

2F



**Industria y Comercio**

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

**PCT**  
SOLICITUD

**PATENTE DE INVENCION**

EXPEDIENTE No.

**06-23325**

**TÍTULO** Formas Polimórficas Ripaximina  
como antibióticos

**CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** COD 498/22 A61k  
31/437, A61P 31/04

**SOLICITANTE** Alfa Wassermann S. P. A.

**DOMICILIO** Alanno (PE), Italia.

**APODERADO** Delia Maria Rodríguez P' Alaman

**BOGOTÁ, D. C.,** Marzo 8/06.

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**  
**PCT**

**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

07-06-2006

|                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) <b>SOLICITUD DE:</b>                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I.                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <input type="checkbox"/> Capítulo II.                  |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 2) <b>SOLICITANTE</b><br>(71)                                                                                                                                         | <b>Nombre:</b> ALFA WASSERMANN<br><b>S.P.A.</b><br><b>Dirección:</b> Contrada S. Emidio, I-65020 Alanno, (PE), Italia<br><b>Nacionalidad o domicilio:</b> Alanno, (PE), Italia<br><b>Lugar de constitución:</b> Italia                                                                                                             |                                                        | <b>IDENTIFICACIÓN</b><br><b>C.C.</b> <input type="checkbox"/> <b>NIT:</b> <input type="checkbox"/><br><b>C.E.</b> <input type="checkbox"/> <b>OTRO</b> <input type="checkbox"/><br><b>NÚMERO</b> <u>Cual</u>                                    |
|                                                                                                                                                                       | <b>Teléfono:</b> <b>Fax:</b><br><b>E. Mail:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 3) <b>REPRESENTANTE APODERADO</b>                                                                                                                                     | <b>Nombre:</b> DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN<br><b>Dirección:</b> Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C.<br><b>Teléfono:</b> 6181088 <b>Fax:</b> 6350824<br><b>E. Mail:</b> info@clarkemodet.com.co                                                                                                                              |                                                        | <b>IDENTIFICACIÓN</b><br><b>C.C.</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>NIT:</b> <input type="checkbox"/><br><b>C.E.</b> <input type="checkbox"/> <b>OTRO</b> <input type="checkbox"/><br><b>NÚMERO:</b> 41.654.882<br><b>TP:</b> 20824 CSJ |
|                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4) <b>INVENTOR (ES)</b><br>(72)                                                                                                                                       | <b>Nombre:</b> 1. VISCOMI, Giuseppe, C.; 2. CAMPANA, Manuela; 3. BRAGA, Darlo; 4. CONFORTINI, Donatella; 5. CANNATA, Vincenzo; 6. RIGHI, Paolo; 7. ROSINI, Goffredo<br><b>Dirección:</b> Todos los anteriores: Via Ragazzi del 99, 5, I-40133 Bologna, Italia.<br><b>Nacionalidad o Domicilio:</b> Todos los anteriores, Italianos |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 5) <b>PCT (86)</b><br>Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/012490 / Fecha: Nov. 4, 2004 /<br>Publicación Internacional No. WO2005/044823 A2 / Fecha: May 19, 2005 / |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 6) <b>Título (54)</b> FORMAS POLIMORFICAS DE RIFAXIMINA COMO ANTIBIOTIC S                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7) <b>Clasificación Internacional:</b> C07D 498/22, A61K 31/437, A61P 31/04                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 8) <b>PRIORIDAD</b>                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 33) <b>País de Origen</b>                              | (32) <b>Fecha</b>                                                                                                                                                                                                                               |
| SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Italia /                                               | Nov. 7, 2003 /                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | (31) <b>Número de Solicitud</b><br>MI2003A002144 /     |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 9) <b>Comprobante de pago N°</b> 06-14,121 <b>Fecha:</b> Feb. 20, 2006                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                 |

*(B)*

✓

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO  
Radicación : 0642325 00000000 Foliow 81  
Fecha (PUB) : 2006-02-20 16:30:56  
Trámite : 011 PCI-PATENT 370 FASE MARCA 401 PRESENTAC  
Dependencia: 2003 DIVISION DE MARCAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 14,121  
FECHA : FEBRERO 20 DE 2006

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE               | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PAGO | Vr. PAGO     |
|---------------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|--------------|
| CLARKE NODET Y CO. COLOMB | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 49043310 | 20/02/2006 | 6,658,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|-------------------------------------|----------------|
| 1     | 50003-01-01 | SOLICITUDES                         |                |
|       |             | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 463,000.00     |
|       |             | TOTAL :                             | \$ 463,000.00  |

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

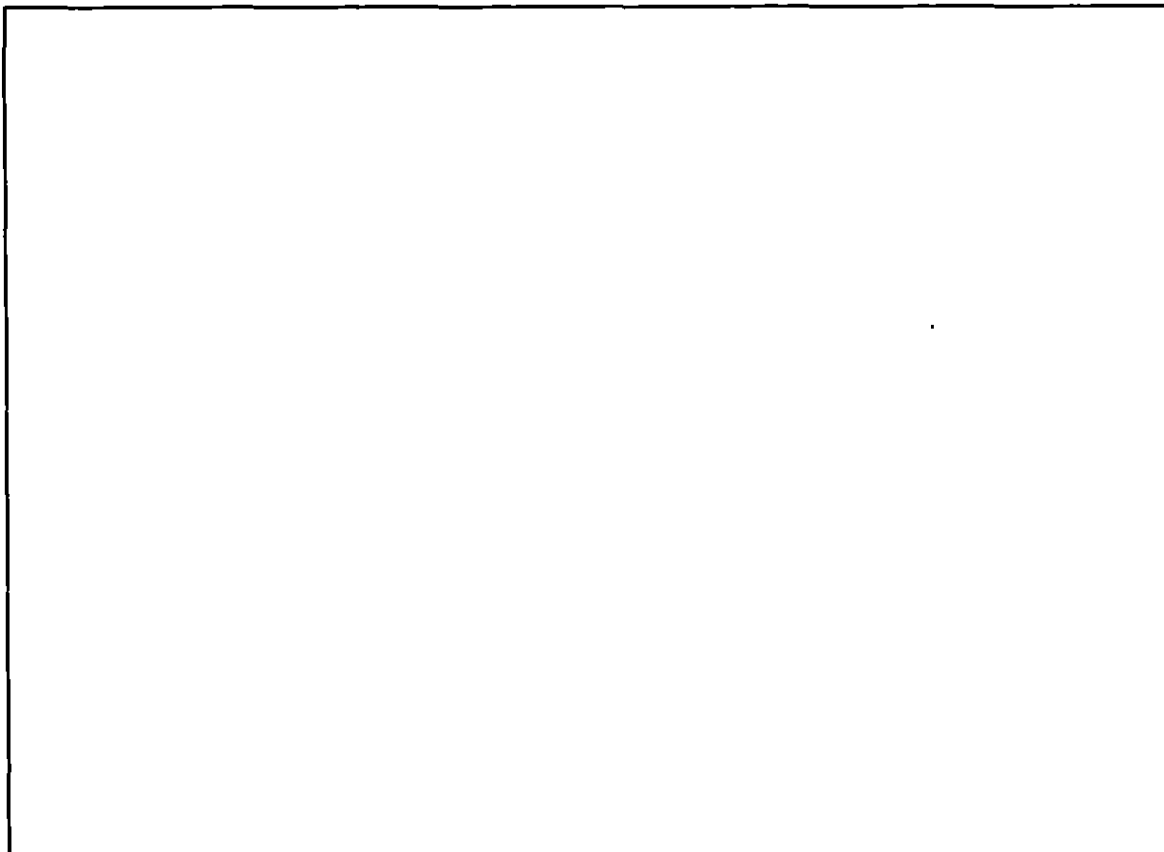
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

10)

**ANEX S**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
  - ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
  - ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
  - ☒ Poderes, si fuera el caso
  - ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
  - ☐ Declaraciones
  - ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
  - ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
  - ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
  - ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
  - ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
  - ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
  - ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
  - ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
  - ☒ Otros:
1. Reporte internacional de búsqueda

**11) FIGURA CARACTERÍSTICA:**



**12) Solicitud concesión de la patente,**

**NOMBRE:** DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

**FIRMA:**

C.G. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

**Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página**



## **FORMAS POLIMORFICAS DE RIFAXIMINA C M ANTIBIOTICOS**

La presente invención se refiere a formas polimórficas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  de rifaximina, a los procedimientos para su preparación y a su uso en la elaboración de preparaciones medicinales para la administración vía oral o tópica.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 La rifaximina (INN; véase The Merck Index, XIII ed., 8304) es un antibiótico que pertenece a la clase de las rifamicinas, específicamente se trata de una pirido-imidazo rifamicina que se describe y reclama en la Patente de Italia IT 1154655, aunque la Patente Europea EP 0161534 describe y reclama un procedimiento para su producción a partir de rifamicina O (The  
15 Merck Index, XIII ed., 8301).

En ambas patentes se describe la purificación de rifaximina de forma genérica mediante la cristalización en solventes o sistemas de solventes adecuados y muestran brevemente en algunos ejemplos que el producto resultante puede ser cristalizado a partir de una mezcla 7:3 de  
20 alcohol etílico/agua y se puede secar tanto bajo presión atmosférica como bajo vacío. En ninguna de estos documentos se describen las condiciones experimentales de la cristalización y el secado, ni tampoco las características cristalográficas distintivas del producto resultante.

A  
5

La presencia de diferentes polimorfos era desconocida previamente y por ello las condiciones experimentales descritas en ambas patentes fueron desarrolladas para obtener un producto homogéneo con un grado de pureza adecuado desde un punto de vista químico, además de los  
5 aspectos cristalográficos del producto propiamente dicho.

Ahora se ha encontrado, inesperadamente, que existen algunas formas polimórficas de rifaximina cuya formación depende, además del solvente, de las condiciones de tiempo y temperatura a las cuales se llevan a cabo tanto la cristalización como el secado.

10 Estas formas polimórficas ordenadas se identificarán en adelante como rifaximina  $\alpha$  (figura 1) y rifaximina  $\beta$  (figura 2) sobre la base de sus respectivos difractogramas específicos, en tanto la forma pobremente cristalina con un alto contenido de componentes amorfos se identificará como rifaximina  $\gamma$  (figura 3) en la presente solicitud.

15 Las formas polimórficas de rifaximina fueron caracterizadas usando la técnica de difracción de polvo de rayos X.

La identificación y caracterización de estas formas polimórficas y, al mismo tiempo, la definición de las condiciones experimentales para obtenerlas son muy importantes para un compuesto dotado de actividad  
20 farmacológica que, como la rifaximina, es comercializado como una preparación medicinal para uso en seres humanos así como en veterinaria. Se sabe que el polimorfismo de un compuesto que se puede utilizar como principio activo contenido en una preparación medicinal puede afectar las

propiedades farmacotoxicológicas del fármaco. Las diferentes formas polimórficas de un principio activo administrado como fármaco en la forma oral o tópica pueden modificar muchas de sus propiedades, como la biodisponibilidad, solubilidad, estabilidad, color, capacidad de compresión, fluidez y maleabilidad con la consiguiente modificación de los perfiles de seguridad toxicológica, eficiencia clínica y eficacia productiva.

Lo mencionado anteriormente queda confirmado por el hecho que las autoridades que reglamentan la concesión de la autorización para la comercialización de fármacos en el comercio requiere la normalización y el control de los métodos de elaboración de los principios activos de manera tal que permitan obtener resultados homogéneos y coherentes en términos del polimorfismo de los lotes de producción (CPMP/QWP/96, 2003: Note for Guidance on Chemistry of new Active Substance; CPMP/ICH/367/96: Note for guidance specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances; Fecha de entrada en vigencia: mayo de 2000).

