



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 819**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00916011 .0**

86 Fecha de presentación : **02.03.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1155034**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2001**

54 Título: **Formación e intercambio aniónico de sales de amonio internas cristalinas de equinocandina.**

30 Prioridad: **03.03.1999 US 123073 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285, US

72 Inventor/es: **Dalder, Brian, Weston;**
Dotlich, Michael, Anthony;
Kallman, Neil, John;
Larsen, Samuel, Dean;
Van den Berghe Snorek, Sharon y
Vicenzi, Jeffrey, Thomas

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 270 819 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

Formación e intercambio aniónico de sales de amonio internas cristalinas de equinocandina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para formación e intercambio aniónico de sales cristalinas de un núcleo de equinocandina, en particular, sales de un núcleo de equinocandina B.

10 **Antecedentes de la invención**

Los ciclopeptidos de equinocandina son productos antifúngicos naturales. En la familia de los ciclopeptidos de equinocandina se incluyen productos naturales tales como equinocandina B (ECB), equinocandina C, aculeacina Ay, mulundocandina, sporiofungin A, neumocandina A₀, WF11899A, y neumocandina B₀. Éstas se producen típicamente cultivando diversos microorganismos. Por ejemplo, equinocandina B se produce a partir de la fermentación del hongo, *Aspergillus nidulans*.

En la búsqueda de materiales más activos, se han modificado los productos naturales en una diversidad de formas. Una de las más comunes ha sido la sustitución de la cadena lateral N-acilo en el producto natural para producir un derivado semi-sintético. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. N^{os} 4.293.489; 4.320.052; 5.166.135; y 5.541.160; y EP 359529; 448353; 447186; 462531; y 561639 describen una diversidad de compuestos derivados de N-acilo de equinocandina con grados variables de actividad antifúngica.

Los derivados de N-acilo se producen desacilando el producto natural y realizando a continuación reacilación con un grupo acilo diferente. La desacilación se consigue típicamente por medio de una enzima (por ejemplo enzima desacilasa). La enzima desacilasa se puede obtener a partir del microorganismo *Actinoplanes utahensis* o especies de *Pseudomonas* (véanse las patentes de EE.UU. N^{os} 4.293.482 y 4.304.716; y EP 460.882). El compuesto desacilado comúnmente se denomina el núcleo del correspondiente producto natural (por ejemplo, el producto desacilado de equinocandina B se denomina núcleo de Equinocandina B (ECBN). Desafortunadamente, los productos tanto acilados como sin acilar son difíciles de purificar debido a su limitada solubilidad y estado amorfo. Además, el compuesto amino libre (por ejemplo ECBN) es generalmente inestable y susceptible de apertura de anillo.

Es bien conocido en la técnica que los materiales cristalinos en general son más fáciles de purificar que sus homólogos amorfos. Por consiguiente, es deseable producir compuestos ciclopeptidos en su estado cristalino para obtener pureza óptima. Dado que la potencia del producto farmacéutico final depende de la pureza de los productos intermedios usados para hacer el producto final, las mejoras en la pureza en cualquier etapa del procedimiento de fabricación son altamente deseables. Idealmente, los contaminantes se retiran en la etapa más temprana posible en el procedimiento de fabricación. Por consiguiente, hay necesidad de un procedimiento que simplifique y mejore la purificación de compuestos ciclopeptidos que contienen un grupo amino libre antes de la posterior unión de un sustituyente de amino.

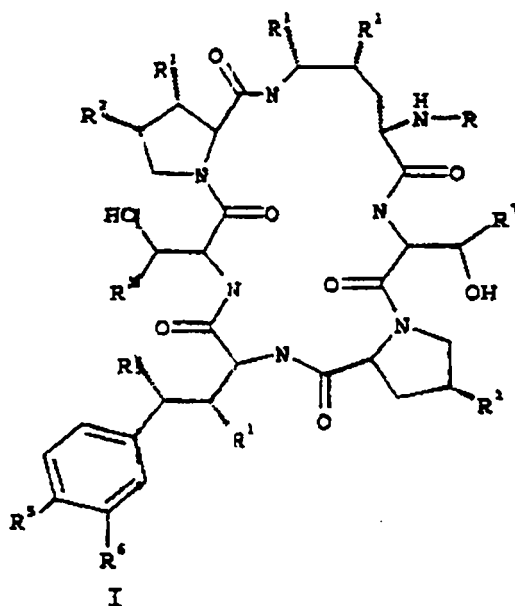
Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para formar una sal cristalina de núcleo de equinocandina B a partir de su caldo de cultivo mixto o de corrientes de proceso parcialmente purificadas por las etapas de (i) concentrar una solución que comprende un núcleo de equinocandina B o sal amorfa de la misma, una impureza de aldehído y un disolvente, por medio de un procedimiento de nanofiltración para formar un concentrado; (ii) añadir un agente que forma un derivado aldehído; (iii) ajustar el pH a un valor menor que 4,0 (preferiblemente entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 3,0); (iv) añadir un ácido o sal metálica; y (v) enfriar el concentrado para cristalizar una sal de núcleo de equinocandina que tiene un anión que corresponde al anión del ácido o sal metálica añadido en la etapa (iv). Se puede añadir opcionalmente un cristal de siembra para iniciar la cristalización.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para intercambiar el anión de la sal de amonio de equinocandina (que incluye derivados sencillos de la misma) así como diversas formas de sales cristalinas de núcleo de equinocandina.

