



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 177 373**

②① Número de solicitud: 009902620

⑤① Int. Cl.⁷: C07H 17/08

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **26.11.1999**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2002**

Fecha de concesión: **01.10.2003**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2003**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.11.2003

⑦③ Titular/es: **ASTUR PHARMA S.A.**
c/ Río Vélez, 1
Boadilla del Monte, Madrid, ES

⑦② Inventor/es: **Bayod Jasanada, Miguel Santos;**
Llorente García, Isidro y
Fernández Marí, Félix

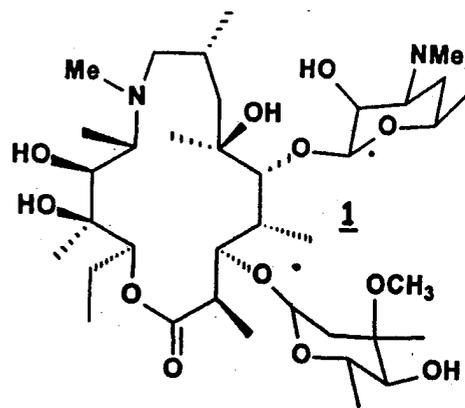
⑦④ Agente: **Isern Jara, Nuria**

⑤④ Título: **Preparación de azitromicina en su forma no cristalina.**

⑤⑦ Resumen:

Preparación de azitromicina en su forma no cristalina.

La invención describe un procedimiento en el que el producto final se obtiene por liofilización de azitromicina en una solución de un alcohol alifático o de un éter cíclico. La invención describe métodos analíticos para diferenciar las formas no cristalina y la dihidrato cristalizada de azitromicina.



ES 2 177 373 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Preparación de azitromicina en su forma no cristalina.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a la obtención de azitromicina en su forma no cristalina, así como a la caracterización de la forma no cristalina y a su diferenciación respecto de la forma dihidrato cristalina.

10 **Antecedentes de la invención**

Azitromicina, es el nombre genérico del azárido 9-desoxo-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A, cuyo nombre sistemático es 13-[(2,6-didesoxi-3-C-metil-3-O-metil- α -L-ribo-hexopiranosil)oxi]-2-etil-3,4,10-trihidroxi-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-11-[[3,4,6-tridesoxi-3-(dimetilamino)- β -D-xilo-hexopiranosil]oxi]-1-
15 oxa-6-azaciclopentadecan-15-ona.

La azitromicina es un macrólido semisintético que presenta una excelente actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas y frente a algunas gram-negativas (H.A. Kirst, G.D. Sides, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1989, 33, 1419-1422). El uso clínico de este macrólido está aportando nuevas aplicaciones al mostrarse útil en el tratamiento de infecciones oportunistas (F. Lecomte, *Rev. Med. Interne* 1998, 19(4), 255-61; S. Alvarez-Elcoro, *Mayo Clin. Proc.* 1999, 74(6), 613-34; J. Schater, *Lancet*, 1999, 354(9179), 630-35).
20

En el Esquema de Reacción 1 se indican las distintas rutas de síntesis de azitromicina 1. Los nombres de los productos representados en dicho Esquema de Reacción 1 se recogen en la Tabla 1.
25

30

35

40

(Ver Esquema de Reacción 1 en la página siguiente)