La necesidad de la normalización mencionada precedentemente se ha fortalecido en el campo de los antibióticos rifamicina, según Henwood S.Q., de Villiers M.M., Liebenberg W. y Lötter A.P., Drug Development and Industrial Pharmacy, 26 (4), 403-408, (2000), quienes han determinado que los diferentes lotes de producción de rifampicina (INN) elaborados por los distintos proveedores presentan características polimorfas diferentes, y en

consecuencia presentan perfiles de disolución diferentes junto con la consecuente alteración de las respectivas propiedades farmacológicas.

Con la aplicación de los procedimientos de cristalización y secado que se describieron genéricamente en las patentes IT 1154655 y EP 0161534 se ha encontrado que bajo ciertas condiciones experimentales se obtiene la forma pobremente cristalina de rifaximina, aunque bajo otras condiciones experimentales se obtienen las otras formas cristalinas polimórficas de rifaximina. Más aún, se ha encontrado que algunos parámetros, que no se describieron en absoluto en las patentes mencionadas precedentemente, por ejemplo las condiciones de conservación y la humedad relativa del ambiente, tienen un efecto inesperado para determinar la forma del polimorfo.

Las formas polimórficas de rifaximina que son el objeto de la presente solicitud no se han observado o propuesto, según se asume en general que siempre se iba a obtener un solo producto homogéneo independientemente del método elegido dentro de la escala de las condiciones descritas, sin tener en cuenta las condiciones empleadas para la cristalización, el secado y la conservación.

Ahora se ha encontrado que la formación de las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  depende de la presencia de agua en el solvente de cristalización, de la temperatura a la cual se cristaliza el producto y de la cantidad de agua presente en el producto al finalizar la fase de secado.

Se han sintetizado la forma  $\alpha$ , la forma  $\beta$  y la forma  $\gamma$  de rifaximina y constituyen el objeto de la presente invención.

Más aún, se ha encontrado que la presencia de agua en rifaximina en estado sólido es reversible, de modo que la absorción y/o cesión  
5 de agua puede tener lugar bajo condiciones ambientales adecuadas; en consecuencia, la rifaximina es susceptible a una transición de una forma a otra, permaneciendo también en el estado sólido, sin necesidad de disolución y cristalización. Por ejemplo, cuando el polimorfo  $\alpha$  absorbe agua por hidratación hasta alcanzar un contenido mayor que un 4.5%, se convierte en  
10 el polimorfo  $\beta$ , el cual, a su vez, se convierte en el polimorfo  $\alpha$  por secado hasta alcanzar un contenido de agua menor que un 4.5%.

Estos resultados son de una destacada importancia ya que determinan las condiciones de la fabricación industrial para algunos pasos de trabajo que no habían sido consideradas críticas para la determinación del  
15 polimorfismo de un producto, por ejemplo, el lavado de un producto cristalizado, las condiciones de conservación del producto final, o las características del contenedor en el cual se conserva el producto.

La rifaximina ejerce su amplia actividad antibacterial en el tracto gastrointestinal contra bacterias gastrointestinales localizadas que provocan  
20 diarrea infecciosa, incluyendo cepas anaeróbicas. Se ha informado que la rifaximina se caracteriza mediante una absorción sistémica insignificante, debido a sus características químicas y físicas (*Descombe J.J. et al.*

*Pharmacokinetic study of rifaximin after oral administration in healthy volunteers. Int J Clin Pharmacol Res, 14 (2), 51-56, (1994)).*

Ahora se ha encontrado que el nivel de adsorción sistémica de rifaximina se puede modular, y ésta es parte de la presente invención, al  
5 administrar distintas formas polimórficas de rifaximina, a decir rifaximina  $\alpha$ , rifaximina  $\beta$  y rifaximina  $\gamma$ . Es posible tener una diferencia en la adsorción de casi 600 veces en la escala de 0.001 a 1  $\mu\text{g/ml}$  en la sangre.

La diferencia evidenciada en la biodisponibilidad es importante debido a que puede diferenciar el comportamiento farmacológico y  
10 toxicológico de los tres polimorfos de rifaximinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

Como un hecho, la rifaximina  $\alpha$  y rifaximina  $\beta$  se absorben de manera insignificante a través de la vía oral, mientras que la rifaximina  $\gamma$  muestra una absorción media.

Las rifaximinas  $\alpha$  y  $\beta$ , que no se absorben prácticamente,  
15 podrían actuar solamente a través de una acción tópica, incluyendo el caso del tracto gastrointestinal, con la ventaja de tener una muy baja toxicidad.

Por otra parte, la rifaximina  $\gamma$ , que es absorbida medianamente, puede encontrar un uso conveniente contra los microorganismos sistémicos, al tener la capacidad para esconderse y eludir parcialmente la acción de los  
20 antibióticos tópicos.

Con respecto a los posibles casos adversos acoplados al uso terapéutico de rifaximina de importancia particular es la inducción de resistencia bacterial a los antibióticos.

En general, en la práctica terapéutica con antibióticos se puede presentar la resistencia bacterial a los mismos u otros antibióticos cuando surgen cepas resistentes. En el caso de rifaximina, este aspecto es particularmente importante, debido a que la rifaximina pertenece a la familia de las rifamicinas, un miembro de la cual, la rifampicina, se usa ampliamente en el tratamiento de la tuberculosis. El tratamiento común de curso corto de la tuberculosis es una terapia de combinación que involucra cuatro ingredientes farmacéuticos activos: rifampicina, isoniazida, etambutol y pirazinamida, la rifampicina realiza una función importante. Por lo tanto, cualquier fármaco que pone en peligro la eficacia de la terapia al seleccionar la resistencia a rifampicina podría ser nocivo. (Krømer L. et al. "Re-emergence of tuberculosis: strategies and treatment", *Expert Opin. Investig. Drugs*, **11** (2), 153-157, (2002)).

En principio, considerando la similitud estructural entre la rifaximina y rifampicina, el uso de rifaximina podría inducir la selección de las cepas resistentes de *M. tuberculosis* y resistencia cruzada a la rifampicina. Con el fin de evitar este caso negativo, es crucial tener un control de la cantidad de rifaximina absorbida sistémicamente.

Desde este punto de vista, la diferencia encontrada en la absorción sistémica de las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  es significativa, debido a que también en la concentración sub-inhibidora de rifaximina, tal como en la escala de 0.1 a 1  $\mu\text{g/ml}$ , la selección de mutantes resistentes se ha demostrado que es posible (Marchese A et al. *In vitro activity of rifaximin*,

*metronidazole and vancomycin against clostridium difficile and the rate of selection of spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species. Chemotherapy, 46(4), 253-266, (2000)).*

5                   Lo establecido anteriormente muestra claramente la importancia de las formas polimórficas de rifaximina de la presente invención, y de los varios procedimientos industriales de la misma para la preparación de formas sencillas puras que tienen diferentes propiedades farmacológicas.

10                   De acuerdo a lo establecido anteriormente, la importancia de la presente invención, que lleva al conocimiento de la existencia de las formas polimórficas de rifaximina mencionadas anteriormente y de varias vías industriales para la elaboración de formas sencillas puras que tienen diferentes propiedades farmacológicas, se consolida claramente.

15                   Las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  mencionadas previamente se pueden utilizar ventajosamente como productos puros y homogéneos en la elaboración de las preparaciones medicinales que contienen rifaximina.

20                   Como ya se indicó previamente, el procedimiento de elaboración industrial de rifaximina a partir de rifamicina O que se describe y reclama en EP 0161534 es deficiente desde el punto de vista de la purificación e identificación del producto obtenido; también presenta algunas limitaciones desde el punto de vista sintético con respecto, por ejemplo, a los tiempos de reacción muy prolongados, de 16 a 72 horas, que son inadecuados para el

uso industrial y más aún porque no proporcionan una reducción in situ de la rifaximina oxidada que se puede formar dentro de la mezcla de reacción.

Por ello, un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento mejorado para la elaboración industrial de las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de rifaximina reclamadas en la presente como productos y utilizables como principios activos definidos y homogéneos en la elaboración de preparaciones medicinales que contengan dicho principio activo.

### **DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION**

10

La presente invención se refiere a la forma  $\alpha$ , la forma  $\beta$  y la forma  $\gamma$  del antibiótico conocido como rifaximina (INN), los procedimientos para su producción y el uso de las mismas en la elaboración de preparaciones medicinales para una administración por vía oral o tópica.

15

El procedimiento de la presente invención comprende la reacción de un equivalente molar de rifamicina O con un exceso de 2-amino-4-metilpiridina, preferentemente entre 2.0 y 3.5 equivalentes molares, en una mezcla de solventes conformada por agua y alcohol etílico en relaciones volumétricas que comprenden entre 1:1 y 2:1, por un período de tiempo entre 2 y 8 horas a una temperatura entre 40 °C y 60 °C.

20

Al final de la reacción, se permite que la masa de reacción se enfríe a la temperatura ambiente y se agrega con una solución de ácido ascórbico en una mezcla de agua, alcohol etílico y ácido clorhídrico acuoso

concentrado, bajo agitación fuerte, con el fin de reducir la pequeña cantidad de rifaximina oxidada que se formó durante la reacción. Finalmente el pH se lleva a un valor de 2.0 aproximadamente por adición de una solución acuosa concentrada de ácido clorhídrico, con el fin de poder eliminar mejor el exceso de 2-amino-4-metilpiridina utilizado en la reacción. La suspensión se filtra y el sólido obtenido se lava con la misma mezcla de solventes de agua/alcohol etílico que se utilizó en la reacción. Dicho producto semiterminado se denomina "rifaximina cruda".

La rifaximina cruda puede ser sometida directamente al paso siguiente de purificación. Como alternativa, si se debe conservar el producto semiterminado por un tiempo prolongado, es posible secar la rifaximina cruda bajo vacío a una temperatura menor que 65 °C por un período de tiempo entre 6 y 24 horas, y dicho producto semiterminado se denomina "rifaximina cruda seca".

La rifaximina cruda y/o rifaximina cruda seca obtenida es purificada por disolución en alcohol etílico a una temperatura entre 45 °C y 65 °C, seguido por cristalización por adición de agua, preferentemente en cantidades en peso entre 15% y 70% con respecto a la cantidad en peso del alcohol etílico utilizado para la disolución, y manteniendo la suspensión obtenida a una temperatura entre 50 °C y 0 °C bajo agitación durante un período de tiempo entre 4 y 36 horas.

Se filtra la suspensión y el sólido obtenido se lava con agua y se seca bajo vacío o bajo condiciones de presión normal, con o sin un agente de

secado, a una temperatura entre temperatura ambiente y 105 °C por un período de tiempo entre 2 y 72 horas.

La obtención de las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  depende de las condiciones seleccionadas para la cristalización. En particular, se ha podido comprobar  
5 que es crítica la composición de la mezcla de solventes a partir de la cual se realiza la cristalización, la temperatura a la cual se mantiene la mezcla de reacción después de la cristalización y el período de tiempo al que se mantiene dicha temperatura.

Más precisamente, se obtiene rifaximina  $\gamma$  cuando la solución se  
10 lleva a una temperatura entre 28 °C y 32 °C para comenzar la precipitación y luego se enfría aún más la suspensión obtenida hasta 0 °C y se mantiene a esta temperatura por un período de tiempo entre 6 y 24 horas.

La suspensión se filtra, el sólido se lava con agua desmineralizada y se seca hasta alcanzar un contenido de agua entre 1.0% y  
15 2.0%.

Las rifaximinas  $\alpha$  y  $\beta$  se obtienen cuando la temperatura se lleva primero a un valor entre 28 °C y 32 °C para comenzar la cristalización, a continuación la suspensión se lleva a una temperatura entre 40 °C y 50 °C y se mantiene en este valor por un período de tiempo entre 6 y 24 horas, luego  
20 se enfría rápidamente la suspensión hasta 0 °C, sobre un período de tiempo entre 15 minutos y una hora, entonces se filtra, el sólido se lava con agua y después se seca.

