



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 531**

51 Int. Cl.:
C07D 498/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07753283 .6**

96 Fecha de presentación : **15.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1896488**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2008**

54 Título: **Procedimiento para purificar tacrólimo.**

30 Prioridad: **15.03.2006 US 782753 P**
25.09.2006 US 847323 P
20.11.2006 US 860359 P
13.12.2006 US 874823 P
10.01.2007 US 879869 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.08.2010

73 Titular/es: **TEVA Gyógyszergyár Zártkörűen
Működő Részvénytársaság**
Pallagi ut 13
4042 Debrecen, HU

72 Inventor/es: **Cvak, Ladislav;**
Buchta, Martin;
Jegorov, Alexandr;
Blatny, Pavel;
Keri, Vilmos;
Csorvasi, Andrea;
Simon, Angela y
Mako, Gyorgyne

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 344 531 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

Procedimiento para purificar tacrólimo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de tacrólimo.

Antecedentes de la invención

10

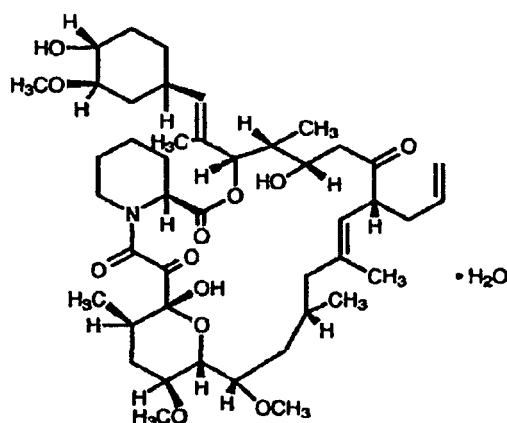
El tacrólimo, [3*S*-[3*R*[*E*(1*S*,3*S*,4*S*)], 4*S*, 5*R*, 8*S*, 9*E*,12*R*, 14*R*, 15*S*, 16*R*, 18*S*, 19*S*, 26*aR*]]-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26*a*-hexadecahidro-5,19-dihidroxi-3-[2-(4-hidroxi-3-metoxiciclohexil)-1-metiletetil]-14,16-dimetoxi-4,10,12,18-tetrametil-8-(2-propenil)-15,19-epoxi-3*H*-pirido[2,1-*c*][1,4]oxaazaciclotricosina-1,7,20,21(4*H*,23*H*)-tetrona, monohidratado (conocido anteriormente como FK506), presenta un peso molecular de 822,05, la fórmula $C_{44}N_6O_{12}H_2O$, y la fórmula estructural

15

20

25

30



35

40

El tacrólimo es un macrólido inmunosupresor natural producido por *Streptomyces tsukubaensis*. Es comercializado bajo la denominación PROGRAF® por Fujisawa, y está disponible para administración oral en cápsulas (cápsulas de tacrólimo). El tacrólimo prolonga la supervivencia del hospedador y del injerto trasplantado en modelos de trasplante animal de hígado, riñón, corazón, médula ósea, intestino delgado y páncreas, pulmón y tráquea, piel, córnea y extremidades inhibiendo la activación de linfocitos T. En animales, se ha demostrado que el tacrólimo suprime alguna inmunidad humoral y, en mayor medida, las reacciones mediadas por células, tal como el rechazo del alotrasplante, la hipersensibilidad de tipo retardado, la artritis inducida por colágeno, la encefalomielitis alérgica experimental y la enfermedad de injerto contra hospedador.

45

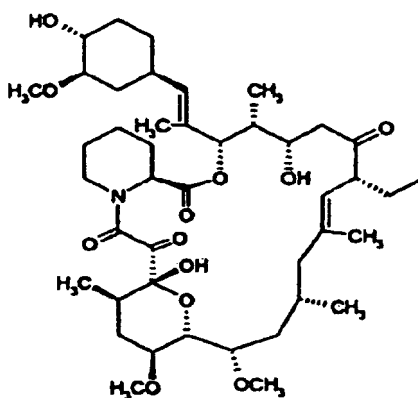
El tacrólimo fue descrito por primera vez en la patente US n° 4.894.366 y en la patente europea EP 0 184 162. Cuando se prepara tacrólimo, se obtienen también dos análogos de tacrólimo, que son impurezas: La ascomicina, que presenta la fórmula estructural

50

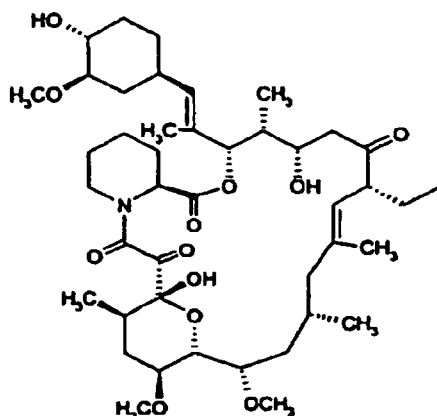
55

60

65



y el dihidrotacrólino, que presenta la formula estructural



La separación del tacrólino de estas impurezas por procedimientos convencionales, tales como cristalización, es difícil debido a la similitud estructural. Por consiguiente, se necesita una purificación por cromatografía en columna. La eficacia de la purificación puede mejorarse utilizando iones plata en la cromatografía en columna. Los iones plata interactúan con el doble enlace de la cadena lateral de alilo que está presente en el tacrólino, pero que no está presente en la ascomicina y en el dihidrotacrólino en los que la cadena lateral es un grupo alquilo. En la ascomicina la cadena lateral es un grupo etilo, y, en el dihidrotacrólino, la cadena lateral es un grupo propilo. Como resultado, el enlace entre el tacrólino y la fase estacionaria o con la fase móvil está reforzado, y, de este modo, la diferencia en el tiempo de la retención del tacrólino comparado con el tiempo de retención de sus análogos aumenta.

La patente US nº 6.492.513 da a conocer la separación del tacrólino de sus impurezas utilizando una resina de intercambio catiónico fuerte pretratada con iones plata que contiene grupos de ácido sulfónico, y un eluyente de acetona o acetato de etilo y metanol. Como el tacrólino es sensible a la resina de intercambio expuesta, cabría esperar la contaminación del tacrólino.

Las patentes US nº 6.576.135 y nº 6.881.341 dan a conocer un procedimiento de cromatografía en columna de dos etapas para la separación del tacrólino de las impurezas, particularmente del análogo tacrólino-desmetil. Una etapa dada a conocer implica la adsorción de una mezcla que contiene tacrólino en una resina de adsorción no iónica, y la emulsión con disolvente acuoso que contiene iones plata. La otra etapa dada a conocer implica la adsorción de la mezcla en una alúmina básica activa y la elución con un disolvente orgánico para realizar la separación. La utilización de agua en el eluyente da como resultado la formación de isómeros de tacrólino, contaminando con ello el tacrólino. Además, la utilización de un eluyente que contiene iones plata libres requiere la separación de los iones de plata del eluyente en el tacrólino después de la elución de la columna.

La publicación de la solicitud de patente internacional WO 05/054253 da a conocer la separación cromatográfica de tacrólino utilizando gel de sílice, opcionalmente, ya sea en cromatografía en fase inversa o pretratado con plata, después del tratamiento con gas amoníaco para eliminar las impurezas. El eluyente dado a conocer era una mezcla de n-butanol, acetonitrilo y un tampón para la separación en fase inversa, y una mezcla de acetato de etilo y hexano para la separación en gel de sílice tratada con plata.