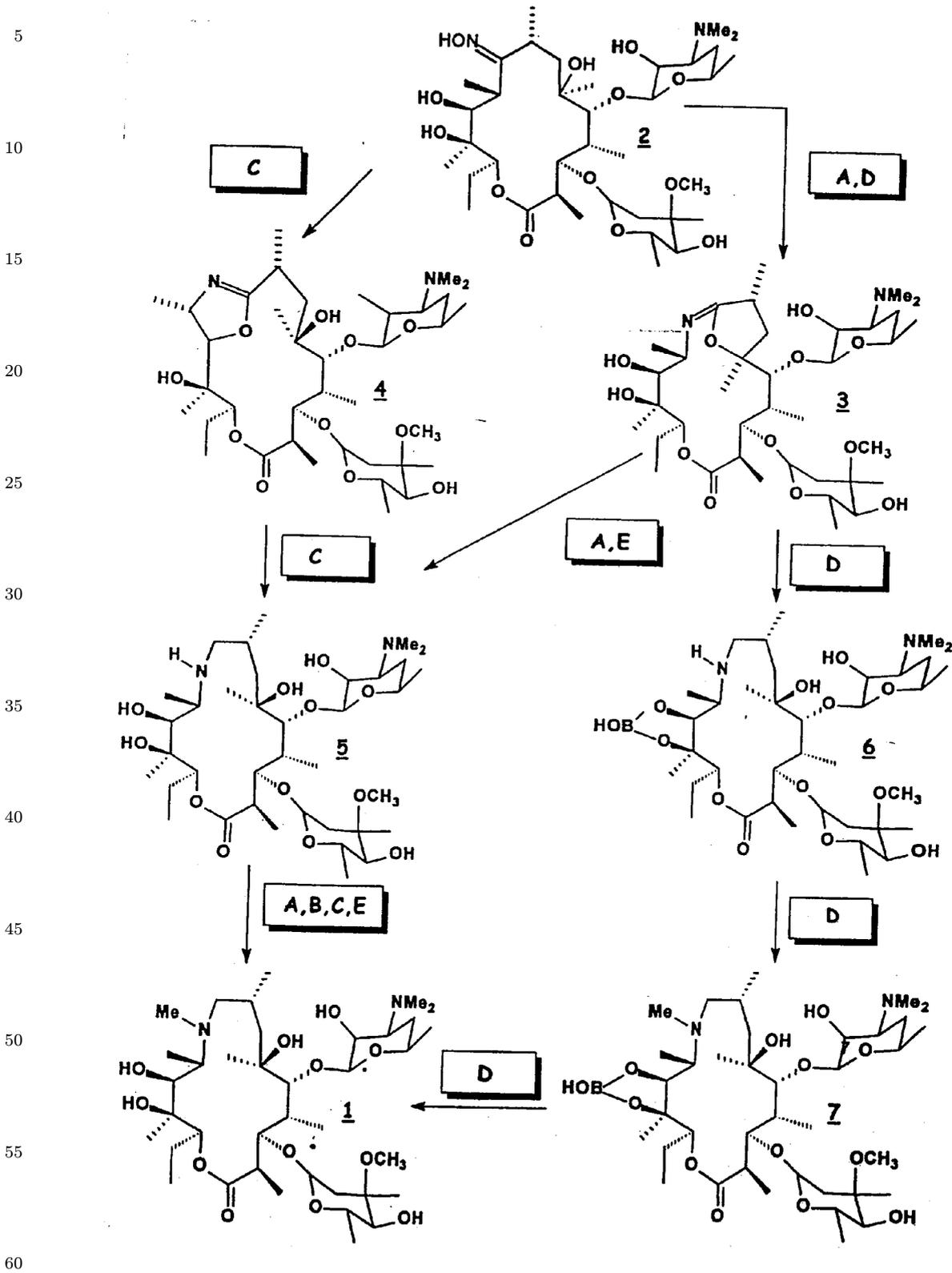
45

50

55

60

Esquema de Reacción 1



ES 2 177 373 B1

TABLA 1

Producto n°	Nombre
1	azitromicina
2	oxima de la eritromicina A
3	9-desoxo-6-desoxi-6,9-epoxi-9,9a-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicina A (6,9-iminoéter)
4	9-desoxo-11-desoxi-9,11-epoxi-9,9a-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicina A (9,11-iminoéter)
5	9-desoxo-9a-aza-9a-homoeritromicina A (azaeritromicina A)
6	11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-homoeritromicina A (11,12-hidrógenoborato de azaeritromicina)
7	11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-metil-9a-homoeritromicina A (11,12-hidrógenoborato de azitromicina)

En la Tabla 2 se relacionan las diferentes rutas de síntesis (A, B, C, D y E) de azitromicina mostradas en el Esquema de Reacción 1, con las publicaciones en las que aparecen descritas, los autores y solicitantes que las describen.

TABLA 2

Ruta	Patente	Publicación	Autor	Solicitante
A	US 4328334 US 4517359	J.Chem.Soc.Perkin Trans I, 1986, 1881 J.Chem.Res., 1988, 132 Idem miniprint, 1988, 1239	S. Djokic	PLIVA
B	US 4474768		G.M. Bright	PFIZER
C	US 5686587 EP 0699207 ES 2104386		B.V. Yang	PFIZER
D	US 5869629 EP 0827965 ES 2122905	J.Org.Chem., 1997, 62, (21), 7479-7481 Magn. Reson. Chem., 1998, 36, 217-225	M. Bayod	ASTUR PHARMA
E	EP 0879823		W. Heggie	HOVIONE

Los estudios de elucidación estructural realizados sobre la azitromicina han puesto de manifiesto su existencia en dos formas cristalinas: la forma monohidrato (higroscópica), y la forma dihidrato cristalina (no higroscópica), siendo esta última la forma preferida para su manipulación con el objetivo de preparar formulaciones de uso terapéutico, tal como se describe en EP 298650.