El paso de secado constituye una parte importante en la obtención de las formas polimórficas  $\alpha$  y  $\beta$  de la rifaximina y debe ser comprobado utilizando para ello un método adecuado para determinar la dosificación de agua, tal como el método de Karl Fisher, con el fin de verificar

5 la cantidad de agua remanente presente en el producto bajo secado.

La rifaximina  $\alpha$  o rifaximina  $\beta$  se obtienen por el secado a diferentes contenidos de agua al final, siendo mayores o menores que un 4.5%, y no dependiendo de las condiciones experimentales de presión y temperatura a las cuales se alcanzan estos contenidos de agua críticos. De

10 hecho, las dos formas polimórficas, con mayor o menor contenido de agua, se pueden obtener por secado bajo vacío o a presión atmosférica, a temperatura ambiente o a temperaturas altas, opcionalmente en presencia de agentes de secado, siempre que el secado se haya realizado por el tiempo necesario para alcanzar el contenido de agua característico para cada forma polimórfica.

15 La forma polimórfica  $\beta$  se obtiene cuando el secado del producto, cristalizado y lavado con agua, se detiene a contenidos de agua mayores que un 4.5%, según mediciones con el método de Karl Fisher, preferentemente entre 5.0% y 6.0%, aunque la forma polimórfica  $\alpha$  se obtiene continuando con el secado hasta alcanzar contenidos de agua inferiores al 4.5%,

20 preferentemente entre 2.0% y 3.0%.

Tanto la forma  $\gamma$  como las formas  $\alpha$  y  $\beta$  de rifaximina son higroscópicas, es decir que absorben agua de manera reversible en presencia

de condiciones ambientales adecuadas de presión y humedad y son susceptibles de transformación de una forma en la otra.

La forma polimórfica  $\alpha$  conservada en un ambiente con una humedad relativa mayor que un 50% por un período de tiempo entre 12 y 48 horas, se convierte en la forma polimórfica  $\beta$ , que a su vez, por secado se convierte en la forma polimórfica  $\alpha$  hasta alcanzar un contenido de agua inferior al 4.5%, preferentemente entre un 2.0% y 3.0%.

Otro tipo de transición tiene lugar entre la forma  $\gamma$  y las formas  $\alpha$  y  $\beta$ , dependiendo de las temperaturas que se mantuvieron durante la fase de precipitación de rifaximina.

En particular, la forma  $\gamma$  se convierte en las formas  $\alpha$  o  $\beta$  manteniendo una suspensión de la forma  $\gamma$  de rifaximina en una mezcla de solventes de alcohol etílico/agua 7:3 (V/V) a una temperatura entre 38 °C y 50 °C con agitación fuerte por un período de tiempo prolongado, preferentemente entre 6 y 36 horas.

Después de la filtración y el lavado con agua desmineralizada, el secado hasta alcanzar un contenido de agua mayor que un 4.5%, preferentemente entre 5.0% y 6.0%, dan como resultado la forma polimórfica  $\beta$ , en tanto si se continúa con el secado hasta alcanzar un contenido de agua menor que un 4.5%, preferentemente entre 2.0% y 3.0%, da como resultado la forma  $\alpha$ .

Las rifaximinas  $\alpha$  y  $\beta$  se pueden convertir, a su vez, en rifaximina  $\gamma$  por disolución en alcohol etílico y tratamiento de la solución resultante como se describió precedentemente para la preparación de la forma  $\gamma$ .

Estas transiciones de una forma en otra son muy importantes para la invención, porque pueden proveer un procedimiento de elaboración alternativo para obtener la forma deseada para la producción de las preparaciones medicinales. Por ello es que el procedimiento que permite la conversión de rifaximina  $\gamma$  en rifaximina  $\alpha$  o  $\beta$  de una manera aceptable a nivel industrial, el procedimiento que permite la conversión de rifaximina  $\alpha$  o  $\beta$  en rifaximina  $\gamma$  de una manera aceptable a nivel industrial, el procedimiento que permite la conversión de rifaximina  $\alpha$  en rifaximina  $\beta$  de una manera aceptable a nivel industrial o viceversa rifaximina  $\beta$  en rifaximina  $\alpha$ , constituyen partes importantes de la invención.

El procedimiento referido a la transformación de rifaximina  $\gamma$  en rifaximina  $\alpha$  o rifaximina  $\beta$  comprende la suspensión de rifaximina  $\gamma$  en una mezcla de solventes de alcohol etílico/agua en una relación volumétrica de 7:3, el calentamiento de la suspensión hasta alcanzar una temperatura entre 38 °C y 50 °C y manteniéndola a esta temperatura bajo agitación fuerte por un período de tiempo entre 6 y 36 horas. Después se filtra la suspensión, el sólido se lava con agua y se seca dando como resultado la forma polimórfica  $\beta$  cuando dicho secado se lleva a cabo hasta alcanzar un contenido de agua entre 5.0% y 6.0% medido con el método de Karl Fisher y dando como

resultado la forma polimórfica  $\alpha$  cuando se continúa con dicho secado hasta alcanzar un contenido de agua entre 2.0% y 3.0%.

El procedimiento para la preparación de la forma  $\gamma$  a partir de rifaximina  $\alpha$  o  $\beta$  comprende la disolución de la forma  $\alpha$  o  $\beta$  en alcohol etílico con agitación, a una temperatura entre 50 °C y 60 °C, la adición de agua desmineralizada hasta alcanzar una relación volumétrica de alcohol etílico/agua de 7:3, el enfriamiento de la solución bajo agitación fuerte hasta 30 °C, el enfriamiento del precipitado hasta 0 °C y el mantenimiento de la suspensión bajo agitación a 0 °C por un período de tiempo entre 6 y 24 horas.

10 Luego se filtra la suspensión, el sólido se lava con agua y se seca hasta alcanzar un contenido de agua menor que un 2.0%, con lo cual se obtiene rifaximina  $\gamma$ .

El procedimiento para la transformación de la forma  $\alpha$  en la forma  $\beta$  consiste en mantener la rifaximina  $\alpha$ , en la forma de un polvo, en un entorno ambiental con una humedad relativa mayor que un 50% por el período de tiempo necesario, en general entre 12 y 48 horas, con el fin de alcanzar un contenido de agua en el polvo mayor que un 4.5%.

15

El procedimiento referido a la transformación de la forma  $\beta$  en la forma  $\alpha$  consiste en someter el polvo de rifaximina  $\beta$  a un procedimiento de secado bajo vacío o bajo condiciones de presión normal, con o sin un agente de secado, a una temperatura entre temperatura ambiente y 105 °C, por un período de tiempo entre 2 y 72 horas, con el fin de alcanzar un contenido de agua en el polvo menor que 4.5%, preferentemente entre 2.0% y 3.0%.

20

A partir de la descripción anterior, queda aclarado que durante la fase de conservación del producto se debe tener especial cuidado para que las condiciones ambientales no cambien el contenido de agua del producto, conservando el producto en un ambiente de humedad controlada o en  
5 contenedores cerrados que no permiten un intercambio significativo de agua con el entorno ambiental externo.

El polimorfo rifaximina  $\alpha$  está caracterizado por un contenido de agua menor que 4.5%, preferentemente entre 2.0% y 3.0% y por un difractograma de polvo por rayos X (se muestra en la figura 1) que presenta  
10 | picos en los valores de ángulos de difracción  $2\theta$  de 6.6°; 7.4°; 7.9°; 8.8°; 10.5°; 11.1°; 11.8°; 12.9°; 17.6°; 18.5°; 19.7°; 21.0°; 21.4°; 22.1°. El polimorfo denominado rifaximina  $\beta$  está caracterizado por un contenido de agua mayor que 4.5%, preferentemente entre 5.0% y 6.0%, y por un difractograma de polvo por rayos X (se muestra en la figura 2) que presenta picos en los valores  
15 de ángulos de difracción de  $2\theta$  de 5.4°; 6.4°; 7.0°; 7.8°; 9.0°; 10.4°; 13.1°; 14.4°; 17.1°; 17.9°; 18.3°; 20.9°.

El polimorfo denominado rifaximina  $\gamma$  está caracterizado por un difractograma de polvo por rayos X mucho más pobre debido a la pobre cristalinidad; los picos significativos se observan en los valores de ángulos de  
20 difracción de  $2\theta$  de 5.0°; 7.1°; 8.4°, tal como se muestra en la figura 3.

Los difractogramas se llevaron a cabo con el instrumento Philips X'Pert equipado con geometría Bragg-Brentano y bajo las siguientes condiciones de trabajo:

**Tubo de rayos X: Cobre**

**Radiación utilizada: K ( $\alpha_1$ ), K ( $\alpha_2$ )**

**Tensión y corriente del generador: 40 KV, 40 mA**

**Monocromador: Grafito**

**5 Tamaño del paso: 0.02**

**Tiempo por paso: 1.25 segundos**

**Valor angular  $2\theta$  inicial y final:  $3.0^\circ$  a  $30.0^\circ$**

**La evaluación del contenido de agua presente en las muestras analizadas siempre se llevó a cabo utilizando el método de Karl Fisher.**

**10 La rifaximina  $\alpha$ , rifaximina  $\beta$  y rifaximina  $\gamma$  difieren significativamente entre sí y también en términos de biodisponibilidad y disolución intrínseca.**

**Un estudio de biodisponibilidad de los tres polimorfos se lleva a cabo en perros hembra de raza Beagle, éstos se alimentan oralmente con una**  
**15 dosis de 100 mg/kg de uno de los polimorfos, se recolectan muestras de sangre de la vena yugular de cada uno de los animales antes de cada dosificación y 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de cada dosificación, se transfieren las muestras en tubos que contienen heparina y se separa el plasma mediante centrifugación.**

**20 El plasma se analiza con respecto a rifaximina en el método LC-MS/MS validado (cromatografía líquida-espectrometría de masas/espectrometría de masas) y se calculan la concentración de plasma**

2

máxima observada ( $C_{máx}$ ), el tiempo para alcanzar la ( $C_{máx}$ ), ( $t_{máx}$ ), y el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC).

Los datos experimentales informados en el cuadro 1 siguiente claramente muestran que la rifaximina  $\alpha$  y la rifaximina  $\beta$  son absorbidos de manera insignificante, aunque la rifaximina  $\gamma$  se absorbe con un valor ( $C_{máx}$  = 0.668  $\mu\text{g/ml}$ ) comprendido entre 0.1 a 1.0  $\mu\text{g/ml}$ .

**CUADRO 1**  
**Parámetros farmacocinéticos para polimorfos de rifaximina después de la administración oral individual de de cápsulas con 100 mg/kg a perros hembra**

|                    | $C_{máx}$<br>ng/ml | $t_{máx}$<br>h | AUC <sub>0-24</sub><br>ng·h/ml |
|--------------------|--------------------|----------------|--------------------------------|
|                    | Promedio           | Promedio       | Promedio                       |
| Polimorfo $\alpha$ | 2.632              | 9.5            | 13                             |
| Polimorfo $\beta$  | 1.096              | 4              | 11                             |
| Polimorfo $\gamma$ | 668.22             | 2.25           | 3908                           |

Las pruebas de disolución intrínseca se realizan en cada uno de los tres polimorfos de acuerdo al método descrito en la monografía 1087 en las páginas 2512 – 2513 de la USP (Pharmacopoeia de E.U.A.) 27, y claramente muestran diferencias significativas entre rifaximina  $\alpha$ , rifaximina  $\beta$  y rifaximina  $\gamma$ .

Una muestra de cada polimorfo de rifaximina se coloca en un troquel y se comprime a 5000 kg por medio de un punzón de una prensa hidráulica para obtener una pella compactada.