La publicación de la solicitud de patente internacional WO 05/098011 da a conocer una separación de tacrólino de las impurezas por cromatografía en gel de sílice, donde el gel de sílice se pretrata opcionalmente con plata. Opcionalmente, el tacrólino se purifica más por cromatografía en fase inversa utilizando sílice sin tratar. Para la cromatografía en fase inversa se ilustra una columna C-8. Los eluyentes presentados incluyen acetato de etilo en hexano para la columna tratada con plata y una mezcla de acetonitrilo, n-butanol y tampón para la separación en fase inversa.

La publicación de la solicitud de patente internacional WO 05/010015 da a conocer la separación utilizando una resina de absorción no iónica sin plata y con un eluyente que contiene THF o acetonitrilo, agua, y, opcionalmente, un disolvente orgánico adicional.

Resulta necesario en la técnica un procedimiento para purificar el tacrólino, particularmente de ascomicina y de dihidrotacrólino que sería adecuado para su utilización a escala industrial. La presente invención proporciona dicho procedimiento.

Sumario de la invención

En una forma de realización la presente invención proporciona un procedimiento para separar tacrólino de las impurezas que comprende: a) cargar una mezcla compuesta por tacrólino e impurezas en un lecho de adsorbente

ES 2 344 531 T3

pretratado con iones plata, en la que el adsorbente es gel de ciano sílice; y b) eluir la mezcla procedente del lecho de resina adsorbente para separar el tacrólimo de las impurezas presentes en la mezcla.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 presenta el análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 2.
La figura 2 presenta el análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 5.
10 La figura 3 presenta el análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 21.
La figura 4 presenta el análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 25.
15 La figura 5 presenta el análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo comparativo 23.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación cromatográfica de tacrólimo utilizando un adsorbente pretratado con iones plata para la fase estacionaria (“adsorbente modificado con plata”), en el que el adsorbente es gel de ciano sílice. El procedimiento de la invención es particularmente útil para la separación de tacrólimo de la ascomicina y del dihidrotacrólino.

25 El procedimiento de la invención es adecuado para su utilización industrial. Puede llevarse a cabo con un eluyente que no contiene agua ni/o iones plata, y proporciona una separación más eficaz del tacrólimo del dihidrotacrólino y la ascomicina. Un eluyente que no contiene agua evita la contaminación del tacrólimo facilitando la formación de sus isómeros. Además, evitando la utilización de iones plata en el eluyente, la contaminación del producto final con iones plata se reduce sustancialmente. La utilización de una resina ácida fuerte, a la que el tacrólimo es sensible, y la utilización de la cromatografía en dos etapas, puede evitarse también en el procedimiento de la presente invención.
30

El tacrólimo, que está presente en una mezcla con impurezas, se carga en el adsorbente modificado con plata. La carga puede realizarse, por ejemplo, disolviendo la mezcla en un disolvente, preferentemente una cantidad mínima de disolvente, que permite la disolución, y cargando la solución en el adsorbente modificado con plata como solución concentrada. Una cantidad mínima de disolvente puede ser de aproximadamente 2 veces del volumen de la mezcla de disolvente calculado para la masa de tacrólimo de partida. El disolvente en el que se disuelve la mezcla puede ser el mismo que el utilizado durante la elución. A continuación se proporcionan ejemplos de dichos disolventes. La mezcla puede cargarse también de otras maneras incluyendo como aceite o como residuo sólido obtenido de la evaporación de una solución no concentrada de la mezcla.
35
40

La mezcla compuesta de tacrólimo se eluye a continuación con un disolvente o disolventes procedentes del adsorbente modificado con plata. Preferentemente el disolvente es sustancialmente anhidro. En una forma de realización, se utiliza un eluyente no acuoso que contiene un disolvente orgánico polar seleccionado de entre el grupo constituido por cetona C₃₋₉ lineal o ramificada, éster C₃₋₇ lineal o ramificado, alcohol C₁₋₇ lineal o ramificado, éter C₂₋₈ lineal, ramificado o cíclico, nitrilo C₂₋₅ y mezclas de los mismos, o una mezcla de un disolvente orgánico polar y un disolvente orgánico apolar seleccionado entre el grupo constituido por hidrocarburo C₅₋₈ lineal, ramificado o cíclico, hidrocarburo aromático C₆₋₁₀ y mezclas de los mismos. Los eluyentes son preferentemente anhidros, es decir, exentos de agua, o tienen un contenido en agua que es suficientemente bajo para evitar la formación de isómeros de tacrólimo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “anhidro” se refiere a los eluyentes que están exentos de agua, excepto, posiblemente, como impureza en pequeña cantidad que es insuficiente para producir la formación de una cantidad detectable de isómeros de tacrólimo. Preferentemente, el eluyente contiene menos del 2% en peso, más preferentemente, menos del 1% en peso, aún más preferentemente, menos del 0,05% en peso de agua.
45
50

Preferentemente, la cetona C₃₋₉ lineal o ramificada es acetona, metiletil-cetona o metilisobutil-cetona. Los ésteres C₃₋₇ lineales o ramificados preferidos incluyen el acetato de etilo, acetato de n-propilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo y propionato de etilo. Los alcoholes C₁₋₇ lineales o ramificados preferidos incluyen metanol, etanol isopropanol, n-propanol, n-butanol e isobutanol. Los éteres C₂₋₈ lineales, ramificados o cíclicos preferidos incluyen el éter terc-butilmetílico, éter dietílico, éter diisopropílico y tetrahidrofurano. Un nitrilo C₂₋₅ preferido es el acetonitrilo. Preferentemente, el hidrocarburo C₅₋₈ lineal, ramificado o cíclico es el hexano, heptano, octano, ciclohexano o cicloheptano. Preferentemente, el hidrocarburo aromático C₆₋₁₀ es el tolueno. El disolvente orgánico polar preferido es la acetona. Preferentemente, el eluyente contiene acetona como único disolvente o en una mezcla con otro disolvente, y, más preferentemente, el eluyente contiene acetona y hexano o acetato de etilo.
55
60

Cuando se utiliza una mezcla de acetona y hexano, puede utilizarse por lo menos una de las siguientes relaciones de disolvente: aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:3, aproximadamente 1:4 o aproximadamente 1:9, respectivamente, dependiendo del adsorbente que se utilice. Cuando se utiliza una mezcla de acetato de etilo y acetona, la relación de disolvente es preferentemente aproximadamente 50 a 80% de acetona en volumen, más preferentemente, aproximadamente 30:70 de acetato de etilo a acetona en volumen. Opcionalmente, la elución del tacrólimo comprende
65

ES 2 344 531 T3

un procedimiento de elución de gradiente, partiendo de la elución con una mezcla de disolventes, preferentemente, de acetona y hexano, preferentemente en una relación de aproximadamente 3:2, seguido de la elución con aproximadamente 100 por ciento de un solo disolvente, preferentemente, acetona.

5 Preferentemente, el tipo de proceso de elución se selecciona según la longitud de la columna. Preferentemente, con una columna corta, por ejemplo una columna de aproximadamente 10 cm de longitud, se prefiere la elución por gradiente y con una columna más larga, por ejemplo una columna de aproximadamente 1 m, no se utiliza elución por gradiente.

10 En un procedimiento preferido de la invención, se rellena una columna con un adsorbente modificado con plata, que se lava a continuación con eluyente. Se carga a continuación una solución de tacrólimo en el eluyente, seguido de la elución de tacrólimo, ascomicina y dihidrotacrólino de la columna, y la recuperación y análisis de las muestras obtenidas. El eluyente es preferentemente anhidro.

15 Con el procedimiento de la invención puede purificarse tacrólimo de cualquier pureza, y es el tacrólimo en bruto. El tacrólimo purificado con el procedimiento de la invención puede contener por lo menos una de las siguientes impurezas: ascomicina, por lo general en una cantidad de aproximadamente 0 a 10 por ciento de área por HPLC, y/o dihidrotacrólino, por lo general en una cantidad de aproximadamente 6 por ciento a 0 por ciento de área por HPLC. El tacrólimo en bruto que contiene aproximadamente 7,9 por ciento de área por HPLC de ascomicina y/o
20 aproximadamente 3,8 por ciento de área por HPLC de dihidrotacrólino se ha purificado con el procedimiento de la invención.