Definiciones

“Compuestos de equinocandina” se refiere a compuestos que tienen la siguiente estructura que incluye cualquier derivado sencillo de la misma:



en la que R es hidrógeno o $-C(O)R'$ en el que R' es un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo heteroarilo; R^1 es $-H$ u $-OH$; R^2 es $-H$, NH_2 o $-CH_3$; R^3 es $-H$, $-CH_3$, $-CH_2CONH_2$ o $-CH_2CH_2NH_2$; R^4 es $-H$ u $-OH$; R^5 es $-OH$, $-OSO_3H$, u OPO_2HR^a , en el que R^a es hidroxilo, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , fenilo, fenoxi, *p*-halofenilo, *p*-halofenoxi, *p*-nitrofenilo, *p*-nitrofenoxi, bencilo, benciloxi, *p*-halobencilo, *p*-halobenciloxi, *p*-nitrobencilo, o *p*-nitrobenciloxi; R^6 es $-H$, $-OH$, u $-OSO_3H$; R^7 es $-H$, o $-CH_3$; y sales, ésteres, hidratos o solvatos de los mismos farmacéuticamente aceptables. También están incluidos dentro del significado de equinocandina las diversas formas enantiómeras de la estructura I anteriormente ilustrada incluso aunque se representen centros quirales específicos. “Núcleo de equinocandina” se refiere al compuesto de equinocandina desacilada en el que R es hidrógeno. “ECBN” se refiere al núcleo de Equinocandina B en el que R^1 , R^4 y R^5 son grupos hidroxilo, R^2 , R^3 , y R^7 son grupos metilo; y R y R^6 son hidrógenos.

“Alquilo” se refiere a un radical hidrocarburo de fórmula general C_nH_{2n+1} que contiene de 1 a 30 átomos de carbono a menos que se indique otra cosa. El radical alcano puede ser lineal (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, etc.), ramificado (por ejemplo, isopropilo, isobutilo, butilo terciario, neopentilo, etc.), cíclico (por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, metilciclopentilo, ciclohexilo, etc.), o multicíclico (por ejemplo, biciclo[2,2,1]heptano, espiro [2,2]pentano, etc.). El radical alcano puede estar sustituido o no sustituido. De modo similar, la porción alquilo de un grupo alcoxi o alcanato tienen la misma definición que antes.

“Alquenilo” se refiere a un hidrocarburo acíclico que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El radical alqueno puede ser lineal, ramificado, cíclico o multicíclico. El radical alqueno puede estar sustituido o no sustituido.

“Alquinilo” se refiere a un hidrocarburo acíclico que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. El radical alquino puede ser lineal o ramificado. El radical alquino puede estar sustituido o no sustituido.

“Arilo” se refiere a restos aromáticos que tienen sistemas de anillos sencillos (por ejemplo fenilo) o fusionados (por ejemplo naftaleno, antraceno, fenantreno, etc.). Los grupos arilo pueden estar sustituidos o no sustituidos.

“Heteroarilo” se refiere a restos aromáticos que contienen al menos un heteroátomo dentro del sistema de anillo aromático (por ejemplo pirrol, piridina, indol, tiofeno, furano, benzofurano, imidazol, pirimidina, purina, bencimidazol, quinolina, etc.). El resto aromático puede consistir en un sistema de anillo sencillo o condensado. Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o no sustituidos.

Dentro del campo de la química orgánica y particularmente dentro del campo de la bioquímica orgánica, es ampliamente entendido que se tolera la sustitución significativa de compuestos o incluso es útil. En la presente invención, por ejemplo, la expresión grupo alquilo permite sustituyentes que son alquilo clásico tales como metilo, etilo, propilo, hexilo, isoctilo, dodecilo, estearilo, etc. La expresión considera y permite sustituciones sobre alquilo que son comunes en la técnica, tales como hidroxilo, halógeno, alcoxi, carbonilo, ceto, éster, carbamato, etc., así como las que incluyen el resto alquilo no sustituido. Sin embargo, los sustituyentes se deberían seleccionar de modo que no afecten adversamente a las características farmacológicas del compuesto ni interfieran con el uso del medicamento. Sustituyentes adecuados para cualquiera de los grupos anteriormente definidos incluyen alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, halo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, mono- y di-alquil amino, sales de amonio cuaternario, aminoalcoxi, hidroxialquilamino, aminoalquiltio, carbamilo, carbonilo, carboxi, glicolilo, glicilo, hidrazino, guanilo, y combinaciones de los mismos.

“Solvato” significa un agregado que comprende una o más moléculas del soluto, tal como Compuesto I, con una o más moléculas de un disolvente tal como agua, etanol, y similares.

“Disolvente adecuado” se refiere a cualquier disolvente, o mezcla de disolventes, inerte a la reacción en cuestión que solubiliza suficientemente los reactivos para ofrecer un medio dentro del que se efectúe el intercambio de anión o la formación de sal deseados.

“Caldo de cultivo mixto” se refiere a la mezcla de conversión en la que el caldo de cultivo de la fermentación se trata directamente con una enzima desacilante sin purificación para producir el producto desacilado (por ejemplo ECBN).

Descripción detallada de la invención

Se pueden preparar mezclas brutas de péptidos cíclicos que se describen aquí por fermentación de microorganismos conocidos según se describen en la técnica. La desacilación posterior se lleva a cabo típicamente de modo enzimático usando una enzima desacilasa por medio de materiales y procedimientos conocidos que se describen en la técnica.

Por ejemplo, el péptido cíclico I en el que R¹ y R⁴ son cada uno hidroxilo, R², R³ y R⁷ son cada uno metilo (es decir, núcleo cíclico que corresponde a A-30912A) se puede preparar usando el procedimiento detallado en la patente de EE.UU. N° 4.293.482. El péptido cíclico II(a) en el que R¹ es hidroxilo, R², R³ y R⁷ son cada uno metilo y R⁴ es hidrógeno (es decir, núcleo cíclico que corresponde a A-30912B) se puede preparar usando el procedimiento detallado en la patente de EE.UU. N° 4.299.763. Aculeacina se puede preparar usando el procedimiento detallado en la patente de EE.UU. N° 3.978.210. El péptido cíclico I en el que R³ es CH₂C(O)NH₂, R⁷ es metilo, R² es hidrógeno y R¹ y R⁴ son hidroxilo se puede preparar usando el procedimiento detallado en la patente de EE.UU. N° 5.198.421.