El portatroquel que contiene la pella compactada se monta en un dispositivo de agitación de laboratorio, se sumerge en un medio de disolución y se gira por medio del dispositivo de agitación.

La prueba, realizada en un medio de disolución compuesto de regulador de pH de fosfato acuoso a pH 7.4 y de lauril sulfato de sodio a una temperatura de  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , muestra diferencias significativas entre las tasas de disolución intrínseca exhibidas por los tres polimorfos.

La rifaximina  $\alpha$  muestra desintegración de la pella compactada en 10 minutos de manera que no ha sido posible calcular el valor de su disolución intrínseca, aunque la disolución intrínseca de rifaximina  $\gamma$  ha sido aproximadamente diez veces la disolución de la rifaximina  $\beta$  de acuerdo con su biodisponibilidad que es más de cien veces la disolución de la rifaximina  $\beta$ .

Los resultados experimentales anteriores además hacen notar las diferencias existentes entre los tres polimorfos de rifaximina.

Las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se pueden emplear ventajosamente en la producción de preparaciones medicinales con actividad antibiótica, que contienen rifaximina, para su uso por vía oral y tópica. Las preparaciones medicinales para uso por vía oral contendrán rifaximina  $\alpha$  o  $\beta$  o  $\gamma$  junto con excipientes comunes tal como agentes de dilución como por ejemplo manitol, lactosa y sorbitol; agentes aglutinantes como por ejemplo almidones,

gelatinas, azúcares, derivados de celulosa, gomas naturales y polivinilpirrolidona; agentes lubricantes como por ejemplo talco, estearatos, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol y dióxido de silicio coloidal; agentes desintegrantes como por ejemplo almidones, celulosas, alginatos, gomas y polímeros reticulados; agentes colorantes, saborizantes y edulcorantes.

La presente invención se refiere a todas las preparaciones sólidas que se pueden administrar por vía oral, por ejemplo tabletas recubiertas y no recubiertas, de cápsulas de gelatina blanda y dura, píldoras recubiertas con azúcares, grageas, obleas, pellas y polvos en paquetes sellados.

Las preparaciones medicinales para uso tópico contendrán rifaximina  $\alpha$  o  $\beta$  o  $\gamma$  junto con excipientes comunes, tal como vaselina blanca, cera blanca, lanolina y derivados de las mismas, alcohol estearílico, propilenglicol, laurilsulfato de sodio, éteres de alcoholes de polioxietileno grasos, ésteres de ácidos de polioxietileno grasos, monoestearato de sorbitan, monoestearato de glicerilo, monoestearato de propilenglicol, polietilenglicoles, metilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, aluminio coloidal y silicato de magnesio, alginato de sodio.

La presente invención se refiere a todo tipo de preparaciones tópicas, por ejemplo ungüentos, pomadas, cremas, geles y lociones.

La invención se ilustra de aquí en adelante con algunos ejemplos. Tales ejemplos no pretenden limitar la invención. Es evidente que

las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se pueden obtener por manipulación de las condiciones de cristalización y secado mencionados precedentemente.

### **EJEMPLO 1**

#### **5      Preparación de rifaximina cruda y de rifaximina cruda seca**

En un matraz de tres cuellos equipado con agitador mecánico, termómetro y condensador de reflujo, se cargaron sucesivamente 120 ml de agua desmineralizada, 96 ml de alcohol etílico, 10 63.5 g de rifamicina O y 27.2 g de 2-amino-4-metilpiridina a temperatura ambiente. Una vez cargada, la masa se calentó a  $47 \pm 3$  °C, manteniéndola bajo agitación a esta temperatura durante 5 horas, luego se enfrió hasta  $20 \pm 3$  °C y, sobre un período de 30 minutos, se agregó con una mezcla, preparada por separado, de 9 ml de agua 15 desmineralizada, 12.6 ml de alcohol etílico, 1.68 g de ácido ascórbico y 9.28 g de ácido clorhídrico acuoso concentrado. Al finalizar la adición, la masa se mantuvo bajo agitación durante 30 minutos a una temperatura interna de  $20 \pm 3$  °C y luego, a la misma temperatura, se agregó por gotas 7.72 g de ácido clorhídrico concentrado hasta alcanzar un valor de pH 20 igual a 2.0.

Una vez finalizada la adición, la masa se mantuvo bajo agitación, siempre a una temperatura interna igual a 20 °C, durante 30 minutos, luego se filtró el precipitado y se lavó con una mezcla constituida

25

de 32 ml de agua desmineralizada y de 25 ml de alcohol etílico. La "rifaximina cruda" (89.2 g) así obtenida, se secó bajo vacío a temperatura ambiente durante 12 horas, después de lo cual se obtuvieron 64.4 g de "rifaximina cruda seca" que presenta un contenido de agua igual a 5.6% y un difractograma correspondiente a la forma polimórfica  $\beta$ . El secado adicional del producto bajo vacío hasta lograr un peso constante permite obtener 62.2 g de rifaximina cruda seca con un contenido de agua igual a 2.2%, cuyo difractograma corresponde a la forma polimórfica  $\alpha$ .

El producto es higroscópico y la forma polimórfica obtenida es reversible: la forma polimórfica  $\alpha$  absorbe agua de la humedad atmosférica, dependiendo de la humedad relativa y del tiempo de exposición. Cuando el contenido de agua absorbido por la forma polimórfica  $\alpha$  llega a ser mayor que 4.5%, ésta se convertirá en la forma polimórfica  $\beta$ . Ésta, a su vez, por secado pierde parte del agua, convirtiéndose en la forma polimórfica  $\alpha$  cuando se logra un contenido de agua entre 2.0% y 3.0%.

## **EJEMPLO 2**

### **Preparación de rifaximina y**

20

Se cargaron 163 ml de alcohol etílico y 62.2 g de rifaximina cruda seca a temperatura ambiente en un matraz de tres cuellos equipado con agitador mecánico, termómetro y condensador de reflujo. La suspensión se

26

calentó a  $57 \pm 3^\circ\text{C}$  bajo agitación hasta lograr la disolución completa del sólido y a esta temperatura se agregaron 70 ml de agua desmineralizada sobre un período de 30 minutos. Una vez finalizada la adición, la temperatura se llevó a  $30^\circ\text{C}$  sobre 40 minutos y se mantuvo en este valor hasta lograr una cristalización completa, luego la temperatura se disminuyó aún más hasta  $0^\circ\text{C}$  durante 2 horas y se mantuvo en este valor por 6 horas. Luego se filtró la suspensión y el sólido se lavó con 180 g de agua desmineralizada y se secó bajo vacío a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante, obteniendo, así 52.7 g de rifaximina y pura con un contenido de agua igual a 1.5%.

La forma  $\gamma$  se caracterizó por un difractograma de polvo por rayos X que presentaba picos significativos en los ángulos de difracción  $2\theta$  de  $5.0^\circ$ ;  $7.1^\circ$ ;  $8.4^\circ$ .

15

### EJEMPLO 3

#### Preparación de rifaximina $\alpha$

Se cargaron 62.2 gramos de rifaximina cruda seca y 163 ml de alcohol etílico a temperatura ambiente en un matraz de tres cuellos equipado con agitador mecánico, termómetro y condensador de reflujo. La suspensión se calentó a  $57 \pm 3^\circ\text{C}$  hasta lograr una disolución completa del sólido y luego se agregaron 70 ml de agua desmineralizada a esta temperatura durante 30

minutos. Una vez finalizada la adición, la temperatura se llevó a 30 °C durante 40 minutos y se mantuvo en este valor hasta lograr una cristalización abundante. Después se llevó la temperatura de la suspensión a 40 °C aproximadamente y se mantuvo en este valor durante 20 horas bajo agitación;

5 luego la temperatura se disminuyó a 0 °C durante 30 minutos y la suspensión se filtró de inmediato. El sólido se lavó con 180 ml de agua desmineralizada y se secó bajo vacío a temperatura ambiente hasta alcanzar un peso constante, obteniéndose, de esta forma 51.9 g de la forma  $\alpha$  de rifaximina con un contenido de agua igual a 2.5% y un difractograma de polvo por rayos X que

10 presenta picos en valores de ángulos  $2\theta$  de 6.6°; 7.4°; 7.9°; 8.8°; 10.5°; 11.1°; 11.8°; 12.9°; 17.6°; 18.5°; 19.7°; 21.0°; 21.4°; 22.1°.

**EJEMPLO 4****Preparación de rifaximina  $\alpha$** 

Se cargaron 89.2 gramos de rifaximina cruda y 170 ml de alcohol etílico a temperatura ambiente en un matraz de tres cuellos equipado con agitador mecánico, termómetro y condensador de reflujo, luego se calentó la suspensión a  $57 \pm 3$  °C hasta lograr la disolución completa del sólido. La temperatura se llevó a 50 °C y luego se agregaron 51.7 ml de agua desmineralizada a esta temperatura durante 30 minutos. Una vez finalizada la adición, la temperatura se llevó a 30 °C por una hora y la suspensión se mantuvo durante 30 minutos a esta temperatura con lo cual se obtuvo una cristalización abundante. La temperatura de la suspensión se llevó a 40 °C y se mantuvo en este valor durante 20 horas bajo agitación y luego se disminuyó aún más a 0 °C durante 30 minutos después de lo cual la suspensión se filtró de inmediato. El sólido se lavó con 240 ml de agua desmineralizada y se secó bajo vacío a 65 °C hasta alcanzar peso constante, obteniéndose así 46.7 g de rifaximina  $\alpha$  con un contenido de agua igual a 2.5%.

**EJEMPLO 5****Preparación de rifaximina  $\alpha$** 

Se repitió el procedimiento del ejemplo 3 pero incrementando la temperatura a 50 °C, en la cual se mantuvo la suspensión y disminuyendo el tiempo por el cual la suspensión se mantuvo a esta temperatura a 7 horas. El producto obtenido es igual al del ejemplo 3.

**EJEMPLO 6**

10

**Preparación de rifaximina  $\beta$** 

La cristalización de la rifaximina cruda seca se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 3. El secado bajo vacío a temperatura ambiente se comprobó utilizando el método de Karl Fisher y se detuvo cuando el contenido de agua alcanzó un 5.0%: se obtuvieron 52.6 g de rifaximina  $\beta$  caracterizados con un difractograma de polvo por rayos X que presentaba picos en valores de ángulos  $2\theta$  de 5.4°; 6.4°; 7.0°; 7.8°; 9.0°; 10.4°; 13.1°; 14.4°; 17.1°; 17.9°; 18.3°; 20.9°.

**EJEMPL 7****Preparación de rifaximina  $\alpha$  a partir de rifaximina  $\gamma$** 

Se suspendieron 5 gramos de rifaximina  $\gamma$  en una mezcla que consistía de 13 ml de alcohol etílico y 5.6 ml de agua y la suspensión se calentó a 40 °C durante 24 horas bajo agitación en un matraz de 50 ml equipado con condensador, termómetro y agitador mecánico. Luego se filtró la suspensión y el sólido se lavó con agua y a continuación se secó bajo vacío a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante. Se obtuvieron 4 gramos de rifaximina que presentaba un difractograma de polvo por rayos X correspondiente al de la forma polimórfica  $\alpha$  y un contenido de agua igual a 2.6%.

**EJEMPLO 8****Preparación de rifaximina  $\gamma$  a partir de rifaximina  $\alpha$** 

Se cargaron 15 gramos de la forma  $\alpha$  de rifaximina y 52.4 ml de alcohol etílico en un matraz de tres cuellos de 250 ml equipado con condensador de reflujo, termómetro y agitador mecánico; la suspensión se calentó bajo agitación a una temperatura de 50 °C hasta lograr la disolución completa del sólido.