La azitromicina dihidrato cristalina es fácilmente distinguible de la azitromicina monohidrato cristalina mediante los siguientes ensayos diferenciales:

- a) la forma dihidrato cristalina mantiene constante su contenido porcentual en agua en unos valores (4,5-5 %) muy próximos al valor teórico (4,6 %),

ES 2 177 373 B1

b) el análisis de DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido) de la forma dihidrato muestra la presencia de una única endoterma que puede variar entre 115 y 135°C, con una energía absorbida en el proceso que oscila entre 27 y 34 cal/g,

c) cada forma cristalina ofrece su propio y característico espectro de Difracción de Rayos X (DRX), y

d) los espectros de infrarrojo en KBr de ambas formas cristalinas presentan claras diferencias:

Azitromicina dihidrato $\nu(\text{cm}^{-1})$	Azitromicina monohidrato $\nu(\text{cm}^{-1})$
3560 y 3496, 2 bandas agudas	3500, 1 banda ancha
1344	no presenta
1282 y 1268, 2 bandas agudas	1280
1083	no presenta

Recientemente también se han diferenciado las formas cristalinas de azitromicina mediante sus distintos espectros de difracción de polvo de rayos X.

Se han descrito distintos procedimientos de preparación de dichas formas cristalinas de azitromicina, entre los que pueden citarse los siguientes:

1. Azitromicina monohidrato higroscópica: por recristalización de etanol/agua (EP 101186, US 4.474.768, EP 298650 y M. Bayod, J. Org. Chem. 1997, 62(21), 7479-7481); y
2. Azitromicina dihidrato cristalina: por recristalización de tetrahidrofurano/éter de petróleo/agua (EP 298650, WO 89/00576 y ES 2038756), por recristalización de acetona/agua (CN 1093370, EC 95-1389, EP 827965, ES 2122905, US 5.869.629, S. Djokic, J.Chem.Res., 1988, 132, y M. Bayod J. Org. Chem. 1997, 62(21), 7479-7481), por recristalización de otros disolventes, por ejemplo, metanol, dimetilformamida, acetonitrilo o dioxano, y agua (CN 1093370) o por precipitación mediante adición de una base a una disolución acuosa ácida de azitromicina conteniendo acetona (EP 941999).

También se encuentran descritos dos casos de síntesis de azitromicina, que no deberían corresponder con ninguna de dichas formas cristalinas, puesto que el aislamiento del producto se realiza mediante simple evaporación a sequedad de las disoluciones del producto, concretamente, mediante evaporación de cloruro de metileno (WO 94/26758, EP 699207, US 5.686.587 y ES 2104386) o mediante evaporación de cloroformo (BE 892357 y US 4.517.359). Los métodos analíticos utilizados en dichos documentos no permiten caracterizar la forma no cristalina de azitromicina.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los espectros de infrarrojo de la azitromicina no cristalina (Figura 1A) y de la azitromicina dihidrato cristalina (Figura 1B). En las gráficas se representa ν (cm^{-1}) en el eje de abscisas frente al porcentaje de transmitancia en el eje de las ordenadas.

La Figura 2 muestra los termogramas de la azitromicina no cristalina (Figura 2A) y de la azitromicina dihidrato cristalina (Figura 2B). En las gráficas se representa la temperatura en °C en el eje de las abscisas, frente al flujo de calor expresado en Watios/gramo (W/g) en el eje de ordenadas.

La Figura 3 muestra los espectros de DRX de la azitromicina no cristalina (Figura 3A) y de la azitromicina dihidrato cristalina (Figura 3B). En las gráficas se representa el ángulo 2θ en el eje de las abscisas y el número de cuentas en el eje de ordenadas.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la preparación de azitromicina en su forma no cris-

ES 2 177 373 B1

talina mediante la liofilización de una disolución de azitromicina en un alcohol alifático, por ejemplo, *terc*-butanol (2-metil-2-propanol), o en un éter cíclico, por ejemplo, 1,4-dioxano.