Los caldos de cultivo de fermentación y mixtos contienen un cierto número de subproductos relacionados que son muy difíciles de separar del producto de ciclopéptido deseado. En el pasado se ha usado cromatografía líquida de fase inversa (RP-LC) con razonable éxito; sin embargo, la necesidad de compuestos de más alta pureza demanda procedimientos de purificación incluso más mejorados.

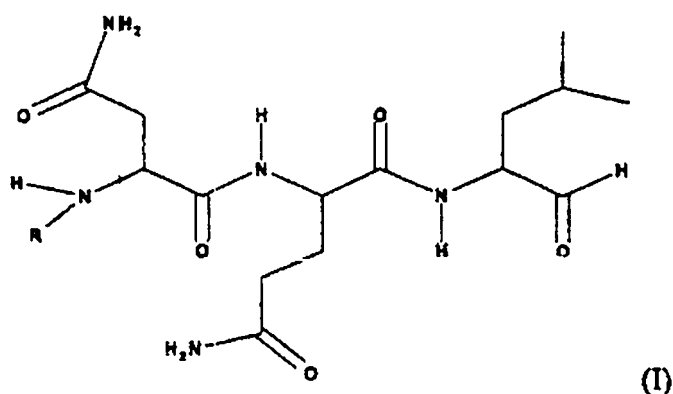
Los productos aislados de una solución de caldo de cultivo mixto o un procedimiento de fermentación generalmente se filtran previamente para retirar materiales en partículas. La filtración previa se puede lograr por un cierto número de medios conocidos en la técnica que incluyen filtración por gravedad, filtración al vacío a través de un filtro cerámico que puede o no incluir un adyuvante de filtración de Celite®, etc. También se pueden retirar sólidos en el caldo de cultivo de fermentación por centrifugación seguida de decantación del líquido de los sólidos. Los concentrados de un caldo de cultivo mixto se refieren a aquellos obtenidos directamente de la filtración o centrifugación del caldo de cultivo mixto de fermentación.

Si la solución filtrada requiere purificación adicional, la solución concentrada se puede separar usando cromatografía líquida preparativa antes de cualquier intento de cristalización. Aquellos concentrados que se originan a partir de particiones cromatográficas sirven como ejemplo de soluciones de una corriente de proceso parcialmente purificada y se denominan “concentrado refinado”.

Se puede usar cualquier procedimiento cromatográfico bien conocido en la técnica para proporcionar la deseada separación de productos. Procedimientos cromatográficos preferidos emplean el uso de medios de fase inversa con un esquema de elución ácida. Preferiblemente, un eluyente que contiene ácido acético. Por ejemplo, el material se puede purificar usando el procedimiento cromatográfico que se describe en Kroeff y col., presentado el 9 de Diciembre de 1998, titulado “Purification of Echinocandin Cyclopeptide Compounds”. El procedimiento de purificación incluye absorber la mezcla en un medio cromatográfico de fase inversa, hidrófobo y eluir con un gradiente casi continuo lineal de ácido acético que oscila de 0,1% de ácido acético a 10% de ácido acético en volumen en agua, preferiblemente de 0,5% (pH=5,5) a 4,0% (pH=2,5) de ácido acético.

Para cristalizar la sal de ECBN, se concentra en primer lugar la solución a partir del caldo de cultivo mixto o de particiones del procedimiento cromatográfico. Convencionalmente, la solución se concentraba por medio de un procedimiento evaporativo (por ejemplo, destilación). Sin embargo, los solicitantes han descubierto que un sistema de nanofiltración proporciona un concentrado más eficaz y de más alta calidad. El procedimiento implica una concentración de 200 veces de una solución diluida (aprox. 1 g/litro) del núcleo de ciclopéptido en una membrana de ósmosis inversa de corte a peso molecular 400 aproximadamente. La membrana retiene el núcleo de ciclopéptido mientras que deja que pasen a través de ella las impurezas de peso molecular más bajo. El procedimiento de nanofiltración proporciona varias ventajas sobre los procedimientos convencionales evaporativos tales como, potencia más alta, elimina la necesidad de secar el núcleo por congelación, tiempo de ciclo más corto, y reducción significativa de productos de degradación durante la concentración. A diferencia de la destilación, la nanofiltración permite producir un concentrado que tiene un porcentaje en peso entre aproximadamente 18 y 22% sin degradación significativa.

Además de otras impurezas relacionadas, el caldo de cultivo de fermentación para equinocandina B contiene niveles variables de un subproducto de tripéptido-aldehído (Asn-Gln-Leu-H) que tiene la siguiente estructura química (Ia). El subproducto de tripéptido-aldehído experimenta la desacilación lo mismo que la equinocandina B durante el procedimiento de desacilación enzimática para formar el correspondiente tripéptido-aldehído desacilado (Ib).



en la que R es $C(O)CH_2CH(OH)C_9H_{19}$ (Ia-subproducto de fermentación) o un hidrógeno (Ib-subproducto de desacilación a partir de un caldo de cultivo mixto).

Sorprendentemente, el tiempo de retención del tripéptido-aldehído desacilado es muy similar al de ECBN en cromatografía líquida de fase inversa (RP-LC), incluso bajo condiciones de elución óptimas, haciendo así muy difícil separar el tripéptido-aldehído desacilado (Ib) del deseado ECBN. El procedimiento de nanofiltración tampoco retira suficientemente el tripéptido-aldehído desacilado. Se ha mostrado ahora que la impureza de tripéptido influye sobre la capacidad para cristalizar la sal de ECBN. Sin desear vincularnos a ninguna teoría, se cree que la impureza de tripéptido (Ib) forma un complejo débil con el núcleo de ECB en solución que sirve para disminuir, o inhibir de otra manera la velocidad de cristalización del núcleo de ECB, contribuyendo así a una escasa recuperación de producto. Consecuentemente, el subproducto de tripéptido preferiblemente se retira o se modifica previamente al aislamiento de ECBN cristalino.