El orden de elución depende de la naturaleza del adsorbente y del eluyente. Por lo general, la ascomicina y el dihidrotacrólino se eluyen antes que el tacrólimo, ya que el tacrólimo, tiene una mayor afinidad al adsorbente modificado con plata.
25 con plata.

El gel de ciano-sílice utilizado para la preparación del gel de ciano-sílice modificado con plata puede ser un adsorbente comercial o puede prepararse por tratamiento del gel de sílice con tricloro-3-cianopropilsilano, produciendo gel de sílice unido de manera covalente en su superficie al grupo cianoalquilo.
30

Preferentemente, para una purificación eficaz, el adsorbente tiene un área superficial específica de por lo menos aproximadamente 50 m²/g, más preferentemente, de aproximadamente 50 a 600 m²/g.

35 Preferentemente, el adsorbente modificado con plata se prepara mezclando el adsorbente, una fuente de cationes de plata y un disolvente seleccionado entre el grupo constituido por un alcohol C₁₋₄, agua y una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua y secando la mezcla resultante. Preferentemente, cuando el disolvente es un alcohol C₁₋₄, la fuente de catión plata y el alcohol C₁₋₄ se combinan inicialmente para obtener una solución, y el adsorbente se añade a continuación para obtener una suspensión. La suspensión resultante se seca a continuación, preferentemente en un evaporador rotativo, seguido del secado en una estufa al vacío durante aproximadamente 15 minutos a 5 horas.
40

El alcohol C₁₋₄ comprende preferentemente un solo alcohol o una mezcla de alcoholes. El alcohol C₁₋₄ preferido es el metanol. Preferentemente, cuando el disolvente es un alcohol C₁₋₄, la fuente de ión plata y el alcohol C₁₋₄ se calientan a aproximadamente la temperatura de reflujo del disolvente, para obtener una solución.

45 Puede utilizarse la sal de plata inorgánica o la sal del complejo de plata inorgánico. La sal o el complejo pueden ponerse en contacto con el adsorbente en forma de solución. Las sales de plata preferidas incluyen el acetato de plata, sulfato de plata y nitrato de plata. Los complejos de plata preferidos incluyen un complejo de plata amino, un complejo de plata ciano y un complejo de tiosulfato de plata, y acetato de plata. Más preferentemente, la fuente de plata es el nitrato de plata.
50

El adsorbente puede comprender diferentes cantidades de iones de plata. El adsorbente modificado con plata obtenido después de secar preferentemente contiene aproximadamente 0,1 por ciento a 15 por ciento p/p de sal de plata, y, más preferentemente, aproximadamente 3 por ciento a 13 por ciento p/p de sal de plata.

55 Preferentemente, las fracciones diluidas se recuperan recogiendo grupos de fracciones y evaporando el disolvente, proporcionando así, una muestra. La muestra recuperada se analiza a continuación, preferentemente, por HPLC, proporcionando el contenido de tacrólimo, ascomicina y dihidrotacrólino en la muestra. Por lo general, a medida que avanza el proceso de elución, el nivel de ascomicina y dihidrotacrólino disminuye mientras que el nivel de tacrólimo aumenta. Preferentemente, se repite el proceso de modo que la muestra final contiene sustancialmente tacrólimo
60 puro. Preferentemente, la muestra final contiene por lo menos aproximadamente 93 por ciento de área por HPLC de tacrólimo, más preferentemente, por lo menos aproximadamente 95 por ciento de área por HPLC de tacrólimo, y, aún más preferentemente, por lo menos aproximadamente 99 por ciento de área por HPLC. Preferentemente, la muestra final contiene también menos de aproximadamente 0,20 por ciento de área por HPLC de ascomicina, más preferentemente, menos de aproximadamente 0,09 por ciento de área por HPLC, y, aún más preferentemente, menos de aproximadamente 0,06 por ciento de área por HPLC. Preferentemente, la muestra final contiene también menos de aproximadamente 0,04 por ciento de área por HPLC de dihidrotacrólino, y, más preferentemente,
65 menos de aproximadamente 0,03 por ciento de área por HPLC de dihidrotacrólino.

ES 2 344 531 T3

La columna puede regenerarse y utilizarse para un proceso de purificación adicional.

El tacrólimo eluido puede contener iones plata que salen de la resina; la cantidad de dichos iones plata es sustancialmente inferior que si se utiliza un eluyente que contiene iones plata. El tacrólimo eluido puede separarse de los iones plata evaporando el eluyente para obtener un residuo; disolviendo el residuo en un disolvente orgánico; mezclando con una solución que comprende un reactivo que precipita iones plata; filtrando la sal de plata precipitada. El reactivo puede ser una sal cloruro, tal como cloruro de sodio o de amonio, cuya adición daría como resultado la precipitación del cloruro de plata. Otro procedimiento para la eliminación de los iones plata es pasar el eluido a través de una columna rellena con gel de sílice modificada con cloruro sódico. El gel de sílice modificada con cloruro sódico puede prepararse fácilmente mezclando gel de sílice con la solución acuosa del cloruro sódico.

Típicamente, el disolvente orgánico es un disolvente en el que las sales de plata son inmiscibles. Preferentemente, el disolvente orgánico se selecciona de entre un grupo constituido por: acetato de etilo, tolueno, acetato de isopropilo o normal, acetato de n-butilo, acetato de isobutilo, acetona, metiletil-cetona, metilisobutil-cetona, etanol, propanol, n-butanol, isobutanol, mezclas de acetato de etilo y acetona, mezclas de tolueno y acetona y mezcla de los mismos con agua. Preferentemente, el disolvente es el acetato de etilo.

Preferentemente, el disolvente orgánico está presente en una cantidad aproximadamente dos volúmenes por gramo de residuo a aproximadamente 30 volúmenes por gramo de residuo, más preferentemente, de aproximadamente de 10 a 30.

Típicamente, los reactivos que precipitan iones de plata forman una sal de plata que tiene baja solubilidad en agua y en disolventes orgánicos. Preferentemente, el reactivo incluye un contraión seleccionado de entre un grupo constituido por acetato, sulfato, nitrito, bromato, salicilato, yodato, cromato, carbonato, citrato, fosfato, cloruro, estearato, sulfuro, bromuro, yoduro, cianuro, benzoato, oxalato, sulfito y tiocianato. Más preferentemente, el contraión es carbonato, citrato, fosfato, cloruro, estearato, sulfuro, bromuro, yoduro, cianuro, benzoato, oxalato, sulfito y tiocianato. Más preferentemente, el contraión es carbonato, citrato, fosfato, cloruro, estearato, sulfuro, bromuro, yoduro, cianuro, benzoato, oxalato, sulfito o tiocianato. Más preferentemente, el contraión es el bromuro, yoduro, estearato, sulfuro o cianuro. Preferentemente, el reactivo precipitante es una sal que comprende el contraión. Más preferentemente, el reactivo precipitante es NH_4Cl .