A la solución transparente se le agregaron 22.5 ml de agua durante 30 minutos bajo agitación, se enfrió a 30 °C y se mantuvo a esta

temperatura durante 30 minutos. La suspensión formada se enfrió a 0 °C bajo agitación fuerte y se mantuvo a esta temperatura durante 6 horas. Después de este lapso se separó una parte de la suspensión, se filtró, se lavó con agua desmineralizada y se secó bajo vacío a 30 °C hasta alcanzar peso constante.

- 5 El producto así obtenido, 3.7 g, presenta un difractograma coherente con el de la forma  $\gamma$  y un contenido de agua igual a 1.7%.

La parte restante de la suspensión se mantuvo a 0 °C durante otras 18 horas bajo agitación fuerte y luego se filtró, se lavó con agua desmineralizada y se secó a 30 °C bajo vacío hasta alcanzar peso constante.

- 10 Se obtuvieron 9 gramos de producto que presentaba un difractograma coherente con el de la forma  $\gamma$  y un contenido de agua igual a 1.6%.

### **EJEMPLO 9**

#### **Preparación de rifaximina $\alpha$ a partir de rifaximina $\beta$**

15

Se secaron 5 gramos de rifaximina  $\beta$  que presentaba un contenido de agua igual a 5.0% bajo vacío a +30 °C durante 8 horas después de lo cual se obtuvieron 4.85 g de rifaximina  $\alpha$  con un contenido de agua igual a 2.3%.

**EJEMPL 10****Preparación de rifaximina  $\beta$  a partir de rifaximina  $\alpha$** 

Se mantuvieron 5 gramos de rifaximina  $\alpha$  que presenta un contenido de agua igual a 2.5% durante 40 horas en una atmósfera que contiene una humedad relativa igual al 56% obtenida con una solución acuosa saturada de nitrato de calcio tetrahidratado. Se obtuvieron 5.17 gramos de rifaximina  $\beta$  con un contenido de agua igual al 5.9% después de este lapso.

10

**EJEMPLO 11****Biodisponibilidad en perros mediante administración vía oral**

20 perros hembra Beagle raza pura de 20 semanas de edad, y que pesan entre 5.0 y 7.5 kg, se dividen en tres grupos de cuatro miembros cada uno.

El primero de estos tres grupos se trata con rifaximina  $\alpha$ , el segundo grupo con rifaximina  $\beta$  y el tercero con rifaximina  $\gamma$  de acuerdo al siguiente procedimiento.

Cada perro recibe de manera oral 100 mg/kg de uno de los poliformos de rifaximina en cápsulas de gelatina y 2 ml de muestras de sangre se recolectan de la vena yugular de cada animal antes de cada administración y 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la administración. Cada muestra se

33

transfiere en un tubo heparinizado y se centrifuga; el plasma se divide en 500  $\mu$ l de dos alícuotas y se congela a -20°C.

La rifaximina contenida en el plasma se analiza por medio del método LC-MS/MS validado y se calculan los siguientes parámetros de acuerdo a un análisis no compartimental estándar:

$C_{m\acute{a}x}$ = concentración de plasma máxima de rifaximina observada en el plasma;

$T_{m\acute{a}x}$ = tiempo en el cual se logra la  $C_{m\acute{a}x}$ ;

$AUC$ = área bajo de la curva de concentración-tiempo calculada a través de la regla trapezoidal lineal.

Los resultados se muestra en el siguiente cuadro 2 y claramente muestran como la rifaximina  $\gamma$  es mucho más absorbida, más de  $10^2$  veces, con respecto a la rifaximina  $\alpha$  y rifaximina  $\beta$  que prácticamente no se absorbe.

**CUADRO 2**  
**Parámetros farmacocinéticos para poliformos de rifaximina después de la administración oral individual de cápsulas con 100 mg/kg a perros hembra**

|                     | $C_{m\acute{a}x}$<br>Ng/ml | $t_{m\acute{a}x}$<br>h | $AUC_{0-24}$<br>ng-h/ml |
|---------------------|----------------------------|------------------------|-------------------------|
|                     | Promedio                   | Promedio               | promedio                |
| rifaximina $\alpha$ | 2.632                      | 9.5                    | 13                      |
| rifaximina $\beta$  | 1.096                      | 4                      | 11                      |
| rifaximina $\gamma$ | 668.22                     | 2.25                   | 3908                    |

**EJEMPLO 12****Tasa de disolución intrínseca**

Una muestra de 100 mg de cada polimorfo de rifaximina se  
5 somete a la prueba de disolución intrínseca que se realiza como se describe  
en la monografía 1087 en las páginas 2512-2513 de la USP (Pharmacopoeia  
de E.U.A.) 27.

100 miligramos de un poliformo de rifaximina se colocan en un  
troquel y se comprimen durante un minuto bajo una presión de 5000 kg por  
10 medio de un punzón en una prensa hidráulica.

Se forma una pella compactada en el troquel con una cara  
sencilla de área definida expuesta en la parte inferior del troquel de manera  
que 50% a 75% de la pella compactada se puede disolver en un medio de  
disolución apropiado.

15 El portador que contiene el troquel se monta en un dispositivo de  
agitación de laboratorio, se sumerge en un recipiente de vidrio que contiene  
un medio de disolución y gira a una velocidad de rotación de 100 rpm por  
medio del dispositivo de agitación, mientras se mantiene la temperatura del  
medio de disolución a  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . El medio de disolución contenido en el  
20 recipiente de vidrio que consta de 1000 ml de regulador de pH de fosfato  
acuoso 0.1 M pH 7.4 que contiene 4.5 g de lauril sulfato de sodio y se  
mantiene a  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  durante toda la duración de la prueba.

5

Las muestras de 2 ml de solución se toman después de 15, 30, 45 y 60 minutos de iniciar el procedimiento de disolución y se analizan por HPLC para saber la cantidad de rifaximina disuelta.

La muestra que contiene rifaximina  $\alpha$  muestra sistemáticamente la desintegración de la pella compactada dentro de 10 minutos observándose dicho fenómeno también en concentraciones inferiores (0.1% y 0.3%) de lauril sulfato de sodio y aún en ausencia de dicho agente tensioactivo, de manera que el valor de su disolución intrínseca no se puede calcular.

La disolución intrínseca de rifaximina  $\gamma$  es de cerca de diez veces la disolución de rifaximina  $\beta$  en todo momento, como se puede inferir por los resultados experimentales mostrados en el siguiente cuadro 3.

**CUADRO 3**

**Disolución intrínseca en regulador de pH de fosfato acuoso 0.1 M pH 7.4 con lauril sulfato de sodio al 0.45%**

15

20

| Tiempo (min)                                            | Rifaximina disuelta (mg/cm <sup>2</sup> ) |                    |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|
|                                                         | Polimorfo $\beta$                         | Polimorfo $\gamma$ |
| 15                                                      | 0.28                                      | 2.46               |
| 30                                                      | 0.50                                      | 4.52               |
| 45                                                      | 0.72                                      | 6.44               |
| 60                                                      | 0.94                                      | 9.04               |
| Tasa de disolución intrínseca (mg/min/cm <sup>2</sup> ) | 0.0147                                    | 0.1444             |

## **NÚMERO DE LA INVENCION**

### **REIVINDICACIONES**

- 5                    1.- Un polimorfo  $\alpha$  de rifaximina, caracterizado porque presenta un contenido de agua menor que un 4.5%, preferiblemente comprendido entre 2.0% y 3.0%, y por un difractograma de polvo por rayos X que presenta picos en valores de ángulos de difracción  $2\theta$  de 6.6°; 7.4°; 7.9°; 8.8°; 10.5°; 11.1°; 11.8°; 12.9°; 17.6°; 18.5°; 19.7°; 21.0°; 21.4°; 22.1°.
- 10                   2.- Un polimorfo  $\beta$  de rifaximina, caracterizado porque presenta un contenido de agua mucho mayor que un 4.5%, preferiblemente comprendido entre 5.0% y 6.0%, y por un difractograma de polvo por rayos X que presenta picos en valores de ángulos de difracción  $2\theta$  de 5.4°; 6.4°; 7.0°; 7.8°; 9.0°; 10.4°; 13.1°; 14.4°; 17.1°; 17.9°; 18.3°; 20.9°.
- 15                   3.- Un polimorfo  $\gamma$  de rifaximina, caracterizado por un contenido de agua entre 1.0% y 2.0% y por un difractograma de polvo por rayos X que presenta un perfil fundamentalmente amorfo y pocos picos significativos en valores de ángulos de difracción  $2\theta$  de 5.0°; 7.1°; 8.4°.
- 20                   4.- Un procedimiento para la producción de las rifaximinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , caracterizado porque un equivalente molar de rifamicina O reacciona con un exceso de 2-amino-4-metilpiridina, preferiblemente de 2.0 a 3.5 equivalentes molares, en una mezcla de solventes compuesta de agua y alcohol etílico en una relación volumétrica de entre 1:1 y 2:1, por un período de tiempo entre 2 y

8 horas, a una temperatura entre 40 °C y 60 °C; la mezcla de reacción se trata a temperatura ambiente con una solución de ácido ascórbico en una mezcla de agua, alcohol etílico y ácido clorhídrico acuoso concentrado; después se lleva a pH 2.0 con una solución acuosa concentrada de ácido clorhídrico, se filtra la suspensión, se lava el sólido resultante con la misma mezcla de solventes de agua/alcohol etílico como se usa en la reacción anterior, se purifica la rifaximina cruda por disolución en alcohol etílico a una temperatura que comprende entre 45 °C y 65 °C; se realiza la precipitación por adición de agua, preferiblemente en cantidades en peso entre 15% y 70% a la cantidad en peso del alcohol etílico usado para la disolución; se disminuye la temperatura de la suspensión a un valor entre 0 °C y 50 °C bajo agitación por un período de tiempo entre 4 y 36 horas; y finalmente se realiza la filtración de la suspensión, lavando el sólido resultante con agua y secándolo bajo vacío o bajo condiciones de presión normal, con o sin un agente de secado, a una temperatura entre temperatura ambiente y 105 °C, por un período de tiempo entre 2 y 72 horas.

5.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 4 para la preparación de rifaximina  $\alpha$ , caracterizado además porque, después de la adición de agua a la solución de etanol rifaximina cruda, la temperatura se disminuye a un valor entre 28 °C y 32 °C con el fin de iniciar la cristalización; se agita la suspensión resultante a una temperatura que comprende entre 40 °C y 50 °C por un período de tiempo entre 6 y 24 horas, se enfría la suspensión a 0 °C por un período de tiempo entre 15 minutos y una hora,

temperatura, bajo agitación, por un período de tiempo entre 6 y 36 horas, se filtra la suspensión, se lava el sólido resultante con agua y se seca hasta alcanzar un contenido de agua menor que un 4.5% preferiblemente entre 2.0% y 3.0%.

- 5                    9.- Un procedimiento para la preparación de rifaximina  $\beta$ , caracterizado porque se suspende la rifaximina  $\gamma$  en una mezcla de solventes que consta de alcohol etílico/agua en una relación volumétrica de 7:3, se calienta la suspensión a una temperatura entre 38 °C y 50 °C y se mantiene a esta temperatura, bajo agitación, por un período de tiempo entre 6 y 36 horas,
- 10 se filtra la suspensión, se lava el sólido resultante con agua y se seca hasta alcanzar un contenido de agua mayor que un 4.5%, preferiblemente entre 5.0% y 6.0%.

- 10.- Un procedimiento para la preparación de rifaximina  $\gamma$ , caracterizado porque se disuelve rifaximina  $\alpha$  o  $\beta$  en alcohol etílico a una
- 15 temperatura entre 50 °C y 60 °C, se agrega agua desmineralizada hasta alcanzar una relación volumétrica de alcohol etílico/agua igual a 7:3, se enfría la solución a 30 °C bajo agitación fuerte y se enfría la suspensión resultante a 0 °C, y se mantiene a esta temperatura por un período de tiempo entre 6 y 24 horas, se filtra y se lava el sólido resultante con agua y se seca hasta alcanzar
- 20 un contenido de agua menor que 2.0%.