El subproducto de tripéptido-aldehído puede ser modificado en el concentrado de ECBN haciendo reaccionar el aldehído con un agente de formación de derivado antes de la cristalización. El agente de formación de derivado interacciona selectivamente con el aldehído disminuyendo o eliminando así cualquier interacción entre el aldehído y el ECBN. "Agente de de formación de derivado" se refiere a un reactivo capaz de interaccionar (es decir reacción o complejación) con la funcionalidad aldehído del subproducto de tripéptido para producir un producto intermedio que es suficientemente diferente en hidrofobicidad para permitir la separación del producto intermedio de tripéptido de la sal de ECBN deseada. Por ejemplo, la solubilidad del aldehído se aumenta de tal manera que la sal de ECBN cristaliza selectivamente a partir de la solución dejando el aldehído en solución. Agentes de formación de derivado adecuados incluyen bisulfito sódico, hidracina, hidroxilamina e clorhidrato de semicarbazida. Se añade al menos un equivalente de agente de formación de derivado por equivalente de impureza de aldehído. Preferiblemente, se añade un ligero exceso de agente de formación de derivado (es decir, aproximadamente 1,2 equivalentes).

Se añade un ácido orgánico o inorgánico al concentrado para ajustar el pH de la solución de concentrado a menos de 4,0, preferiblemente entre aproximadamente 4,0 y 2,0, más preferiblemente entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 2,5. El pH óptimo (es decir, el grado de protonación) dependerá del medio químico local de la función amina. En otras palabras, el pH se ajusta de tal manera que se favorece la formación de la sal de amonio. La sal de ECBN se puede cristalizar a partir del concentrado ácido añadiendo un ácido o sal metálica que contiene el anión deseado enfriando a continuación lentamente la mezcla para iniciar la cristalización. El ácido/sal metálica se puede añadir en porciones. Las porciones se pueden añadir en cantidades iguales o desiguales. La adición en porciones parece controlar el proceso de crecimiento del cristal. Típicamente, la primera porción contiene casi el doble de la cantidad de la segunda o tercera porción. Preferiblemente, la sal metálica se añade en porciones a temperaturas diferentes. Por ejemplo, la primera porción de sal metálica se añade entre aproximadamente 22 y 28°C, la segunda porción se añade entre aproximadamente 20 y 15°C, y la tercera porción se añade entre aproximadamente 8 y 12°C. La bajada de la temperatura de 28°C a aproximadamente 10°C ayuda a que disminuya la solubilidad de la sal de ECBN y colabora así a la cristalización de la sal de ECBN, aunque, bajadas adicionales de la temperatura por debajo de 10°C no parece que afecten significativamente a la solubilidad de la sal de ECBN. Se cree que el aumento de la cantidad de ácido/sal metálica añadido al concentrado no sólo proporciona una rica fuente de anión, sino que también reduce la solubilidad de la sal de ECBN. La cantidad total de ácido/sal metálica añadido al concentrado está generalmente entre aproximadamente 14 y 16 por ciento en peso del concentrado. Preferiblemente, se añade un cristal de siembra para colaborar a la iniciación del proceso de cristalización.

Cuando el ciclo péptido es el núcleo de equinocandina B, la sal de acetato es un sólido amorfo. Los solicitantes han descubierto que el anión de la sal de amonio de ciclo péptido amorfa se puede intercambiar fácilmente en presencia de una fuente de anión alternativo (un ácido o una sal metálica) para formar una sal cristalina. Por ejemplo, las particiones de HPLC que contienen el ECBN están típicamente en la forma de una sal de acetato amónico puesto que el eluyente es ácido acético. El intercambio aniónico se puede lograr añadiendo el apropiado ácido/sal metálica que sirve como fuente de anión alternativo en cualquier etapa antes de la cristalización. Para ECBN, una fuente preferida de anión es HCl/cloruro sódico.

ES 2 270 819 T3

En resumen, la formación de una sal de ECBN incluye las etapas de: (i) concentrar una solución que contiene ECBN o una sal amorfa del mismo y una impureza de aldehído usando un procedimiento de nanofiltración; (ii) añadir un agente de formación de derivado (preferiblemente bisulfito sódico) que interacciona con la impureza de aldehído; (iii) ajustar el pH a un menos de 4,0; (iv) añadir un ácido o sal metálica (preferiblemente NaCl); y (v) enfriar la mezcla para inicial la cristalización de la sal de ECBN. Se puede añadir opcionalmente un cristal de siembra para ayudar a iniciar la cristalización. Preferiblemente se añade cloruro sódico en tres porciones (la primera porción se añade entre aproximadamente 22 y 28°C; la segunda porción se añade entre aproximadamente 15 y 20°C; y la tercera porción se añade entre aproximadamente 8 y 12°C. Además, la primera porción, preferiblemente, contiene casi doble cantidad en peso de cloruro sódico que la segunda o tercera porción.

El anión de una sal de ECBN aislada se puede intercambiar preparando una suspensión de la sal de amonio de ciclopéptido con una sal ácida (o sal metálica) que contiene el anión deseado en un disolvente adecuado, calentando la suspensión para disolver los reactivos, y enfriando luego la solución para formar la sal cristalina deseada.

Las formas cristalinas ofrecen varias ventajas tales como más fácil aislamiento del ciclopéptido a partir del caldo de cultivo de fermentación mixto y/o corrientes de proceso, purificación mejorada de productos intermedios, vida en la estantería mejorada, y mayores rendimientos de producto acilado final. El grado al que cada una de estas ventajas se lleva a cabo puede depender de la forma particular de la sal y del procedimiento por el que se produce la sal.