Preferentemente, el reactivo precipitante se añade en una cantidad de 1 a aproximadamente 5 equivalentes molares por equivalente molar de plata, y, más preferentemente, en una cantidad de aproximadamente 1,2 a 4 equivalentes molares por equivalente molar de plata. Preferentemente, la solución del reactivo que precipita iones de plata es una solución acuosa. Preferentemente, la solución acuosa se añade a la solución del residuo en el disolvente orgánico. La adición de la solución acuosa que comprende un reactivo para precipitar plata proporciona un sistema que tiene por lo menos dos fases, incluyendo una fase orgánica, que comprende un disolvente orgánico, una fase acuosa y un precipitado de la sal de plata. Preferentemente, la sal de plata es el cloruro de plata. La sal se filtra a continuación, y el filtrado se somete a la separación de fases, proporcionando una fase orgánica que comprende el tacrólimo eluido, sustancialmente exento de iones de plata. Típicamente, la expresión "exento de", tal como se utiliza en la presente memoria haciendo referencia al tacrólimo se refiere al tacrólimo que contiene menos de 20 ppm de iones plata. Preferentemente, el tacrólimo exento de iones plata contiene menos de 10 ppm de iones plata. La concentración de iones plata puede determinarse por cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia, por ejemplo, por el procedimiento descrito en la US Pharmacopea.

El tacrólimo obtenido directamente de la columna o después de la separación de iones plata puede purificarse más mediante un proceso de cristalización, que comprende preferentemente disolver la muestra final en una mezcla de 2-propanol y n-heptano, seguido de filtración. El filtrado se combina preferentemente a continuación con una mezcla de agua y n-heptano, seguido de enfriamiento para obtener un precipitado. El precipitado se recupera a continuación preferentemente por filtración y lavado con agua y a continuación con n-heptano seguido de secado.

Preferentemente, antes de recuperar el precipitado, el filtrado combinado con la mezcla de disolventes se mantiene durante aproximadamente 24 horas.

La muestra más purificada contiene preferentemente tacrólimo con una pureza mayor que la obtenida con el procedimiento cromatográfico. Por lo general, después de la cristalización, las concentraciones de cualquier resto de ascomicina y dihidrotacrólino disminuyen más, y la concentración de tacrólimo aumenta. Preferentemente, la muestra purificada contiene por lo menos 97 por ciento de área por HPLC de tacrólimo, más preferentemente, por lo menos aproximadamente 99 por ciento de área por HPLC o por lo menos 99,5% y aún más preferentemente, por lo menos 99,9 por ciento de área por HPLC.

Una vez así descrita la invención haciendo referencia a formas de realización preferidas específicas y ejemplos ilustrativos, pueden los expertos en la materia apreciar modificaciones a la invención como las descritas e ilustradas que no se apartan del alcance de la invención tal como se da a conocer en la memoria. Se proporcionan ejemplos no limitativos del alcance la invención para una mayor comprensión de la misma.

ES 2 344 531 T3

Ejemplos

HPLC

5 *Columna:* Waters Symmetry C₁₈ 4,6x150 mm 3,5 µm

Fase Móvil: A: Se pesan 200 ml de acetonitrilo en un matraz volumétrico de 2.000 ml, se rellena el matraz con agua destilada y a continuación se añaden 100 µl de CH₃COOH al 50 por ciento (pH=4,0)

10 B: Se añaden 100 µl de CH₃COOH al 50% a 2.000 ml de acetonitrilo.

TABLA DE GRADIENTE

15

Tiempo (minutos)	Eluyente A (v/v%)	Eluyente B (v/v)
0	58	42
25	58	42
20 35	52	48
45	10	90
46	10	90
25 47	58	42

Caudal: 2,2 ml/min

30 *Longitud de onda de detección:* 200 mg

Volumen de inyección: 20 µl

Diluyente: Acetonitrilo

35 *Temperatura de la muestra:* 20°C

Temperatura de la columna: 60°C

40 *Tiempo de estabilización:* 47 minutos

Tiempo de retención típico: tacrólimo 24,5 min

Tac.I (ascomicina) RRt=0,91

45 Tac.II (dihidotacrólimo) RRt=1,35

Los ejemplos marcados con un asterisco (*) se proporcionan únicamente como referencia.

50 * Ejemplo 1

Preparación de alúmina modificada con nitrato de plata

55 Se disolvió nitrato de plata (10,0 g) en metanol caliente (500 ml), seguido de adición de alúmina (óxido de aluminio básico activo 90, 63 - 200 µm, actividad II - III, fabricado por Merck, 100 g) para obtener una suspensión. La suspensión se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo se secó al vacío (300 mbares) a 70°C durante 5 horas. Contenido en plata: 10 por ciento p/p.

60 * Ejemplo 2

Purificación de tacrólimo en bruto por alúmina modificada con plata, elución isocrática

65 Una columna de vidrio (22 mm de diámetro, 100 mm de altura de lecho, relleno seco) se relleno con alúmina modificada con nitrato de plata (40 g) preparada según el Ejemplo 1, y la columna se lavó con la fase móvil (aproximadamente 200 ml), que contenía 50 por ciento (v/v) de acetona y 50 por ciento (v/v) de n-hexano. tacrólimo en bruto (306 mg), que contenía, según el análisis HPLC, 79,7 por ciento de tacrólimo, 7,9 por ciento de ascomicina y 3,8 por

ES 2 344 531 T3

5 ciento de dihidrotacrólino, se disolvió en la fase móvil (10 ml), y la solución se cargó en la columna. Se eluyó la columna mediante la fase móvil (aproximadamente 20 ml/min) y se recogieron fracciones de 30 ml. Se analizaron las fracciones por HPLC, y el cromatograma reconstruido se presenta en la figura 1. Las primeras cuatro fracciones que representan la ascomicina y el dihidrotacrólino separados, se concentraron a sequedad. El residuo (52 mg) contenía 2,1 por ciento de tacrólino, 31,7 por ciento de dihidrotacrólino, y 63,0 por ciento de ascomicina, según el análisis HPLC. Las tres fracciones intermedias siguientes se concentraron a sequedad (15 mg), y según el análisis HPLC, contenían 37,5 por ciento de tacrólino. Las fracciones posteriores, que contenían tacrólino purificado (15 fracciones), se concentraron proporcionando 223 mg de residuo que se analizó por HPLC, y se demostró que contenían 95,54 por ciento de tacrólino, 0,20 por ciento de ascomicina y 0,04 por ciento de dihidrotacrólino.

* Ejemplo 3

Purificación de tacrólino en bruto por alúmina modificada con plata, elución por gradiente

15 La columna según el Ejemplo 2 se lavó con una fase móvil consistente en 40 por ciento (v/v) de acetona y 60 por ciento (v/v) de n-hexano. El tacrólino en bruto (321 mg, 79,7 por ciento de tacrólino, 7,9 por ciento de ascomicina y 3,8 por ciento de dihidrotacrólino) se disolvió en la fase móvil (10 ml) y a continuación se cargó en la columna. La elución se realizó con la fase móvil (350 ml) que contenía 40 por ciento de acetona y 60 por ciento n-hexano (v/v), y el eluido se concentró a sequedad, proporcionando 59 mg de residuo, que contenía según el análisis HPLC, 3,3 por ciento de tacrólino, 34,5 por ciento de dihidrotacrólino y 67,0 por ciento de ascomicina. La columna se eluyó a continuación con acetona (250 ml) y el eluido se concentró para proporcionar 218 mg de residuo seco, que contenía 95,7 por ciento de tacrólino, 0,09 por ciento de ascomicina y 0,03 por ciento de dihidrotacrólino.

* Ejemplo 4

Purificación de tacrólino en bruto por cromatografía de desplazamiento de tacrólino con alúmina modificada y eluyente acetona

30 Se disolvió tacrólino (3,8 g) en acetona (15,6 ml). La solución se pasó a través de un lecho adsorbente de alúmina modificada con plata (que contenía aproximadamente 10 por ciento de plata p/p), de 85 cm de altura que se colocó en una columna de vidrio, que tiene un diámetro 3,2 cm. La columna se eluyó a continuación con acetona. El ritmo de elución fue de 30 ml/hora. Una fracción contenía 0,3 por ciento de dihidrotacrólino, 0,45 por ciento de ascomicina y 93,0 por ciento de tacrólino.

