado mediante centrifugación o mediante filtrado por succión, y se seca.

6. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por el hecho de que, el ácido betulínico obtenido, se encuentra a disposición como monoetanolato.

7. Ácido betulínico cristalino, de alta pureza, **caracterizado** por el hecho de que, éste, se solvata con un equivalente de etanol.

8. Ácido betulínico cristalino, de alta pureza, según la reivindicación 7, de la fórmula