La sal cristalina se puede aislar en una diversidad de formas cristalinas (por ejemplo, formas de sal sencilla y de sal interna, formas solvatadas y/o hidratadas, etc.). Una sal de amonio sencilla protonada puede estar en forma de una sal de adición mono- o di-ácida, tal como $\text{CP-NH}_3^+\text{A}^-$, $(\text{CP-NH}_3^+)_2\text{A}^{2-}$, y $(\text{CP-NH}_3^+\text{M}^+)\text{A}^{2-}$, en las que CP-NH_3^+ representa el ciclopéptido que contiene un grupo amino primario protonado (por ejemplo ECBN), A es un anión mono- o di-valente y M^+ es un metal mono-valente. Aniones monovalentes adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, dihidrogenofosfato, hidrogenosulfato, hidrogenooxalato, hidrógenotartrato, benzoato, metanosulfonato y *p*-toluenosulfonato. Aniones divalentes adecuados incluyen sulfato, oxalato, hidrogenofosfato, tartrato y fumarato. Cationes metálicos adecuados incluyen amonio, litio, sodio, potasio y tetraalquilamonio.

Se pueden representar formas de sales internas por fórmulas tales como $(\text{CP-NH}_3^+\text{A}^-)(\text{M}^+\text{A}^-)$ y $((\text{CP-NH}_3^+)_2\text{A}^{2-})(\text{M}^{+2}\text{A}^{2-})$, en las que M^{+2} es un metal divalente. Metales divalentes adecuados incluyen calcio y magnesio.

Además de las formas de sales básicas anteriormente descritas, la sal se puede aislar como un solvato. Ejemplos de formas solvatadas incluyen aquellas con las siguientes fórmulas químicas: $(\text{CP-NH}_3^+\text{A}^-)(\text{H}_2\text{O})_a(\text{S})_b$ en las que S es un disolvente orgánico y los subíndices a y b representan la estequiometría del solvato. Disolventes de solvato adecuados incluyen metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano y tolueno.

Las formas no solvatadas y solvatadas pueden exhibir polimorfismo. Por ejemplo, la forma cristalina puede depender de las condiciones para la cristalización. Aun cuando la estequiometría puede ser la misma, pueden existir diferentes estructuras cristalinas tridimensionales de la fase sólida con diferentes propiedades físicas y químicas.

Ejemplos

Materiales usados en las siguientes preparaciones están disponibles de Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wisconsin) a menos que se indique otra cosa. Se usan las siguientes abreviaturas: ACN - acetonitrilo; TFA - ácido trifluoroacético; y TRS - sustancias relacionadas totales (es decir, impurezas).

Caracterización analítica de las muestras

La calidad y la cantidad de las muestras de filtrado de ECBN se evaluaron usando los siguientes métodos analíticos.

Sistema de fosfato: Una columna (0,46 cm DI x 15 cm) Zorbox[®] SB C-18, de partículas de 3,5 micras, se eluyó con una fase móvil de ácido fosfórico/ACN del 1% a un caudal de 1,5 ml/min. Se hizo funcionar la columna a 30°C y se controló el efluente a 210 nm. Se equilibró la columna en ACN del 1% y después de la inyección de muestra, se usó un gradiente que oscilaba de 5 a 61,0% de ACN durante 9 minutos para eluir ECBN. Después de la elución, se lavó la columna con ACN del 50% para eluir cualquier componente altamente retenido.

Fosfato/ácido octanosulfónico (sistema OSA): Este sistema es similar al sistema de fosfato anteriormente descrito, con la excepción de que la fase móvil contiene OSA 30 mM y 0,2% de ácido fosfórico. Se equilibró la columna con ACN del 10%. Después de que haber inyectado la muestra, se efectuó la elución de ECBN con un gradiente que osciló de 10 a 28% de ACN durante 9 minutos. Se lavó luego la columna con ACN del 50% para eluir componentes altamente retenidos. El caudal de columna y la longitud de onda del detector fueron como anteriormente, mientras que la temperatura de la columna fue 50°C. Este sistema es particularmente útil para cuantificar el componente de tripeptido-aldehído de Asn-Gln-Leu-H.

Sistema TFA: Se usó para el análisis una columna (0,46 x 25 cm) Vydac[®] C-18, de 3,5 micras. La fase móvil contenía 1% de TFA y se logró la elución usando un gradiente lineal de ACN de 0 a 10% durante 20 minutos, seguido de un lavado de columna de 50%. Caudal de columna, temperatura y longitud de onda de detector fueron los mismos que para el sistema de fosfato anteriormente descrito.

Procedimientos generales*Procedimiento de nanofiltración*

- 5 Se cargaron 10.000 litros de eluido de resina que contenían aproximadamente 30 Kg de ECBN disueltos en agua que contiene ~3% de ácido acético y 5% de acetonitrilo a un sistema de nanofiltración equipado con 55,74 metros cuadrados de membranas Millipore Nanomax 50. El sistema de nanofiltración se hizo funcionar a 4235 KPa, 15°C, y un caudal de recirculación de ~50-200 lpm. La solución se concentró a ~300 litros durante 1-3 horas. El pH se ajustó con HCl conc. entre 2,7 y 3,0. El sistema se diafiltró con ~1000 litros de agua (es decir, se lava con agua, al tiempo que se mantuvo el volumen total aproximadamente constante en 300 litros, por ejemplo se añade agua al mismo caudal al que fluye el filtrado a través de la membrana). Después de lavar, la solución se concentró a un volumen final de 100 a 150 litros (200-300 g/litro). Esto se llevó directamente entonces a la etapa de cristalización.