Asimismo, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de azitromicina en su forma no cristalina, a partir de 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-metil-9a-homoeritromicina A, que comprende, en general, hidrolizar dicho compuesto para obtener azitromicina, que si se desea puede ser aislada, disolver la azitromicina en un alcohol alifático, por ejemplo, etanol, isopropanol o *terc*-butanol, y liofilizar la disolución de azitromicina para obtener la forma no cristalina de azitromicina.

La invención proporciona un procedimiento para la preparación de 9-desoxo-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A (Azitromicina) en su forma no cristalina que comprende:

- a) hidrolizar 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-metil-9a-homoeritromicina A en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, acetonitrilo, etanol o metanol, por la acción de un ácido diluido, tal como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido oxálico, a temperatura ambiente, en un rango de pH comprendido entre 2 y 4, para obtener azitromicina,
- b) disolver la azitromicina en *terc*-butanol, y
- c) liofilizar la disolución de azitromicina en *terc*-butanol.

Las ventajas del procedimiento objeto de esta invención son esencialmente de tipo práctico a la hora de su aplicación a escala industrial ya que:

- la liofilización es una técnica que garantiza excelentes resultados en lo referente a la homogeneidad de lotes, pureza de producto y consistencia de los datos analíticos de los diferentes lotes.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la caracterización de la azitromicina en su forma no cristalina y su clara diferenciación de las formas cristalinas (dihidrato y monohidrato) de azitromicina mediante el empleo de técnicas de espectroscopía de infrarrojos, DSC, DRX, higroscopicidad y ensayo de cristalinidad mediante microscopio de luz polarizada. Las diferencias observadas entre la azitromicina dihidrato cristalina y la azitromicina no cristalina, utilizando las técnicas analíticas antes citadas, se recogen a continuación.

1. Espectroscopía de infrarrojos

Los espectros de infrarrojo (en KBr) de ambas formas de azitromicina realizados en un FT-IR Nicolet 7 Impact 410 presentan claras diferencias entre sí (véase la Figura 1).

Azitromicina dihidrato cristalina ν (cm^{-1})	Azitromicina no cristalina ν (cm^{-1})
3560 y 3496, 2 bandas agudas	3500, 1 banda ancha
1344	No presenta
1282, 1268, 1251, 3 bandas agudas	1280 y 1257, 2 bandas agudas
1083	No presenta

2. DSC

En la Figura 2 se muestran los termogramas obtenidos realizando barridos entre 20°C y 300°C, en atmósfera de nitrógeno y con una velocidad de barrido de 5°C/min. El termograma de la forma no cristalina no presenta pico de fusión, lo que lo diferencia claramente del termograma de la azitromicina dihidrato cristalina.

3. DRX

Los espectros de DRX se llevaron a cabo con un difractómetro marca Philips® 7 PW 1710. En la Figura 3 se representan los resultados con el software del propio difractómetro. La azitromicina no cristalina presenta un patrón de difracción caracterizado por la ausencia de máximos definidos de difracción de Rayos X, por lo que el sólido se considera amorfo.

4. Higroscopicidad

La azitromicina no cristalina se muestra moderadamente higroscópica. Dos muestras de azitromicina no cristalina con un contenido en agua del 3%, se colocaron en un desecador con una atmósfera de humedad relativa superior al 75%. Transcurridas 8 horas, el contenido en agua de la primera muestra es del 5,3%, a las 72 horas el contenido en agua de la segunda muestra es del 9,9%.

5. Ensayo de cristalinidad mediante microscopio de luz polarizada

La azitromicina no cristalina evidencia cristalinidad negativa, pues sus partículas no muestran birrefringencia.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-homoeritromicina A

Se disuelven 89 g de 9-desoxo-6-desoxi-6,9-epoxi-9,9a-dihidro-9a-aza-homoeritromicina A en 450 ml de metanol y se enfría entre -5°C y -10°C. Manteniendo la temperatura entre los valores mencionados se adicionan 16 porciones de 2,2 g de borohidruro sódico cada una. Se mantienen las condiciones de agitación y temperatura durante 2 h adicionales y se deja que la masa de reacción alcance los 20°C. Después de 20 h se evapora el metanol a sequedad. El residuo se disuelve en 500 ml de cloruro de metileno y 750 ml de agua, agitándose durante 30 min. Se separa la fase orgánica y la fase acuosa se extrae con 250 ml de cloruro de metileno. Se reúnen las fases orgánicas, se filtra sobre celite, se seca sobre sulfato sódico anhidro y se concentra a sequedad para dar 85 g de 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-homoeritromicina A.