* Ejemplo 5

Purificación de tacrólino en bruto por cromatografía de desplazamiento de tacrólino con alúmina modificada y eluyente acetona

45 El tacrólino en bruto (2 g) que contenía, según el análisis HPLC, 1,2 por ciento de ascomicina y 1,8 por ciento de dihidrotacrólino, se disolvió en acetona (20 ml). La solución se pasó a través de un lecho adsorbente de alúmina modificada con plata (200 g, que contenía aproximadamente 10 por ciento de plata p/p). El lecho adsorbente se eluyó a continuación con acetona, se recogieron fracciones de 50 ml y se analizaron por HPLC. El cromatograma reconstruido se presenta en la figura 2. Las primeras tres fracciones que contenían macrólidos se concentraron proporcionando 0,41 g de residuo seco, que contenía, según el análisis HPLC 6,1 por ciento de ascomicina y 9,4 por ciento de dihidrotacrólino. Las siguientes siete fracciones se concentraron proporcionando 1,53 g de residuo seco que contenía, según el análisis HPLC 0,18 por ciento de ascomicina y 0,06 por ciento de dihidrotacrólino.

* Ejemplo 6

Purificación de tacrólino en bruto por cromatografía de desplazamiento de tacrólino con alúmina modificada y mezcla eluyente acetona:hexano

60 Se disolvió tacrólino (3,8 g) en acetona (15,6 ml). La solución se pasó a través de un lecho adsorbente de alúmina activada neutra modificada con plata (que contenía aproximadamente 10 por ciento de plata p/p), de 85 cm de altura que se colocó en una columna de vidrio de 3,2 cm de diámetro. El lecho adsorbente se eluyó a continuación con acetona y acetato de etilo en un proporción acetona:acetato de etilo de 70:30. El ritmo de elución fue de 90 ml/hora. Una fracción contenía 0,07 por ciento de dihidrotacrólino, 0,39 por ciento de ascomicina y 94,7 por ciento de tacrólino.

65

ES 2 344 531 T3

* Ejemplo 7

Preparación de alúmina ácida activa modificada con nitrato de plata

5 Se disolvió nitrato de plata (75,0 g) en metanol caliente (1.400 ml), seguido de adición de alúmina (óxido de aluminio ácido activo 90, 63 a 200 μm , actividad I, fabricado por Merck, 750 g) para obtener una suspensión. La suspensión se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo se secó al vacío. El residuo tenía un contenido en plata del 10 por ciento p/p.

10 * Ejemplo 8

Purificación de tacrólimo por cromatografía con alúmina ácida activa modificada con plata

15 Tacrólimo (6,0 g) que contenía, según el análisis HPLC 1,03 por ciento de ascomicina y 1,85 por ciento de dihidrotacrólino, se disolvió en una mezcla disolvente (24 ml) de acetona y acetato de etilo en una proporción acetona:acetato de etilo de 70:30. La solución se pasó a través de un lecho adsorbente de alúmina ácida activa modificada con plata (que contenía aproximadamente 10 por ciento de plata p/p), que tiene una altura de 85 cm que se colocó en una columna de vidrio de 3,2 cm de diámetro. La columna se eluyó a -5°C con acetona y acetato de etilo en una proporción de acetona:acetato de etilo de 70:30. El ritmo de elución fue de 90 ml/hora. Se recogieron las fracciones y se analizaron por HPLC. La principal fracción seleccionada se evaporó y se cristalizó. Según el análisis HPLC el producto contenía 20 96,25 por ciento de tacrólimo, 0,22 por ciento de ascomicina y 0,04 por ciento de dihidrotacrólino.

25 * Ejemplo 9

Cristalización de tacrólimo

El residuo seco obtenido por evaporación de las fracciones de tacrólimo después de la cromatografía en una alúmina modificada con plata (55,3 g) se disolvió en una mezcla de 2-propanol (150 ml) y n-heptano (150 ml), seguido de 30 filtración de la solución. El filtrado se diluyó a continuación con agua (250 ml) y n-heptano (250 ml), y la mezcla resultante se enfrió y se agitó durante 24 horas. Se filtró el producto cristalino precipitado, se lavó con agua y n-heptano y se secó. Se obtuvieron 47,8 g de tacrólimo cristalino. Según el análisis HPLC el producto contenía 99,1 por ciento de tacrólimo, 0,33 por ciento de tautómero II de tacrólimo, 0,18 por ciento de tautómero I de tacrólimo, 0,11 por ciento de ascomicina y 0,04 por ciento de dihidrotacrólino.

40 * Ejemplo 10

Modificación de alúmina activada

Se disolvió nitrato de plata (20 g) en metanol caliente (650 ml). Se añadió óxido de aluminio (750 g) (neutro activado, Merck 0,063-0,200 mm, etapa I de actividad) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad. El contenido en plata de la suspensión seca fue de 2,5 por ciento p/p.

45 * Ejemplo 11

Modificación de gel de sílice en fase inversa

50 Se disolvió nitrato de plata (20 g) en metanol caliente (650 ml). Se añadió gel de sílice en fase inversa (330 g) (LiChroprep RP-18, Merck) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad.

55 * Ejemplo 12

Modificación de la resina de adsorción

60 Se disolvió nitrato de plata (30 g) en metanol caliente (650 ml). Se añadió la resina de adsorción XAD 1180 (650 g) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad.

* Ejemplo 13

65 *Modificación de la resina de adsorción*

Se disolvió nitrato de plata (30 g) en metanol caliente (650 ml). Se añadió la resina de adsorción SP 207 (650 g) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad.

ES 2 344 531 T3

* Ejemplo 14

Modificación de la resina de adsorción que tiene tamaño de partícula pequeño

5 Se disolvió nitrato de plata (30 g) en metanol caliente (650 ml). Se añadió la resina de adsorción Amberchrom GC 300 M (650 g) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad.

10 * Ejemplo 15

Modificación de la resina de adsorción que tiene tamaño de partícula pequeño

15 Se disolvió nitrato de plata (30 g) en metanol caliente (650 ml) calentando a la temperatura de reflujo. Se añadió la resina de adsorción Amberchrom GC 300 S (650 g) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad.

* Ejemplo 16

20 *Modificación de la resina del intercambiador catiónico*

25 Se disolvió nitrato de plata (30 g) en metanol caliente (650 ml). Se añadió la resina del intercambiador catiónico SK 104 (650 g) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad.

* Ejemplo 17

30 *Modificación de la resina del intercambiador aniónico*

35 Se disolvió nitrato de plata (30 g) en metanol caliente (650 ml). Se añadió la resina del intercambiador aniónico IRA 68 (650 g) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad.

35 * Ejemplo 18

Modificación de gel de sílice en fase inversa

40 Se disolvió nitrato de plata (20 g) en agua (500 ml) a temperatura ambiente. La solución concentrada de amoníaco de 40 ml se añadió a la solución de nitrato de plata en varias porciones en presencia de gel de sílice en fase inversa de 330 g (LiChroprep RP-18, Merck). La solución se concentró minuciosamente a alto vacío hasta sequedad.

45 * Ejemplo 19

Modificación de la resina del intercambiador aniónico

50 Se disolvió nitrato de plata (30 g) en metanol caliente (650 ml). Se añade la resina del intercambiador aniónico IRA 900 (650 g) en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se concentró a presión reducida hasta sequedad.