Ejemplo 1

- 15 El ejemplo 1 ilustra el procedimiento de cristalización y la complejación de las impurezas de tripéptido-aldehído en un concentrado.

- Se pesó una muestra de una solución acuosa caracterizada por análisis de concentrado de núcleo de ECB a partir de diversos lotes de producción que habían sido nanofiltrados usando el procedimiento anteriormente descrito (véase Tabla I para los tratamientos posteriores). En algunos casos, se añadió bisulfito sódico y se agitó la mezcla hasta que el bisulfito se hubo disuelto. En todos los casos se ajustó el pH de la solución resultante a 3,2-2,9 con adición gota a gota de una solución diluida (~10% en peso) de ácido clorhídrico. A la solución resultante de pH ajustado se añadió una cantidad calculada de cloruro sódico y se agitó la mezcla hasta que los sólidos se hubieron disuelto. Se transfirió la solución resultante a un cristizador encamisado de 100 ml, equipado con un agitador mecánico. A la solución agitada se añadió una cantidad fijada de cristales de siembra de núcleo de ECB cristalino (690 mg). La suspensión de siembra resultante se agitó a 25°C durante un período de aproximadamente 24 horas. Se añadió una segunda cantidad de cloruro sódico. Se ajustó la temperatura de la suspensión agitada a 17°C y los contenidos se agitaron durante aproximadamente 24 horas. Finalmente, se añadió una tercera cantidad de cloruro sódico. Se ajustó la temperatura de la suspensión agitada a 10°C y los contenidos se agitaron durante aproximadamente 24 horas. Los sólidos resultantes, a partir de la suspensión de núcleo de ECB cristalino, se aislaron por filtración a vacío. El producto de torta húmeda cristalina se lavó con una solución acuosa de cloruro sódico (aproximadamente 10 ml, 14% en peso) y se escurrió. Se dejaron secar los cristales en una cámara de 75% de humedad relativa, durante la noche. Se pesaron los productos aislados y se analizaron respecto a su potencia según se registra en la Tabla II en la que * indica que la potencia puede ser baja debido a insuficiente secado.

TABLA I

Conc. Mues- tra nº	Conc. Pot (%peso)	Tripep Impur (%peso)	Conc. Cant (g)	ECBN Cant (bg)	Na Bisulfito (g)	1ª NaCl (g)	2ª NaCl (g)	3ª NaCl (g)
3-1a	21,18	7,3	55,23	11,70	0,00	4,23	1,06	0,63
3-1b	21,18	7,3	55,23	11,70	1,70	4,23	1,06	0,63
3-1a	23,85	7,9	52,01	12,40	0,00	3,99	1,00	0,60
3-2b	23,85	7,9	52,01	12,40	1,83	3,99	1,00	0,60
3-3a	21,4	14,3	56,57	12,11	0,00	4,33	1,08	0,65
3-3b	21,4	14,3	56,57	12,11	2,42	4,33	1,08	0,65
3-4a	22,38	11,5	55,72	12,47	0,00	4,27	1,07	0,64
3-4b	22,38	11,5	55,72	12,47	2,10	4,27	1,07	0,64
3-5a	22,83	0,9	52,75	12,04	0,00	4,04	1,01	0,61
3-5b	22,83	0,9	52,75	12,04	1,28	4,04	1,01	0,61
3-6a	21,68	7,74	55,24	11,98	0,00	3,89	0,97	0,58
3-6b	21,68	7,74	55,24	11,98	1,28	3,89	0,97	0,58

TABLA II

Muestra nº	Rendimiento (g) ECBN	Potencia (%) ECBN	Rendimiento (bg) ECBN	Rendimiento (%) ECBN
3-1a	9,01	71,7	6,46	55,2
3-1b	11,93	74,3	8,86	75,8
3-1a	20,38	48,7	9,92	80,0
3-2b	13,1	76,4	10,01	80,7
3-3a	4,36	75,9	3,31	27,3
3-3b	19,23	54*	10,38	85,8
3-4a	23,79	45,2	10,75	86,2
3-4b	13,23	76,8	10,16	81,5
3-5a	12,74	76,3	9,72	80,7
3-5b	13,11	75,8	9,94	82,5
3-6a	8,38	73,8	6,18	51,6
3-6b	11,65	75	8,66	72,3

Ejemplo 2

El ejemplo 2 ilustra la conversión de una sal de amonio de acetato de ECBN en una diversidad de sales cristalinas.

Se colocó una cantidad de sal de amonio de acetato de ECBN (5,0 g, 88,4% de potencia, 4,15% TRS) en un matraz Erlenmeyer de 50 ml con tapón de rosca. Se añadió luego una solución de una sal ácida en agua (Tabla III en la que ¹TRS es el total de sustancias relacionadas (por ejemplo impurezas); y ²KF es el análisis de Karl Fisher). La suspensión resultante se agitó para disolver los sólidos. Se añadió una pequeña cantidad de cristales de siembra y se cerró el matraz. Se colocó el matraz en un baño de agitación orbital mantenido a -25°C y se agitó durante un período de 5 días tras los cuales se formó un precipitado. Se aisló una porción de 4/5 del precipitado por filtración al vacío. La torta húmeda aislada se repartió en dos fracciones: (A) una fracción de torta húmeda; y (B) una fracción semi-seca. Las fracciones de torta húmeda se almacenaron en viales cerrados.

La fracción semi-seca se lavó con una solución de acetonitrilo en agua (95:5 en volumen, 2 ml). La torta lavada se secó a temperatura y presión ambientales durante aproximadamente 15 minutos (tiempo suficiente para que se disipe el olor de ACN). Los polvos de torta húmeda semi-seca que fluyen libremente se almacenaron en viales cerrados.