- 11.- Un procedimiento para la preparación de rifaximina  $\beta$ , caracterizado porque se mantiene la rifaximina  $\alpha$  en un ambiente con una

entonces se filtra, y se seca el sólido resultante hasta alcanzar un contenido de agua menor que un 4.5%, preferiblemente entre 2.0% y 3.0%.

5                   6.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 4 para la producción de rifaximina  $\beta$ , caracterizado además porque, después de la adición de agua a la solución de etanol rifaximina cruda, la temperatura se disminuye a un valor entre 28 °C y 32 °C con el fin de iniciar la cristalización, se agita la suspensión resultante a una temperatura que comprende entre 40 °C y 50 °C por un período de tiempo entre 6 y 24 horas, se enfría la suspensión a 0 °C por un período de tiempo entre 15 minutos y una hora,  
10                   entonces se filtra, y se seca el sólido resultante hasta alcanzar un contenido de agua mayor que un 4.5%, preferiblemente entre 5.0% y 6.0%.

                  7.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 4 para la producción de rifaximina  $\gamma$ , caracterizado además porque, después de la adición de agua a la solución de etanol rifaximina cruda, la temperatura se  
15                   disminuye hasta un valor entre 28 °C y 32 °C con el fin de iniciar la cristalización, se enfría la suspensión resultante a 0 °C aproximadamente y se mantiene ahí con agitación, por un período de tiempo que comprende entre 6 y 24 horas, entonces se filtra y se seca el sólido resultante hasta alcanzar un contenido de agua entre un 1.0% y 2.0%.

20                   8.- Un procedimiento para la preparación de rifaximina  $\alpha$ , caracterizado porque se suspende la rifaximina  $\gamma$  en una mezcla de solventes de alcohol etílico/agua en una relación volumétrica de 7:3; se calienta la suspensión a una temperatura entre 38 °C y 50 °C y se mantiene a esta

humedad relativa mayor que un 50% por un período de tiempo entre 12 y 48 horas.

12.- Un procedimiento para la producción de rifaximina  $\alpha$ , caracterizado porque se seca la rifaximina  $\beta$  bajo presión atmosférica, o bajo vacío, o en presencia de un agente de secado, a una temperatura entre 5 temperatura ambiente y 105 °C, por un período de tiempo entre 2 y 72 horas.

13.- El uso de rifaximina  $\alpha$  en la preparación de medicamentos para uso oral con actividad antibiótica, junto con excipientes como agentes de dilución, aglutinación, lubricación, desintegración, coloración, saborización y 10 edulcoración.

14.- El uso de rifaximina  $\beta$  en la preparación de medicamentos para uso oral con actividad antibiótica, junto con excipientes convencionales.

15.- El uso de rifaximina  $\gamma$  en la preparación de medicamentos para uso oral con actividad antibiótica, junto con excipientes convencionales.

15 16.- El uso como se reclama en las reivindicaciones 13 a 15, en donde las preparaciones para uso oral se seleccionan de tabletas recubiertas y no recubiertas, de cápsulas de gelatina blanda y dura, píldoras recubiertas con azúcares, grageas, obleas, pellas y polvos en paquetes sellados.

17.- El uso de rifaximina  $\alpha$  en la preparación de medicamentos 20 con actividad antibiótica para uso tópico.

18.- El uso de rifaximina  $\beta$  en la preparación de medicamentos con actividad antibiótica para uso tópico.

19.- El uso de rifaximina y en la preparación de medicamentos con actividad antibiótica para uso tópico.

20.- El uso como se reclama en las reivindicaciones 17 a 19, en donde las preparaciones para uso tópico se seleccionan de ungüentos, 5 pomadas, cremas, geles y lociones.

## **RESUMEN DE LA INVENCION**

Formas cristalinas polimórficas del antibiótico rifaximina (INN) denominadas rifaximina  $\alpha$  y rifaximina  $\beta$  y una forma pobremente cristalina denominada rifaximina  $\gamma$ . Estas formas son de utilidad en la producción de preparaciones medicinales para uso por vía oral y tópica y se pueden obtener por medio de un procedimiento de cristalización llevado a cabo por disolución en caliente de la rifaximina cruda en alcohol etílico y por cristalización del producto mediante la adición de agua a una temperatura determinada y por un período de tiempo determinado. La cristalización es seguida de un secado llevado a cabo bajo condiciones controladas hasta alcanzar un contenido de agua específico en el producto final.

JQ

P04/355

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/012496

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D498/22 A61K31/437 A61P31/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                        | Relevant to claim No. |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | EP 0 161 534 A (ALFA FARMACEUTICI SPA)<br>21 November 1985 (1985-11-21)<br>cited in the application<br>claim 1; examples 1,4,6,7<br>----- | 1-28                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the International filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

1 June 2005

Date of mailing of the International search report

28.07.2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 18 Patentkan 2  
NL - 2280 LV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 861 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-8018

Authorized officer

Seelmann, I

34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2004/012490

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1,4(part),5,8,12,13,16(part),17,20(part)

rifaximin alfa

---

2. claims: 2,4(part),6,9,11,14,16(part),18,20(part)

rifaximin beta

---

3. claims: 3,4(part),7,10,15,16(part),19,20(part)

rifaximin gamma

---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/012490

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date        |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| EP 0161534                                | A                   | 21-11-1985                 | IT 1199374 B 30-12-1988    |
|                                           |                     |                            | AR 241913 A1 29-01-1993    |
|                                           |                     |                            | AT 46512 T 15-10-1989      |
|                                           |                     |                            | AU 568934 B2 14-01-1988    |
|                                           |                     |                            | AU 4251585 A 21-11-1985    |
|                                           |                     |                            | CA 1215708 A1 23-12-1986   |
|                                           |                     |                            | DE 3573120 D1 26-10-1989   |
|                                           |                     |                            | DK 214685 A ,B, 16-11-1985 |
|                                           |                     |                            | EP 0161534 A2 21-11-1985   |
|                                           |                     |                            | ES 8603489 A1 16-04-1986   |
|                                           |                     |                            | FI 851907 A ,B, 16-11-1985 |
|                                           |                     |                            | GR 851144 A1 25-11-1985    |
|                                           |                     |                            | IE 50392 B1 08-09-1993     |
|                                           |                     |                            | JP 1778865 C 13-08-1993    |
|                                           |                     |                            | JP 4069634 B 06-11-1992    |
|                                           |                     |                            | JP 60252483 A 13-12-1985   |
|                                           |                     |                            | NO 851921 A ,B, 18-11-1985 |
|                                           |                     |                            | PH 22007 A 02-05-1988      |
|                                           |                     |                            | PT 80446 A ,B 01-06-1985   |
|                                           |                     |                            | US 4557866 A 10-12-1985    |
|                                           |                     |                            | ZA 8502971 A 24-12-1985    |

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
19 May 2005 (19.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2005/044823 A2

(51) International Patent Classification: C07D 498/22,  
A61K 31/437, A61P 31/04

Goffredo [IT/IT]; Via Ragazzi del 99, 5, I-40133 Bologna (IT).

(21) International Application Number:  
PCT/EP2004/012490

(74) Agents: BIANCHETTI, Giuseppe et al.; Bianchetti  
Bracco Minoja S.r.l., Via Plinio, 63, I-20129 Milano (IT).

(22) International Filing Date:  
4 November 2004 (04.11.2004)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GH, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:  
M2003A002144 7 November 2003 (07.11.2003) IT

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SI,  
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): ALFA  
WASSERMANN S.P.A. [IT/IT]; Contrada S. Emidio,  
I-65020 Alanno (PB) (IT).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): VISCOMI,  
Giuseppe, C. [IT/IT]; Via Ragazzi del 99, 5, I-40133  
Bologna (IT). CAMPANA, Mannoia [IT/IT]; Via Ragazzi  
del 99, 5, I-40133 Bologna (IT). BRAGA, Dario [IT/IT];  
Via Ragazzi del 99, 5, I-40133 Bologna (IT). CONFOR-  
TINI, Donatella [IT/IT]; Via Ragazzi del 99, 5, I-40133  
Bologna (IT). CANNATA, Vincenzo [IT/IT]; Via Ragazzi  
del 99, 5, I-40133 Bologna (IT). RIGHI, Paolo [IT/IT];  
Via Ragazzi del 99, 5, I-40133 Bologna (IT). ROSINI,

Published:

— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: POLYMORPHIC FORMS OF RIFAXIMIN, PROCESSES FOR THEIR PRODUCTION AND USE THEREOF IN  
MEDICINAL PREPARATIONS

(57) Abstract: Crystalline polymorphic forms of rifaximin (INN), referred to as rifaximin  $\alpha$  and rifaximin  $\beta$ , and a poorly crystalline  
form referred to as rifaximin  $\gamma$ , useful in the production of medicaments containing rifaximin for the oral and topical use and obtained  
by means of a crystallization process carried out by hot-dissolving the raw rifaximin in ethyl alcohol and causing the crystallization of  
the product by addition of water at a fixed temperature and for a fixed period of time, followed by drying under controlled conditions  
until reaching a precise water content in the end product, are the object of the invention.

WO 2005/044823 A2

48

**POLYMORPHIC FORMS OF RIFAXIMIN, PROCESSES FOR THEIR  
PRODUCTION AND USE THEREOF IN MEDICINAL  
PREPARATIONS**

The present invention relates to rifaximin polymorphic forms  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , the processes for their preparation and the use thereof in the manufacture of medicinal preparations for the oral or topical route.

**Background of the invention**

5 Rifaximin (INN; see The Merck Index, XIII Ed., 8304) is an antibiotic belonging to the rifamycin class, namely a pyrido-imidazo rifamycin described and claimed in Italian Patent IT 1154655, while EP 0161534 discloses and claims a process for its production starting from rifamycin O (The Merck Index, XIII Ed., 8301).

10 Both these patents generically describe the purification of rifaximin by crystallization in suitable solvents or solvent systems and summarily show in some examples that the resulting product can be crystallized from the 7:3 mixture of ethyl alcohol/water and dried both under atmospheric pressure and under vacuum. Neither information concerning the experimental conditions of  
15 crystallization and drying, nor any distinctive crystallographic characteristic of the obtained product are reported.

The presence of different polymorphs had not been ascertained and therefore the experimental conditions described in both patents had been developed with the aim of obtaining a homogeneous product having suitable  
20 purity from the chemical point of view, apart from the crystallographic aspects of the product itself.

It has now been unexpectedly found that some polymorphic forms of rifaximin exist whose formation depends on the solvent as well as on the conditions of time and temperature at which both crystallization and drying

**CONFIRMATION COPY**

are carried out.

In the present application, these polymorphic forms will be hereinafter referred to as rifaximin  $\alpha$  (figure 1) and rifaximin  $\beta$  (figure 2) on the basis of their respective specific diffractograms, while the poorly crystalline form with  
5 a high content of amorphous component will be identified as rifaximin  $\gamma$  (figure 3).

The rifaximin polymorphic forms have been characterized through the powder X-ray diffraction technique.

The identification and characterization of these polymorphic forms and,  
10 contemporarily, the definition of the experimental conditions for obtaining them is very important for a compound endowed with pharmacological activity which, like rifaximin, is marketed as medicinal preparation, both for human and veterinary use. It is in fact known that the polymorphism of a compound that can be used as active principle contained in a medicinal  
15 preparation can influence the pharmaco-toxicologic properties of the drug. Different polymorphic forms of an active principle administered as drug in the oral or topical form can modify many properties thereof, like bioavailability, solubility, stability, colour, compressibility, flowability and workability with consequent modification of the profiles of toxicological safety, clinical  
20 effectiveness and productive efficiency.