Ejemplo 20

55 *Gel de ciano-sílice modificado con nitrato de plata*

60 Se disolvió nitrato de plata (10,0 g) en metanol caliente (500 ml) y gel de ciano-sílice (gel de sílice 100 CN, 15-35 μm , fabricado por Fluka, 100 g) se añadió en la solución para obtener una suspensión. La suspensión se evaporó a sequedad en un evaporador rotativo. El residuo se secó al vacío (30 mbares) a 70°C durante 5 horas.

Ejemplo 21

65 *Purificación de tacrólimo en bruto mediante gel de ciano-sílice modificado con plata*

Se rellenó una columna cromatográfica (25 mm de diámetro, 250 mm de longitud) con el adsorbente preparado en el Ejemplo 20 (54,4 g), y la columna se lavó con la fase móvil (mezcla de acetona y n-hexano 25:75, 1.000 ml). A continuación se disolvió en la fase móvil (25 ml) tacrólimo en bruto (510 mg) (79,7 por ciento de tacrólimo, 7,9 por ciento

ES 2 344 531 T3

de ascomicina y 3,8 por ciento de dihidrotacrólímo), se cargó en la columna y la columna se eluyó con la fase móvil. Se tomaron fracciones de 100 ml cada una y se analizaron por HPLC. El cromatograma reconstruido está en la figura 3.

5 Ejemplo 22

Gel de sílice modificado con nitrato de plata

10 Se disolvió nitrato de plata (10,0 g) en metanol caliente (500 ml) y gel de sílice (gel de sílice 60, 15-40 μm , fabricado por Merck, 100 g) se añadió a la solución, para obtener una suspensión. La suspensión se evaporó a sequedad en un evaporador rotativo. El residuo se secó al vacío (30 mbares) a 70°C durante 8 horas.

Ejemplo comparativo 23

15

Purificación de tacrólímo en bruto mediante gel de sílice modificado con plata

Se rellenó una columna cromatográfica (25 mm de diámetro, 250 mm de longitud) con el adsorbente preparado en el Ejemplo 26 (62,6 g), y la columna se lavó con la fase móvil (mezcla de acetona y n-hexano 20:80, 1.000 ml). A continuación se disolvió en la fase móvil (25 ml) tacrólímo en bruto (500 mg) (79,7 por ciento de tacrólímo, 7,9 por ciento de ascomicina y 3,8 por ciento de dihidrotacrólímo), se cargó en la columna y la columna se eluyó con la fase móvil. Se tomaron fracciones de 100 ml cada una y se analizaron por HPLC. El cromatograma reconstruido está en la figura 5.

25 * Ejemplo 24

Óxido de circonio modificado con nitrato de plata

30 Se disolvió nitrato de plata (20,0 g) en metanol caliente (1.000 ml) y se añadió a la solución óxido de circonio (fabricado por Merck, 200 g), para obtener una suspensión. La suspensión se evaporó a sequedad en un evaporador rotativo. El residuo se secó al vacío (30 mbares) a 70°C durante 5 horas.

35 * Ejemplo 25

Purificación de tacrólímo en bruto mediante óxido de circonio modificado con plata

40 Se rellenó una columna cromatográfica (25 mm de diámetro, 250 mm de longitud) con el adsorbente preparado en el Ejemplo 24 (345 g) (se repitió la preparación del adsorbente), y la columna se lavó con la fase móvil (aproximadamente 1.000 ml) (mezcla de acetona y n-hexano 10:90). A continuación, se disolvió en la fase móvil (25 ml) tacrólímo en bruto (210 mg) (79,7 por ciento de tacrólímo, 7,9 por ciento de ascomicina y 3,8 por ciento de dihidrotacrólímo), se cargó en la columna y la columna se eluyó con la fase móvil. Se recogieron fracciones de 100 ml cada una y se analizaron por HPLC. El cromatograma reconstruido está en la figura 4.

45

* Ejemplo 26

Separación de tacrólímo de iones plata

50 La principal fracción seleccionada recogida según los Ejemplos 6 y 8 se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (20 veces el volumen del residuo). Se disolvió NH_4Cl (1,3 veces la masa del residuo) en agua (5 veces el volumen del residuo) y la solución salina se añadió a la solución de acetato de etilo. Tras 30 minutos de agitación se filtró el cloruro de plata precipitado y se separaron las fases. Se cristalizó el macrólido en la fase de acetato de etilo.

55

* Ejemplo 27

Separación de tacrólímo de los iones plata

60

El eluido de la columna se observó que contenía aproximadamente 80 mg/l de plata. El eluido se pasó a través de una columna rellena con un gel de sílice modificado con cloruro sódico. La plata se retuvo completamente en la columna. El contenido en plata fue inferior a 10 ppm. La gel de sílice modificada se preparó añadiendo una solución acuosa de cloruro sódico a un gel de sílice seguido de homogeneización.

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para separar tacrólimo de las impurezas que comprende:

- 5 a) cargar una mezcla compuesta de tacrólimo e impurezas en un lecho de adsorbente pretratado con iones plata, en el que el adsorbente es gel de ciano sílice; y
- 10 b) eluir la mezcla del lecho de resina adsorbente para separar el tacrólimo de las impurezas presentes en la mezcla.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla se eluye con un eluyente anhidro, en el que el eluyente anhidro presenta preferentemente menos de aproximadamente 2% de agua en volumen.

15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las impurezas son la ascomicina y el dihidrotacrólimo.

20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el eluyente anhidro se selecciona de entre el grupo constituido por disolventes orgánicos polares y mezclas de disolventes orgánicos polares y disolventes orgánicos apolares.

25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el disolvente orgánico polar se selecciona de entre el grupo constituido por cetonas C₃₋₉ lineales o ramificadas, ésteres C₃₋₇ lineales o ramificados, alcoholes C₁₋₇ lineales o ramificados, éteres C₂₋₈ lineales, ramificados o cíclicos, nitrilos C₂₋₅ y mezclas de los mismos.

30 6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el disolvente orgánico polar se selecciona de entre el grupo constituido por hidrocarburo C₅₋₈ lineal, ramificado o cíclico, hidrocarburo aromático C₆₋₁₀ y mezclas de los mismos.

35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el eluyente se selecciona de entre el grupo constituido por acetona, metiletil-cetona, metilisobutil-cetona, acetato de etilo, acetato de n-propilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo, propionato de etilo, metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol, isobutanol, éter terc-butilmetílico, éter dietílico, éter diisopropílico, tetrahidrofurano acetonitrilo, tolueno, y hexano lineal, ramificado o cíclico, heptano, octano, ciclohexano y cicloheptano.

40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el eluyente anhidro comprende acetona, hexano o acetato de etilo.

45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el eluyente anhidro comprende acetona y hexano, en el que la acetona y el hexano están presentes en una relación de acetona a hexano de aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:3, aproximadamente 1:4 o aproximadamente 1:9.

50 10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el eluyente es una mezcla de acetona y acetato de etilo, y la acetona y el acetato de etilo están presentes en aproximadamente 50-80% de acetona por volumen comparada con el acetato de etilo.

55 11. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el eluyente anhidro es la acetona.

60 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el que el tacrólimo se eluye con una elución por gradiente, comenzando la elución con una mezcla de disolventes, seguida de la elución con aproximadamente 100 por cien de un solo disolvente, preferentemente en el que la elución por gradiente comprende comenzar la elución con una mezcla que comprende acetona y hexano, seguida de la elución con acetona.

65 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la acetona y el hexano están presentes en una relación de acetona a hexano de aproximadamente 3:2 v/v.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la mezcla se eluye con una elución por gradiente con una columna de aproximadamente 10 cm o menos de longitud.

70 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la mezcla se eluye sin una elución por gradiente con una columna de por lo menos aproximadamente 1 m de longitud.