Las tortas semi-secas aisladas se analizaron respecto a aniones y cationes por cromatografía de iones. Se determinaron la potencia y las impurezas (TRS) por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

TABLA III

Mues- tra N°	Sal a- ñadida	Cant. sal (g)	Conc. sal % peso	Análisis cristalino				
				Pot (%)	TRS ¹ (%)	KF ² (%)	An (%)	Cat (%)
1	NaCl	23,6	14,6	76,4	1,57	17,6	4,98	0,78
2	NaCl	17,7	11,0	79,9	0,83	17,6	6,70	0,61
3	Pot. oxa.	31,9	23,1	64,1	1,66	16,1	10,4	3,29
4	Pot. oxa.	23,9	17,3	80,9	1,05	17,0	4,92	0,75
5	NH ₄ SO ₄	26,5	33,1	74,7	1,05	16,2	8,69	1,07
6	NH ₄ SO ₄	17,7	16,6	77,7	0,88	17,2	5,90	0,48
7	LiSO ₄	35,4	20,7	76,1	0,66	17,7	7,59	0,52
8	Na ₂ SO ₄	26,5	17,8	78,2	0,54	17,1	5,71	0,76
9	Na ₂ SO ₄	26,5	17,8	78,9	0,55	17,2	5,36	0,56
10	NaBr	10,0	21,4	76,9	0,78	15,3	9,36	0,78
11	Amon. oxa.	10,0	satura.	80,8	0,48	17,3	4,50	0,11
12	Na oxa.	10,0	satura.	81,8	0,54	17,2	2,12	0,10
13	Na ise- tionato	10,0	36,1	78,2	0,58	14,1	9,10	0,44
14	NaH ₂ PO ₄	19,7	27,0%	74,2%	0,67%	17,5%	7,25%	1,25%
15	NaH ₂ PO ₄	19,7	27,0%	73,7%	1,48%	18,3%	6,59%	1,25%
16	NaNO ₃	10,0	30%	79,1%	0,56%	15,6%	7,40%	1,03%
17	CaCl ₂	10,0	25,0%	75,7%	1,02%	18,6%	5,95%	1,55%

Se examinaron microscópicamente las tortas húmedas aisladas para cada muestra bajo luz polarizada y mostraron un comportamiento birrefringente típico de los materiales cristalinos. Además, las fotomicrografías presentaron formas cristalinas. Todos los materiales aislados mostraron patrones de difracción distintos coherentes con la presencia de materiales cristalinos cuando se analizan por difracción de polvo con rayos-X (XRPD).

Ejemplo 3

El ejemplo 3 compara la calidad del ECBN concentrado mediante destilación (Procedimiento A) frente a nanofiltración (Procedimiento B).

Procedimiento A

Las fracciones combinadas de la elución de la columna (llamadas “corriente principal” ~10.000 l) se transfieren parcialmente a un aparato de destilación. Los componente volátiles, que incluyen acetonitrilo, ácido acético y agua se retiran parcialmente por destilación a presión reducida. Temperaturas típicas de destilación están entre 40°C y 45°C. Se continúan la transferencia de la corriente principal al aparato de destilación y la destilación hasta que el volumen total del concentrado es aproximadamente 200 l. Tiempos de destilación típicos son 24 a 36 horas.

ES 2 270 819 T3

Procedimiento B

5 Las fracciones combinadas de la elución de la columna (~10.000 l) se recirculan a través de un aparato de nanofiltración bajo presión. Durante la operación de recirculación, se retira una porción importante de acetonitrilo, agua y ácido acético. También se retiran otras impurezas, incluso sales de calcio y magnesio. Los materiales retirados se disuelven en una corriente de proceso que se denomina “permeado”. La porción concentrada, que contiene materiales retenidos, se denomina “rechazo”. La operación de recirculación se continúa hasta que el volumen de rechazo es aproximadamente 500 l.

10 Se añaden al rechazo cloruro sódico (10 kg), ácido clorhídrico (para ajustar el pH del rechazo a 3,0) y agua (2600 l). La mezcla de rechazo se recircula a través del aparato de nanofiltración hasta que el volumen de rechazo es aproximadamente 600 l. Tiempos típicos de nanofiltración son aproximadamente 9 horas.

Observaciones

15 Las soluciones concentradas de núcleo de ECB preparadas por nanofiltración (Procedimiento B) son de mejor calidad que las soluciones preparadas por destilación (Procedimiento A). Cromatogramas por HPLC de materiales de núcleo de ECB muestran que el tipo y cantidades de impurezas presentes son inferiores o están ausentes en los materiales nanofiltrados preparados por el método B en comparación con los materiales destilados preparados por el
20 Procedimiento A. Por ejemplo, los cromatogramas muestran que las impurezas asociadas con la degradación térmica son significativamente más grandes en concentrados preparados por destilación que en concentrados preparados por nanofiltración. El nivel promedio de impurezas de degradación en 8 concentrados destilados fue 6,5% (media = 7,9%, intervalo = 4,72% a 11,1%). Mientras que el nivel promedio de impurezas de degradación en 18 concentrados nanofiltrados fue 3,2% (media = 4,7%, intervalo = 0,42% a 8,95%).

25 La recuperación de núcleo de ECB cristalino a partir de soluciones concentradas de núcleo de ECB preparadas por nanofiltración es típicamente mayor que las recuperaciones a partir de soluciones concentradas preparadas por destilación. La recuperación promedio de núcleo de ECB cristalino a partir de 8 soluciones concentradas destiladas fue 25,6% (media = 25,8%, intervalo = 4,0% a 47,6%). En contraste, la recuperación promedio de núcleo de ECB
30 cristalino a partir de 18 soluciones concentradas nanofiltradas fue 60,6% (media = 51,0%, intervalo = 23,3% a 78,7%).