35	IR (KBr)	$\nu_{\max} = 3500, 2980, 2960, 1730, 1470, 1390, 1170, 1090, 1060 \text{ cm}^{-1}$
	¹ H-RMN (CDCl ₃) (parcial)	$\delta = 2,21 \text{ (NMe}_2\text{)}, 3,27 \text{ (OMe)} \text{ ppm}$
40	¹³ C-RMN (CDCl ₃) (parcial)	$\delta = 180,0 \text{ (C=O)}, 79,63 \text{ (C}_{11}\text{)}, 76,46 \text{ (C}_{12}\text{)}, 58,7 \text{ (C}_{10}\text{)}, 57,1 \text{ (C}_9\text{)}, 49,4 \text{ (OMe)}, 40,2 \text{ (NMe}_2\text{)} \text{ ppm}$
	¹¹ B-RMN (CDCl ₃)	$\delta = 9,9 \text{ ppm} \quad \omega_{1/2} = 200 \text{ Hz}$
45	TLC	rf = 0,28 (éter de petróleo:acetato de etilo: dietilamina 75:25:10; revelador: etanol/vainillina (ác.sulfúrico))

Ejemplo 2

50 *Preparación de 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-metil-9a-homoeritromicina A*

Se disuelven 50 g de 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-homoeritromicina A en 500 ml de cloroformo y se adiciona una mezcla de 5,5 ml de ácido fórmico y 11,75 ml de formaldehído acuoso al 35-40%. La masa de reacción se calienta a reflujo durante 14 h, y posteriormente se enfría a 15-20°C. Se adicionan 500 ml de agua y se lleva a pH=4 por adición de ácido sulfúrico al 20%. Se agita durante 15 min y se separa la fase orgánica que se desprecia. A la fase acuosa ácida se adicionan 350 ml de cloruro de metileno, y se adiciona sosa 48% hasta pH=9 de la fase acuosa. Se agita 15 min y se separa la fase orgánica inferior. La fase acuosa alcalina se extrae con 2 x 100 ml de cloruro de metileno. Las fases orgánicas se reúnen y se filtra sobre celite, se seca sobre sulfato sódico anhidro y se evapora a sequedad. El residuo obtenido se lava 2 veces con 250 ml de éter etílico, obteniéndose un residuo seco de 29 g de 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-metil-9a-homoeritromicina A.

ES 2 177 373 B1

IR (KBr)	$\nu_{\max} = 3500, 1730, 1470, 1390, 1090, 1070 \text{ cm}^{-1}$
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl ₃) (parcial)	$\delta = 2,00$ (NMe ₂), 2,30 (NMe), 3,37 (OMe) ppm.
5 $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl ₃) (parcial)	$\delta = 179,9$ (C=O), 79,40 (C ₁₁), 77,09 (C ₁₂), 68,84 (C ₉), 64,08 (C ₁₀), 49,36 (OMe), 40,18 (NMe ₂), 34,39 (NMe) ppm
$^{11}\text{B-RMN}$ (CDCl ₃)	$\delta = 10,1$ ppm $\omega_{1/2} = 180$ Hz
10 m/e	$M^+ = 775,5$
TLC	rf = 0,38 (éter de petróleo:acetato de etilo: dietilamina 75:25:10; revelador: etanol/vainillina (ác.sulfúrico)

15 Ejemplo 3

Hidrólisis de 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-metil-9a-homoeritromicina A. Síntesis de 9-desoxo-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A (Azitromicina)

20 Se disuelven 22 g de 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-metil-9a-homoeritromicina A en 250 ml de acetonitrilo y se adicionan 125 ml de agua. Se adiciona ácido sulfúrico 20 % hasta pH=2 y se mantiene la agitación durante 30 min. Se descarga la disolución ácida sobre una mezcla de 350 ml de cloruro de metileno y 350 ml de agua, adicionado sosa 48 % de manera inmediata hasta que el pH de la fase acuosa es 9. Se agita 15 min y se separa la fase orgánica inferior. La fase acuosa
25 alcalina se extrae con 2 x 100 ml de cloruro de metileno. Se reúne el cloruro de metileno, se filtra sobre celite y se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en 50 ml de etanol y se adicionan durante 30 min 60 ml de agua. Se deja precipitar durante 2 h, se filtra y se seca a vacío y 40°C para dar 15 g de 9-desoxo-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A (Azitromicina).