What above mentioned is confirmed by the fact that the authorities that regulate the grant of the authorization for the admission of the drugs on the market require that the manufacturing methods of the active principles be standardized and controlled in such a way as to give homogeneous and sound  
25 results in terms of polymorphism of the production batches (CPMP/QWP/96, 2003 - Note for Guidance on Chemistry of new Active Substance; CPMP/ICH/367/96 - Note for guidance specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical

substances; Date for coming into operation: May 2000).

The need for the above-mentioned standardization has further been strengthened in the field of rifamycin antibiotics by Henwood S.Q., de Villiers M.M., Liebenberg W. and Lötter A.P., Drug Development and Industrial  
5 Pharmacy, 26 (4), 403-408, (2000), who have ascertained that different production batches of rifampicin (INN) prepared by different manufacturers differ among them because they show different polymorphy characteristics, and as a consequence they show different dissolution profiles together with consequent alteration of the respective pharmacological properties.

10 Following the processes of crystallization and drying generically disclosed in IT 1154655 and EP 0161534 it has been found that under some experimental conditions the rifaximin poorly crystalline form is obtained, while under other experimental conditions the other crystalline polymorphic forms of rifaximin are obtained. Moreover it has been found that some  
15 parameters, absolutely not disclosed in the above-mentioned patents, for instance the conditions of preservation and the relative humidity of the ambient, have the surprising effect to determine the form of the polymorph.

The rifaximin polymorphic forms object of the present application have never been found or hypothesized, as it was generally assumed that a sole  
20 homogeneous product would always have been obtained, whichever the method chosen within the range of the described conditions, irrespective of the conditions used for crystallizing, drying and preserving.

It has now been found that the formation of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms depends on the presence of water in the crystallization solvent, on the  
25 temperature at which the product is crystallized and on the amount of water present in the product at the end of the drying phase.

The form  $\alpha$ , the form  $\beta$  and the form  $\gamma$  of rifaximin have then been synthesised and they are the object of the invention.

Moreover it has been found that the presence of water in rifaximin at the solid state is reversible, so that absorption and/or cession of water can take place in time in the presence of suitable ambient conditions; consequently rifaximin is susceptible of transition from one form to another, also remaining  
5 in the solid state, without need to be again dissolved and crystallized. For instance when polymorph  $\alpha$  absorbs hydration water until a content higher than 4.5%, it changes into polymorph  $\beta$ , which in its turn changes into polymorph  $\alpha$  upon drying until a water content lower than 4.5%.

These results have a remarkable importance as they determine the  
10 conditions of industrial manufacturing of some working steps, which could not be considered critical for the determination of the polymorphism of a product, for instance the washing of a crystallized product, the conditions of preservation of the end product, or the characteristics of the container in which the product is preserved.

15 Rifaximin exerts its broad antibacterial activity in the gastrointestinal tract against localized gastrointestinal bacteria that cause infectious diarrhea, including anaerobic strains. It has been reported that rifaximin is characterized by a negligible systemic absorption, due to its chemical and physical characteristics (*Descombe J.J. et al. Pharmacokinetic study of rifaximin after*  
20 *oral administration in healthy volunteers. Int J Clin Pharmacol Res, 14 (2), 51-56, (1994)).*

Now we have found that the level of rifaximin systemic adsorption can be modulated, and this is part of the present invention, by administering distinct polymorphic forms of rifaximin, namely rifaximin  $\alpha$ , rifaximin  $\beta$  and  
25 rifaximin  $\gamma$ . It is possible to have a difference in the adsorption of almost 600 folds in the range from 0.001 to 1  $\mu\text{g/ml}$  in blood.

The evidenced difference in the bioavailability is important because it can differentiate the pharmacological and toxicological behaviour of the three

polymorphous of rifaximins  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ .

As a matter of fact, rifaximin  $\alpha$  and rifaximin  $\beta$  are negligibly absorbed through the oral route, while rifaximin  $\gamma$  shows a mild absorption.

Rifaximins  $\alpha$  and  $\beta$ , which are practically not absorbed, might act only through a topical action, including the case of the gastro-intestinal tract, with the advantage of very low toxicity.

On the other hand, rifaximin  $\gamma$ , which is mildly absorbed, can find an advantageous use against systemic microorganisms, able to hide themselves and to partially elude the action of the topic antibiotics.

In respect of possible adverse events coupled to the therapeutic use of rifaximin of particular relevance is the induction of bacterial resistance to the antibiotics.

Generally speaking, in therapeutic practice with antibiotics bacterial resistance to the same or other antibiotics can occur when resistant strains arise. In the case of rifaximin, this aspect is particularly relevant, since rifaximin belongs to the rifamycin family, a member of which, rifampicin, is largely used in the treatment of tuberculosis. The current short course treatment of tuberculosis is a combination therapy involving four active pharmaceutical ingredients: rifampicin, isoniazid, ethambutol and pyrazinamide, rifampicin playing a pivotal role. Therefore, any drug which jeopardized the efficacy of the therapy by selecting for resistance to rifampicin would be harmful. (Kremer L. *et al.* "Re-emergence of tuberculosis: strategies and treatment", *Expert Opin. Investig. Drugs*, **11** (2), 153-157, (2002)).

In principle, considering the structural similarity between rifaximin and rifampicin, the use of rifaximin might induce the selection resistant strains of *M. tuberculosis* and cross-resistance to rifampicin. In order to avoid this negative event it is crucial to have a control of the quantity of systemically

absorbed rifaximin.

From this point of view, the difference found in the systemic absorption of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms of rifaximin is significant, since also at sub-inhibitory concentration of rifaximin, such as in the range from 0.1 to 1  $\mu\text{g/ml}$ , selection of resistant mutants has been demonstrated to be possible (Marchese A. *et al.* *In vitro* activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against clostridium difficile and the rate of selection of spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species. *Chemotherapy*, 46(4), 253-266,(2000)).

What stated above clearly shows the importance of the rifaximin polymorphic forms of the present invention, and of the various industrial processes of the invention for the preparation of pure single forms having different pharmacological properties.

According to what stated above, the importance of the present invention, which has led to the knowledge of the existence of the above mentioned rifaximin polymorphic forms and to various industrial routes for manufacturing pure single forms having different pharmacological properties, is clearly strengthened.

The above-mentioned  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms can be advantageously used as pure and homogeneous products in the manufacture of medicinal preparations containing rifaximin.

As already stated, the process for industrial preparation rifaximin from rifamycin O disclosed and claimed in EP 0161534 is lacking from the standpoints of purification and identification of the product obtained; it shows some limits also from the synthetic point of view as regards, for instance, the very long reaction times, from 16 to 72 hours, which are poorly suited to an industrial use, and moreover because it does not provide for the in situ

reduction of the rifaximin oxidized that may be formed in the reaction mixture.

Therefore, a further object of the present invention is an improved process for the industrial preparation of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms of rifaximin  
5 herein claimed as products and usable as defined and homogeneous active principles in the manufacture of the medicinal preparations containing such active principle.

#### **Description of the invention**

The present invention relates to the form  $\alpha$ , the form  $\beta$  and the form  $\gamma$   
10 of the antibiotic known as rifaximin (INN), the processes for their preparation and the use thereof in the manufacture of medicinal preparations for the oral or topical route.

The process of the present invention comprises reacting one molar equivalent of rifamycin O with an excess of 2-amino-4-methylpyridine,  
15 preferably from 2.0 to 3.5 molar equivalents, in a solvent mixture consisting of water and ethyl alcohol in volumetric ratios between 1:1 and 2:1, for a time between 2 and 8 hours at a temperature between 40°C and 60°C.

After completion of the reaction, the reaction mass is cooled to room temperature and added with a solution of ascorbic acid in a mixture of water,  
20 ethyl alcohol and aqueous concentrated hydrochloric acid, under strong stirring, in order to reduce the small amount of oxidized rifaximin that forms during the reaction. Finally the pH is adjusted to about 2.0 by further addition of hydrochloric acid concentrated aqueous solution, in order to better remove the excess of 2-amino-4-methylpyridine used in the reaction. The suspension  
25 is filtered and the resulting solid is washed with the same solvent mixture water/ethyl alcohol as used in the reaction. Such semifinished product is called "raw rifaximin".

The raw rifaximin can be directly submitted to the subsequent

55 ~~12~~

purification step. Alternately, in case long times of preservation of the semifinished product are expected, the raw rifaximin can be dried under vacuum at a temperature lower than 65°C for a time between 6 and 24 hours, such semifinished product is called "dried raw rifaximin".

- 5        The resulting raw rifaximin and/or dried raw rifaximin are purified by dissolution in ethyl alcohol at a temperature between 45°C and 65°C, followed by crystallization by addition of water, preferably in weight amounts between 15% and 70% to the weight amount of ethyl alcohol used for the dissolution, and by keeping the resulting suspension at a temperature between 50°C and
- 10    0°C under stirring during a time between 4 and 36 hours.

The suspension is filtered and the obtained solid is washed with water and dried under vacuum or under normal pressure, optionally in the presence of a drying agent, at a temperature between room temperature and 105°C for a time between 2 and 72 hours.

- 15        The achievement of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms depends on the conditions selected for the crystallization. In particular, the composition of the solvent mixture used for the crystallization, the temperature at which the reaction mixture is kept after the crystallization and the period of time at which that temperature is kept, have proven to be critical.

- 20        More precisely, rifaximin  $\gamma$  is obtained when the solution is brought to a temperature between 28°C and 32°C to start precipitation and the resulting suspension is further cooled to 0°C and kept at this temperature for a time between 6 and 24 hours.

- 25        The suspension is filtered, the solid is washed with demineralized water and is dried to a water content between 1.0% and 2.0%.

The  $\alpha$  and  $\beta$  rifaximins are obtained when the temperature is first brought to a value between 28°C and 32°C in order to start crystallization, then the suspension is brought to a temperature between 40°C and 50°C and

kept at this value for a time between 6 and 24 hours, then the suspension is quickly cooled to 0°C in 15 minutes to one hour, then is filtered, the solid is washed with water and then dried.

The drying steps plays an important role in obtaining the rifaximin  $\alpha$  and  $\beta$  polymorphic forms and has to be monitored by a method suited to water dosage, such as the Karl Fischer method, in order to check the amount of remaining water present in the product under drying.

Rifaximin  $\alpha$  or rifaximin  $\beta$  are obtained by drying to different final water contents, be they higher or lower than 4.5%, and do not depend on the experimental conditions of pressure and temperature at which such critical water contents are achieved. In fact, the two polymorphic forms, with higher or lower water content, can be obtained by drying under vacuum or at atmospheric pressure, at room temperature or at high temperatures, optionally in the presence of drying agents, provided that the drying is prolonged for the time necessary to reach the water content characteristic for each polymorphic form.

The polymorphic form  $\beta$  is obtained when the drying of the product crystallized and washed with water is stopped at water contents higher than 4.5%, measured by Karl Fischer, preferably between 5.0% and 6.0%, while the polymorphic form  $\alpha$  is obtained when drying is continued until water contents lower than 4.5%, preferably between 2.0% and 3.0%.

Both the form  $\gamma$  and the forms  $\alpha$  and  $\beta$  of rifaximin are hygroscopic, they reversibly absorb water in time in the presence of suitable environmental conditions of pressure and humidity and are susceptible of transformation from one form into another.

When the polymorphic form  $\alpha$  is kept under conditions of relative humidity higher than 50% for a time between 12 and 48 hours, it changes into the polymorphic form  $\beta$ , which in its turn is transformed into the polymorphic

form  $\alpha$  upon drying to a water content lower than 4.5%, preferably comprised between 2.0% and 3.0%,.