35

40

45

50

55

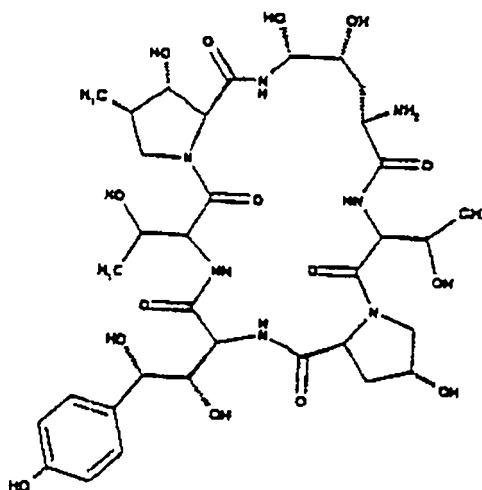
60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para formar una sal cristalina de núcleo de equinocandina B a partir de su caldo de cultivo mixto o corrientes de proceso parcialmente purificadas que comprende en el siguiente orden las etapas de:

proporcionar una solución que comprende núcleo de equinocandina B o representado por la estructura



o sal amorfa del mismo, una impureza de aldehído y un disolvente;

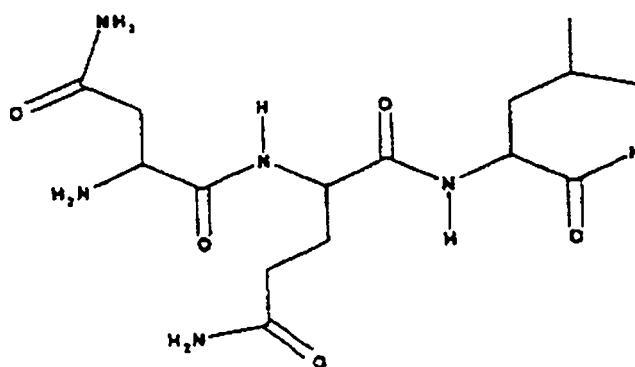
concentrar dicha solución por medio de un procedimiento de nanofiltración para formar un concentrado;

añadir un agente de formación de derivado que interacciona selectivamente con dicha impureza de aldehído;

ajustar el pH de dicho concentrado a menos de 4,0;

añadir un ácido o sal metálica; y

enfriar dicho concentrado; en el que dicha impureza de aldehído está representada por la estructura:



2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa (vii) que añade un cristal de siembra para iniciar la cristalización.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente de formación de derivado es bisulfito sódico, y dicho ácido inorgánico es cloruro de hidrógeno.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha sal metálica se añade en porciones.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dichas porciones se añaden a diferentes temperaturas.

6. Un procedimiento para preparar una sal cristalina de clorhidrato de núcleo de equinocandina B por las etapas de:

proporcionar una solución que comprende núcleo de equinocandina B o sal amorfa del mismo, una impureza de aldehído y un disolvente;

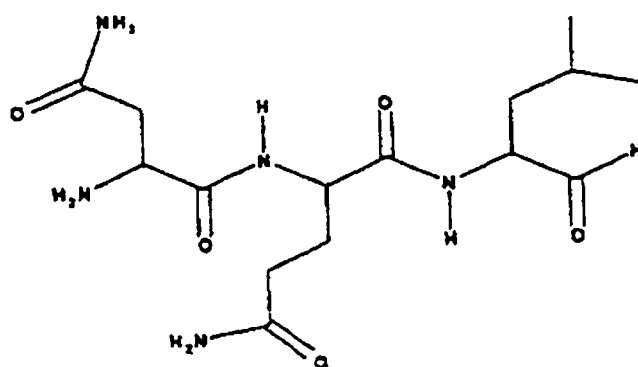
concentrar dicha solución por medio de un procedimiento de nanofiltración para formar un concentrado;

añadir bisulfito sódico;

ajustar el pH de dicho concentrado a menos de 4,0;

añadir una sal de cloruro metálico; y

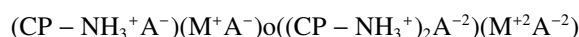
enfriar dicho concentrado; en el que la impureza de aldehído está representada por la estructura:



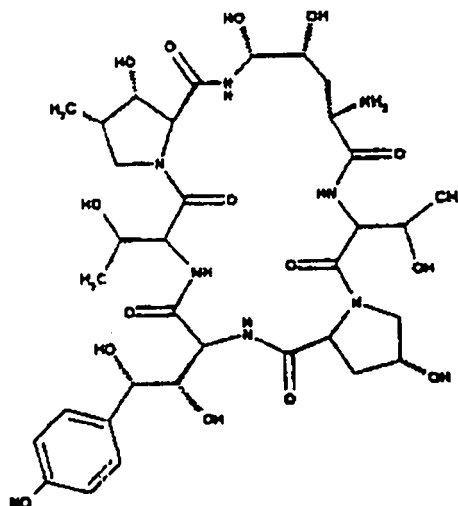
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicha sal de cloruro metálico se añade en tres porciones que comprenden una primera porción que se añade entre 22 y 28°C, una segunda porción que se añade entre 20 y 15°C, y una tercera porción que se añade entre 12 y 8°C.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha primera porción contiene aproximadamente el doble de sal de cloruro metálico en peso que cualquiera de dicha segunda o tercera porción.

9. Una forma de sal interna cristalina de un núcleo de equinocandina B representada por la fórmula



en la que CP-NH₃⁺ está representada por la estructura



ES 2 270 819 T3

A^- es cloruro, bromuro, yoduro, dihidrogenofosfato, hidrogenosulfato, hidrogenooxalato, hidrogenotartrato, benzoato, metanosulfonato o *p*-toluenosulfonato;

M^+ es amonio, litio, sodio, potasio o tetraalquilamonio;

A^{-2} es sulfato, oxalato, hidrogenofosfato, tartrato o fumarato;

M^{+2} es calcio o magnesio; y

solvatos o hidratos de los mismos farmacéuticamente aceptables.