30 IR (KBr)	$\nu_{\max} = 3500, 3000, 2970, 1740, 1470, 1380, 1280, 1060 \text{ cm}^{-1}$
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl ₃) (parcial)	$\delta = 2,31$ (NMe ₂), 2,34 (NMe), 3,38 (OMe) ppm
35 $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl ₃) (parcial)	$\delta = 178,9$ (C=O), 73,08 (C ₁₂), 72,32 (C ₁₁), 69,88 (C ₉), 62,43 (C ₁₀), 49,37 (OMe), 40,23 (NMe ₂), 35,92 (NMe) ppm
m/e	$M^+ = 775,5$
40 HPLC	corresponde según USP XXIII (Farmacopea de los Estados Unidos XXIII)
TLC	rf = 0,62 (éter de petróleo:acetato de etilo: dietilamina 75:25:10; revelador: etanol/vainillina (ác.sulfúrico)

45 Ejemplo 4

Preparación de 9-desoxo-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A no cristalina

50 Se disuelven 5 g de azitromicina monohidrato cristalina en 25 ml de *tert*-butanol calentado a 30°C. La disolución se filtra. Se solidifica la mezcla mediante un baño frío y se sublima el disolvente a temperatura ambiente y 10⁻² mm Hg. El sólido obtenido se seca (80 mm Hg/40°C) para dar 5 g de azitromicina no cristalina.

IR (KBr)	$\nu_{\max} = 3500, 1740, 1470, 1280, 1268, 1257 \text{ cm}^{-1}$ (véase la Figura 1)
55 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl ₃) (parcial), $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl ₃) (parcial), m/e, TLC, y HPLC	idénticos a los del compuesto del Ejemplo 3.
%H ₂ O (K.F.) = 3,0 %	
60 DSC = Véase el termograma mostrado en la Figura 2.	
DRX = Véase el espectro mostrado en la Figura 3.	

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de 9-desoxo-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A (Azitromicina) en su forma no cristalina, **caracterizado** porque se liofiliza una disolución de azitromicina en un alcohol alifático o en un éter cíclico.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se liofiliza una disolución de azitromicina en *tert*-butanol.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se liofiliza una disolución de azitromicina en 1,4-dioxano.

4. Un procedimiento para la preparación de 9-desoxo-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A (Azitromicina) en su forma no cristalina que comprende:

a) hidrolizar 11,12-hidrógenoortoborato de 9-desoxo-9a-aza-11,12-desoxi-9a-metil-9a-homoeritromicina A en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, acetonitrilo, etanol o metanol, por la acción de un ácido diluido, tal como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido oxálico, a temperatura ambiente, en un rango de pH comprendido entre 2 y 4, para obtener azitromicina,

b) disolver la azitromicina en *tert*-butanol, y

c) liofilizar la disolución de azitromicina en *tert*-butanol.