75 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el procedimiento comprende rellenar una columna con el adsorbente modificado con plata, lavar el adsorbente modificado con plata con un eluyente, cargar una solución de tacrólimo en el eluyente en la columna y eluir el tacrólimo, la ascomicina y el dihidrotacrólimo de la columna.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que por lo menos uno de entre la ascomicina y el dihidrotacrólimo se eluye de la columna antes que el tacrólimo.

ES 2 344 531 T3

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el tacrólimo antes de la separación comprende hasta aproximadamente 10 por ciento de área por HPLC de ascomicina y/o hasta aproximadamente 6 por ciento de área por HPLC de dihidrotacrólino.

5 19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el adsorbente presenta una superficie específica de por lo menos aproximadamente 50 m²/g.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende además preparar el adsorbente modificado con plata en un procedimiento que comprende mezclar el adsorbente, una fuente de cationes de plata, y un disolvente seleccionado de entre el grupo constituido por uno o más alcoholes C₁₋₄, agua y una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua, y secar.

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el gel de ciano sílice comprende un gel de sílice unido de manera covalente en su superficie al grupo cianoalquilo.

22. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el disolvente es un alcohol C₁₋₄, y la fuente de catión plata y el alcohol C₁₋₄ se combinan para formar una solución, y el adsorbente se añade a continuación para formar una suspensión, y preferentemente en el que el alcohol C₁₋₄ es el metanol.

23. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que el disolvente es un alcohol C₁₋₄, y la fuente de ión plata y el alcohol C₁₋₄ se calientan a aproximadamente la temperatura de reflujo del disolvente para obtener una solución.

24. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el disolvente es agua o una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua, el adsorbente es un gel de sílice en fase inversa, la fuente de ión plata se disuelve a temperatura ambiente, y, antes del secado, se añade una solución de amoniaco a la solución de disolvente y fuente de catión plata.

25. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que la fuente de cationes plata es una solución de una sal de plata o de un complejo de plata, y preferentemente en el que la fuente de cationes plata comprende por lo menos uno de entre nitrato de plata y acetato de plata.

26. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que la fuente de cationes plata se selecciona de entre el grupo constituido por nitrato de plata, acetato de plata, sulfato de plata, un complejo plata ciano y un complejo de tiosulfato de plata.

27. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que la fuente de cationes plata comprende un complejo de plata ciano.

28. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el adsorbente modificado con plata, después del secado, comprende aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 por ciento p/p de sal de plata.

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que el tacrólimo separado comprende por lo menos aproximadamente 93 por ciento de área por HPLC del tacrólimo.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que el tacrólimo separado comprende menos de aproximadamente 0,20 por ciento de área por HPLC de ascomicina.

31. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que el tacrólimo separado comprende menos de aproximadamente 0,04 por ciento de área por HPLC de dihidrotacrólino.

32. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, que comprende además separar cualesquier iones de plata eluidos con el tacrólimo procedentes del tacrólimo.

33. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, que comprende evaporar el eluyente para obtener un residuo, disolver el residuo en un disolvente orgánico, mezclar la solución resultante con una solución que comprende un reactivo que precipita iones plata, y filtrar la sal de plata precipitada, en el que el disolvente orgánico es preferentemente seleccionado de entre un grupo constituido por: acetato de etilo, tolueno, acetato isopropilo o normal, acetato de n-butilo, acetato de isobutilo, acetona, metiletil-cetona, metilisobutil-cetona, etanol, propanol, n-butanol, isobutanol, mezclas de acetato de etilo y acetona, mezclas de tolueno y acetona y mezcla de los mismos con agua, y más preferentemente en el que el disolvente orgánico es el acetato de etilo.

34. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que el reactivo comprende un contraión seleccionado de entre un grupo constituido por acetato, sulfato, nitrito, bromato, salicilato, yodato, cromato, carbonato, citrato, fosfato, cloruro, estearato, sulfuro, bromuro, yoduro, cianuro, benzoato, oxalato, sulfito, y tiocianato, y preferentemente en el que el reactivo precipitante es NH₄Cl o cloruro de sodio.

35. Procedimiento según la reivindicación 33, que comprende además la adición del reactivo precipitante en una cantidad de 1 a aproximadamente 5 equivalentes molares por equivalente molar de plata.

ES 2 344 531 T3

36. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que la solución comprende un reactivo que precipita iones plata en una solución acuosa.

5 37. Procedimiento según la reivindicación 33, que comprende pasar el eluido a través de una columna rellena con una mezcla de gel de sílice y un agente de precipitación.

38. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, que comprende además recoger por lo menos una fracción de efluente que presenta tacrólimo.

10 39. Procedimiento según la reivindicación 38, que comprende además la cristalización del tacrólimo separado.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 2