Figura 1

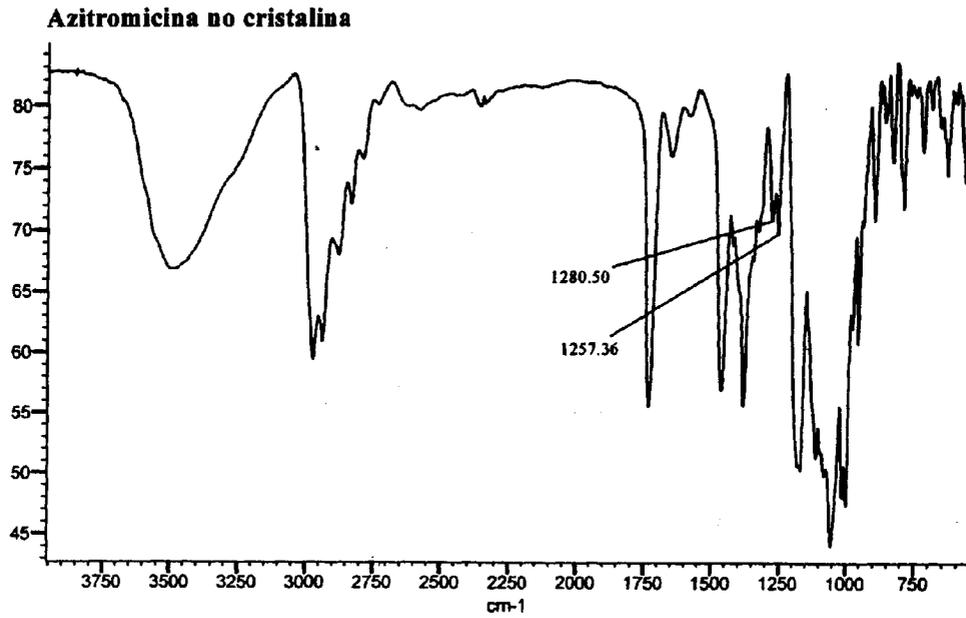


Figura 1A

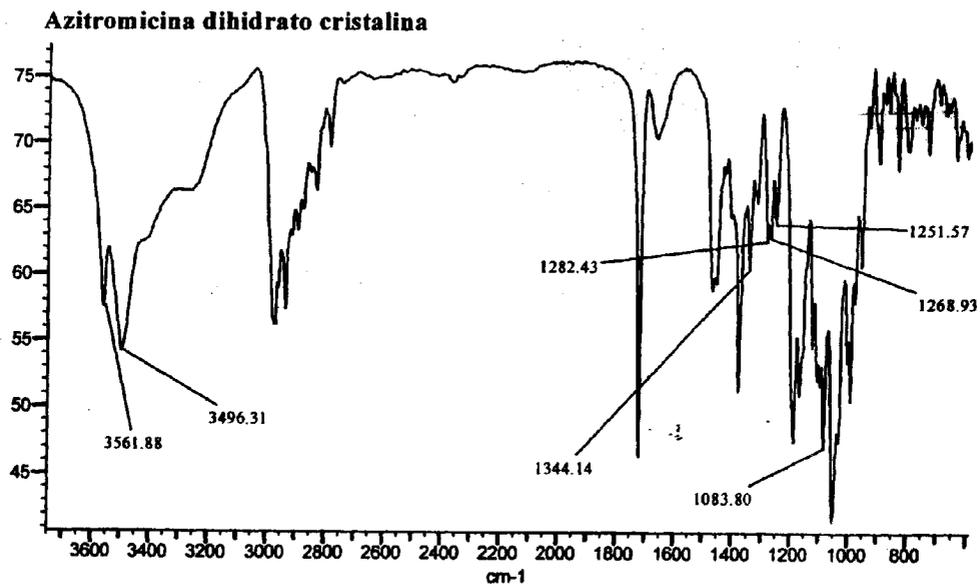


Figura 1B

Figura 2

Termograma de Azitromicina no cristalina

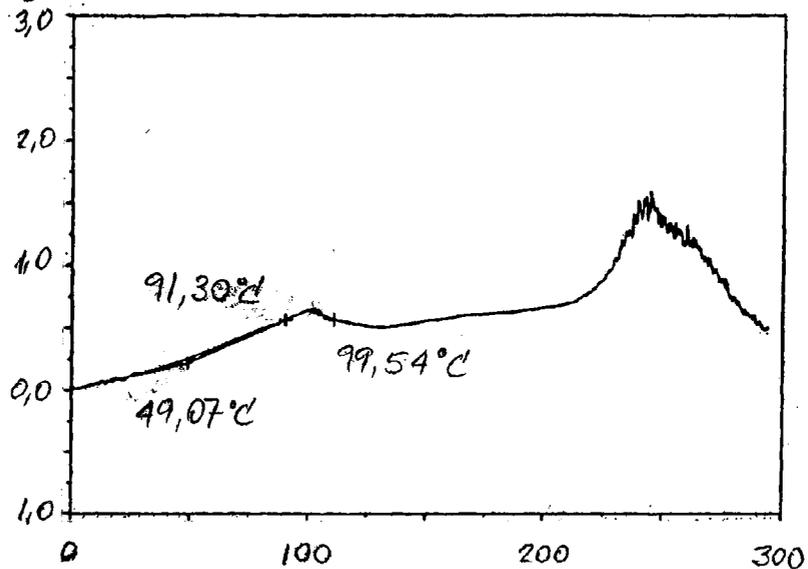


Figura 2A

Termograma de Azitromicina cristalina dihidrato

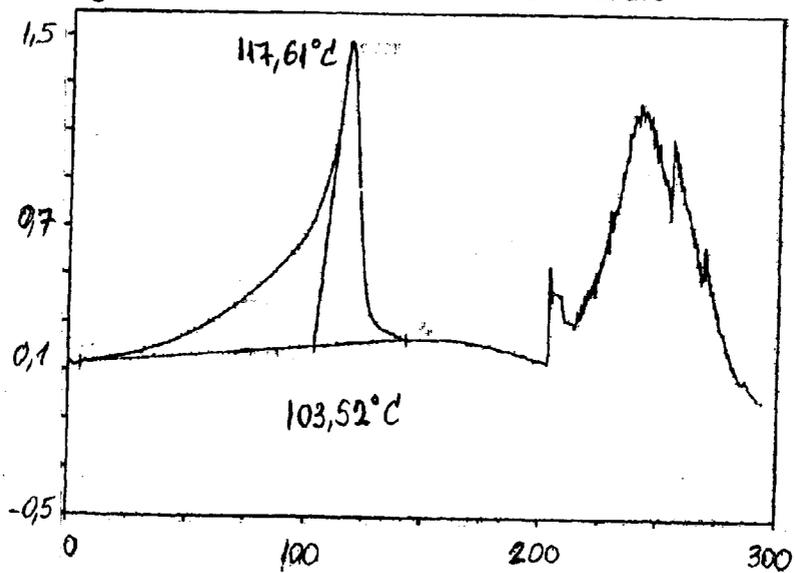


Figura 2B

Figura 3

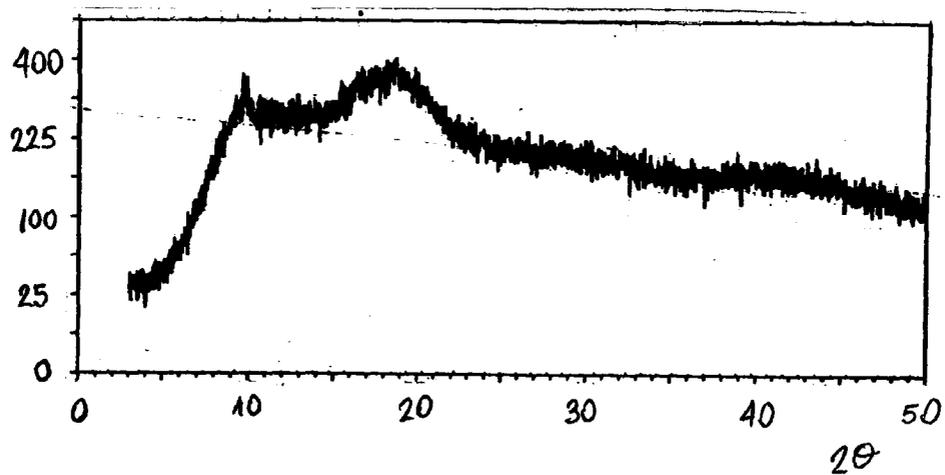


Figura 3A

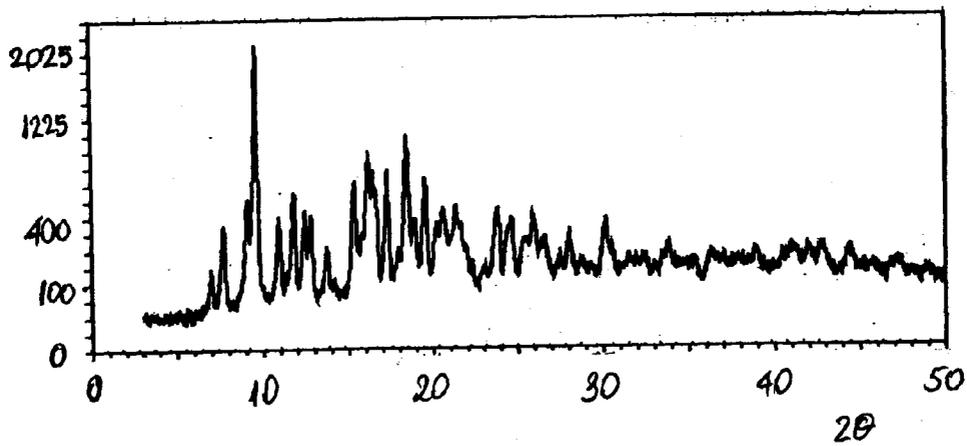


Figura 3B



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 177 373
② N.º solicitud: 009902620
③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.1999
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C07H 17/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 298650 A (PFIZER) 11.01.1989, todo el documento.	1-4
A	EP 827965 A (ASTUR PHARMA S.A.) 11.03.1998, reivindicaciones 1-7; página 8; figura 2.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

08.10.2002

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/1