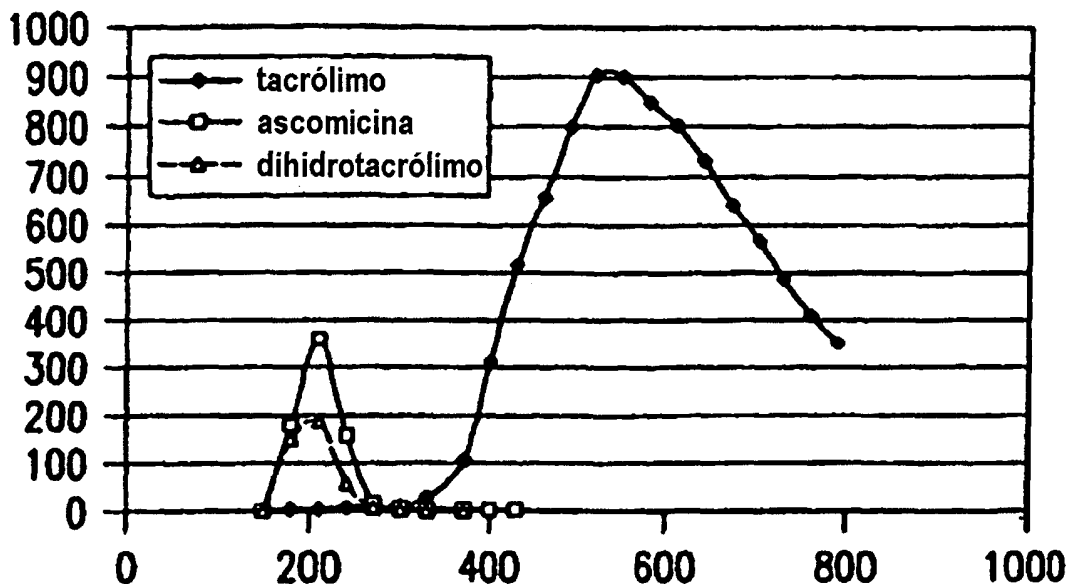


FIG. 1

Análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 5

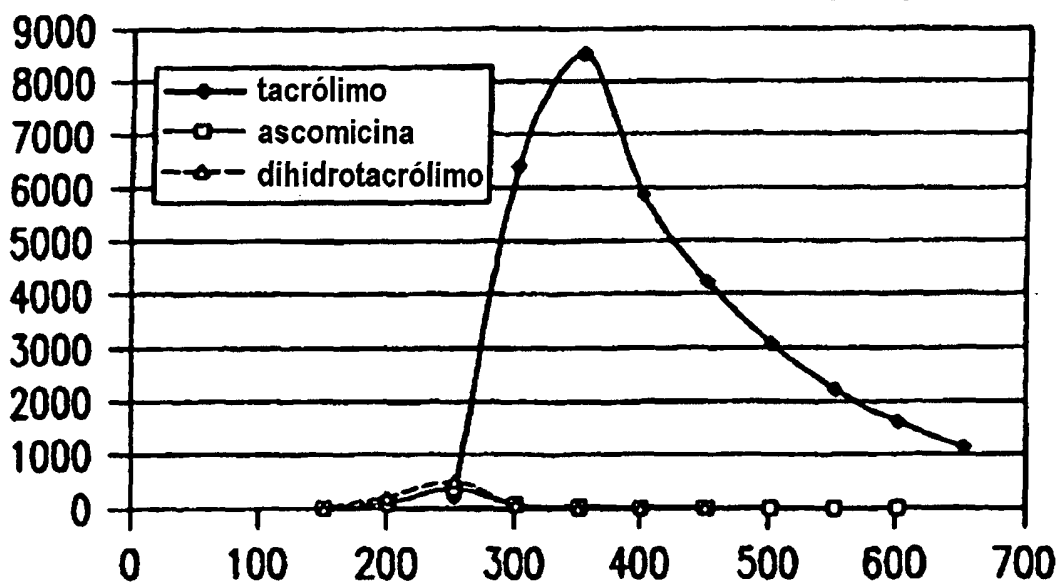


FIG. 2

Análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 21

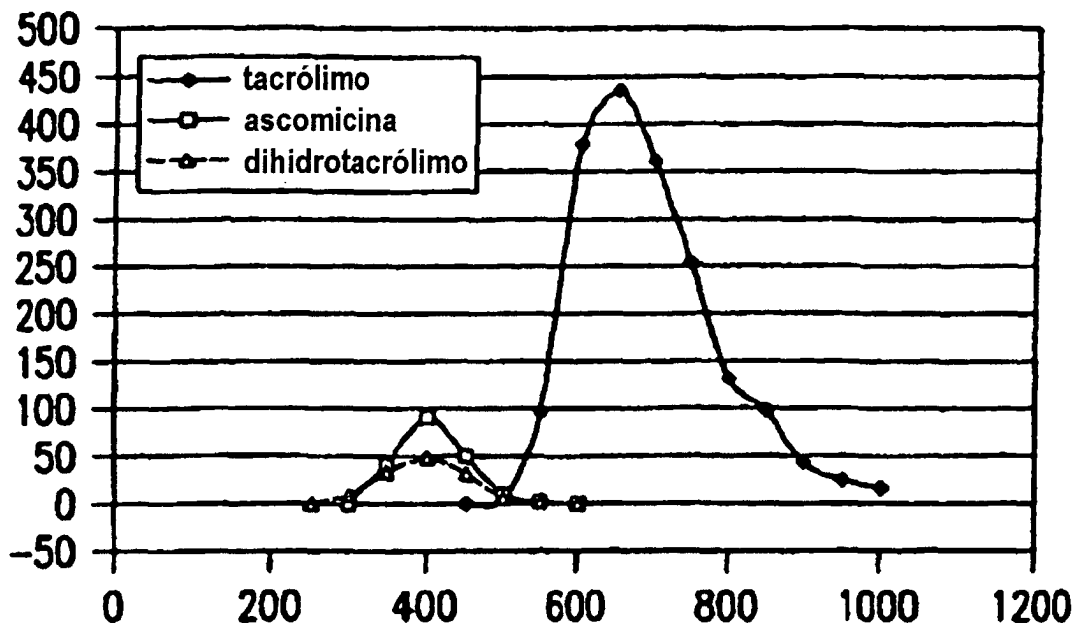


FIG. 3

Análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 25

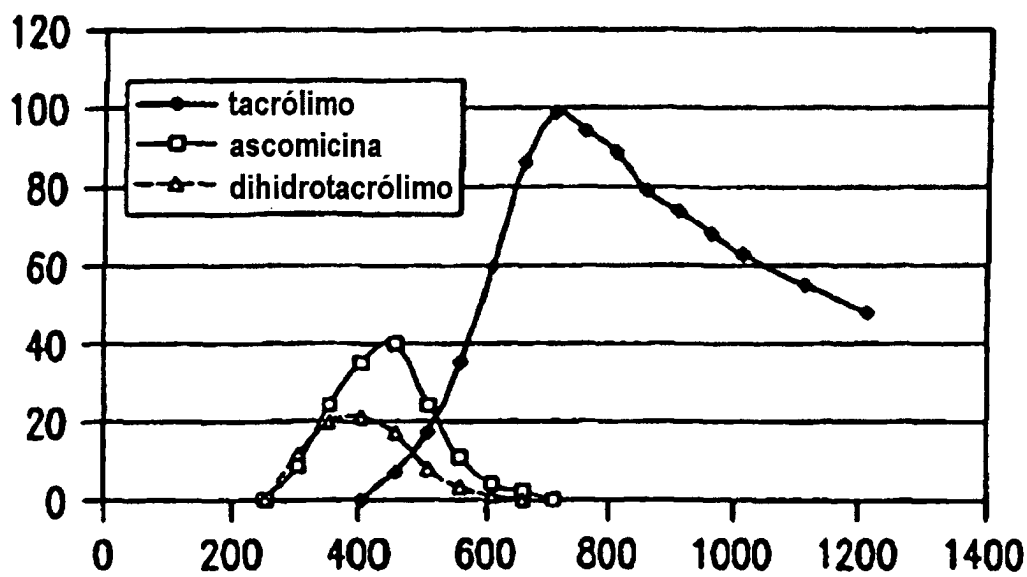


FIG. 4

Análisis de HPLC de las fracciones cromatográficas (mg/l) según el ejemplo 23

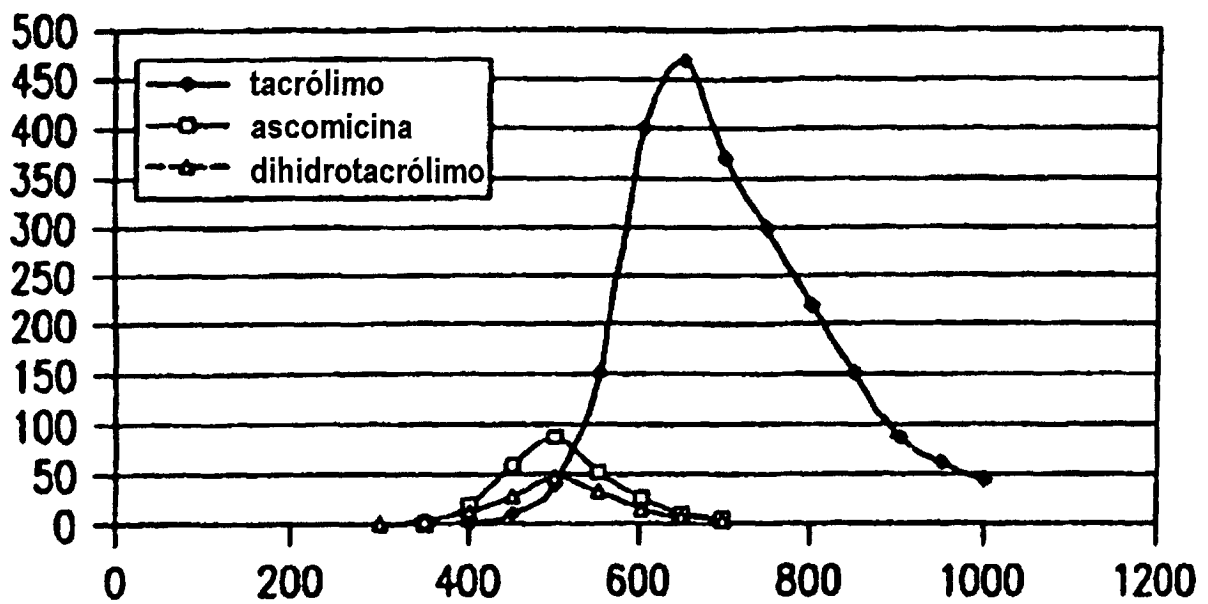


FIG.5