Another type of transition exists between the form  $\gamma$  and the forms  $\alpha$  and  $\beta$ , depending upon the temperatures kept during the phase of precipitation  
5 of rifaximin.

In particular, the form  $\gamma$  turns into the forms  $\alpha$  or  $\beta$  when a suspension of the form  $\gamma$  of rifaximin is kept in an ethyl alcohol/water 7:3 (V/V) solvent mixture at a temperature between 38°C and 50°C under strong stirring for a prolonged time, preferably comprised between 6 and 36 hours.

10 After filtration and washing with demineralized water, drying to a water content higher than 4.5%, preferably between 5.0% and 6.0%, affords the polymorphic form  $\beta$ , while when drying is continued to a water content lower than 4.5%, preferably between 2.0% and 3.0%, gives the form  $\alpha$ .

Rifaximins  $\alpha$  and  $\beta$  can in their turn change into rifaximin  $\gamma$  by  
15 dissolution in ethyl alcohol and treatment of the resulting solution as previously described for the preparation of the form  $\gamma$ .

These transitions from one form into another are very important for the invention, as they can be provide an alternative process for the preparation of the form desired for the production of the medicinal preparations. Therefore,  
20 the process that allows to transform rifaximin  $\gamma$  into rifaximin  $\alpha$  or  $\beta$  in a valid industrial manner, the process that allows to transform rifaximin  $\alpha$  or  $\beta$  into rifaximin  $\gamma$  in a valid industrial manner, the process that allows to transform rifaximin  $\alpha$  into rifaximin  $\beta$  in a valid industrial manner or *vice versa* rifaximin  $\beta$  into rifaximin  $\alpha$ , are important parts of the invention.

25 The process concerning the transformation of rifaximin  $\gamma$  into rifaximin  $\alpha$  or rifaximin  $\beta$  comprises suspending rifaximin  $\gamma$  in a solvent mixture consisting of ethyl alcohol/water in 7:3 volumetric ratio, warming the suspension to a temperature between 38°C and 50°C and keeping it at this

temperature under strong stirring for a time between 6 and 36 hours. The suspension is then filtered, the solid is washed with water and dried; the polymorphic form  $\beta$  is obtained when drying is carried out to a water content between 5.0% and 6.0% measured by the Karl Fischer method, while the  
5 polymorphic form  $\alpha$  is obtained when drying is continued to a water content between 2.0% and 3.0%.

The process for the preparation of the form  $\gamma$  starting from rifaximin  $\alpha$  or  $\beta$  comprises dissolving the  $\alpha$  or  $\beta$  form in ethyl alcohol under stirring, at a temperature between 50°C and 60°C, adding demineralized water to an ethyl  
10 alcohol/water 7:3 volumetric ratio, cooling the solution to 30°C under strong stirring, cooling the precipitate to 0°C and keeping the suspension under stirring at 0°C for a time between 6 and 24 hours. The suspension is then filtered, the solid is washed with water and dried to a water content lower than 2.0% thereby obtaining rifaximin  $\gamma$ .

15 The process for the transformation of the form  $\alpha$  into the form  $\beta$  consists in keeping powder rifaximin  $\alpha$  in an ambient having relative humidity higher than 50% for the time required to obtain a water content in the powder higher than 4.5%, which time is usually between 12 and 48 hours.

The process for the transformation of the form  $\beta$  into the form  $\alpha$   
20 consists in drying powder rifaximin  $\beta$  under vacuum or under conditions of normal pressure, optionally in the presence of a drying agent, at a temperature between the room temperature and 105°C, for a time between 2 and 72 hours, to obtain a water content in the powder lower than 4.5%, preferably between 2.0% and 3.0%.

25 It is evident from what stated above that during preservation of the product particular care should be taken so that the ambient conditions do not affect the water content of the product, by preserving the product in an environment having controlled humidity or in closed containers that allow no

significant exchanges of water with the exterior.

The rifaximin  $\alpha$  polymorph is characterised by a water content lower than 4.5%, preferably between 2.0% and 3.0% and by a powder X-ray diffractogram (reported in figure 1) which shows peaks at the values of the  
5 diffraction angles  $2\theta$  of 6.6°; 7.4°; 7.9°; 8.8°; 10.5°; 11.1°; 11.8°; 12.9°; 17.6°; 18.5°; 19.7°; 21.0°; 21.4°; 22.1°. The rifaximin  $\beta$  polymorph is characterised by a water content higher than 4.5%, preferably between 5.0% and 6.0%, and by a powder X-ray diffractogram (reported in figure 2) which shows peaks at the values of the diffraction angles  $2\theta$  of 5.4°; 6.4°;  
10 7.0°; 7.8°; 9.0°; 10.4°; 13.1°; 14.4°; 17.1°; 17.9°; 18.3°; 20.9°.

The rifaximin  $\gamma$  polymorph is characterised by a powder X-ray diffractogram much poorer because of the poor crystallinity; the significant peaks are at the values of the diffraction angles  $2\theta$  of 5.0°; 7.1°; 8.4° as reported in figure 3.

15 The diffractograms have been carried out using a Philips X'Pert instrument fitted with Bragg-Brentano geometry and under the following working conditions:

X-ray tube: Copper

Radiation used: K ( $\alpha_1$ ), K ( $\alpha_2$ )

20 Tension and current of the generator: KV 40, mA 40

Monocromator: Graphite

Step size: 0.02

Time per step: 1.25 seconds

Starting and final angular  $2\theta$  value: 3.0°+30.0°

25 The evaluation of the water content in the analyzed samples has always been carried out by means of the Karl Fischer method.

Rifaximin  $\alpha$ , rifaximin  $\beta$  and rifaximin  $\gamma$  significantly differ from each from other also in terms of bioavailability and intrinsic dissolution.

A bioavailability study of the three polymorphs has been carried out on Beagle female dogs, by feeding them orally with a dose of 100 mg/kg of one of the polymorphs, collecting blood samples from the jugular vein of each animal before each dosing and 1, 2, 4, 6, 8 and 24 hours after each dosing, transferring the samples into tubes containing heparin and separating the plasma by centrifugation.

The plasma has been assayed for rifaximin on the validated LC-MS/MS (Liquid Chromathography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry) method and the maximum plasma concentration observed ( $C_{max}$ ), the time to reach the ( $C_{max}$ ), ( $t_{max}$ ), and the area under the concentration - time curve (AUC) have been calculated.

The experimental data reported in the following table 1 clearly show that rifaximin  $\alpha$  and rifaximin  $\beta$  are negligibly absorbed, while rifaximin  $\gamma$  is absorbed at a value ( $C_{max} = 0.668 \mu\text{g/ml}$ ) comprised in the range of from 0.1 to 1.0  $\mu\text{g/ml}$ .

**Table 1**

**Pharmacokinetic parameters for rifaximin polymorphs following single oral administration of 100 mg/kg by capsules to female dogs.**

|                                      | $C_{max}$<br>ng/ml | $t_{max}$<br>h | AUC <sub>0-24</sub><br>ng·h /ml |
|--------------------------------------|--------------------|----------------|---------------------------------|
|                                      | Mean               | Mean           | Mean                            |
| <b>Polimorph <math>\alpha</math></b> | 2.632              | 9.5            | 13                              |
| <b>Polimorph <math>\beta</math></b>  | 1.096              | 4              | 11                              |
| <b>Polimorph <math>\gamma</math></b> | 668.22             | 2.25           | 3908                            |

Intrinsic dissolution tests have been carried out on each of the three polymorphs according to the method described in the monograph 1087 at pages 2512 - 2513 of the USP (U.S. Pharmacopoeia) 27, clearly showing

significant differences among rifaximin  $\alpha$ , rifaximin  $\beta$  and rifaximin  $\gamma$ .

A sample of each rifaximin polymorph has been put into a die and compressed at 5 tons by means of a punch of a hydraulic press to obtain a compacted pellet.

5 The die-holder containing the compacted pellet has then been mounted on a laboratory stirring device, immersed in a dissolution medium and rotated by means of the stirring device.

The test, carried out in a dissolution medium made of aqueous phosphate buffer at pH 7.4 and of sodium lauryl sulfate at a temperature of  
10  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , has shown significant differences among the intrinsic dissolution rates exhibited by the three polymorphs.

Rifaximin  $\alpha$  has shown disintegration of the compacted pellet within 10 minutes so that it has not been possible to calculate the value of its intrinsic dissolution, while the intrinsic dissolution of rifaximin  $\gamma$  has been about ten  
15 times as much that of rifaximin  $\beta$  in accordance with its bioavailability which is more than hundred times as much that of rifaximin  $\beta$ .

The above experimental results further point out the differences existing among the three rifaximin polymorphs.

The forms  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  can be advantageously used in the production of  
20 medicinal preparations having antibiotic activity, containing rifaximin, for both oral and topical use. The medicinal preparations for oral use will contain rifaximin  $\alpha$  or  $\beta$  or  $\gamma$  together with the usual excipients, for example diluting agents such as mannitol, lactose and sorbitol; binding agents such as starches, gelatines, sugars, cellulose derivatives, natural gums and polyvinylpyrrolidone;  
25 lubricating agents such as talc, stearates, hydrogenated vegetable oils, polyethylenglycol and colloidal silicon dioxide; disintegrating agents such as starches, celluloses, alginates, gums and reticulated polymers; coloring, flavoring and sweetening agents.

62

The present invention relates to all of the solid preparations administrable by the oral route, for instance coated and uncoated tablets, of soft and hard gelatine capsules, sugar-coated pills, lozenges, wafer sheets, pellets and powders in sealed packets.

5       The medicinal preparations for topical use will contain rifaximin  $\alpha$  or  $\beta$  or  $\gamma$  together with usual excipients, such as white petrolatum, white wax, lanoline and derivatives thereof, stearyl alcohol, propylene glycol, sodium lauryl sulfate, ethers of fatty polyoxyethylene alcohols, esters of fatty polyoxyethylene acids, sorbitan monostearate, glyceryl monostearate, 10 propylene glycol monostearate, polyethylene glycols, methylcellulose, hydroxymethyl propylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, colloidal aluminium and magnesium silicate, sodium alginate.

The present invention relates to all of the topical preparations, for instance ointments, pomades, creams, gels and lotions.

15       The invention is further illustrated by some examples. Such examples are not to be taken as a limitation of the invention, it is in fact evident that the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms can be obtained by suitably combining between them the above mentioned conditions of crystallization and drying.

#### Example 1

##### 20       Preparation of raw rifaximin and of dried raw rifaximin

In a three-necked flask equipped with mechanic stirrer, thermometer and reflux condenser, 120 ml of demineralized water, 96 ml of ethyl alcohol, 63.5 g of rifamycin O and 27.2 g of 2-amino-4-methylpyridine are loaded in succession at room temperature. After loading, the mass is heated at  $47 \pm 3^\circ\text{C}$  and kept under 25 stirring at this temperature for 5 hours, then is cooled to  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  and, during 30 minutes, is added with a mixture, prepared separately, of 9 ml of demineralized water, 12.6 ml of ethyl alcohol, 1.68 g of ascorbic acid and 9.28 g of aqueous concentrated hydrochloric acid. After completion of the addition, the mass is kept

under stirring for 30 minutes at an inner temperature of  $20\pm3^{\circ}\text{C}$  then 7.72 g of concentrated hydrochloric acid are dripped until a pH equal to 2.0, while keeping said temperature.

After completion of the addition, the mass is kept under stirring for 30 minutes, keeping an inner temperature of  $20^{\circ}\text{C}$ , then the precipitate is filtered and washed with a mixture of 32 ml of demineralized water and of 25 ml of ethyl alcohol. The resulting "raw rifaximin" (89.2 g) is dried under vacuum at room temperature for 12 hours obtaining 64.4 g of "dried raw rifaximin" which shows a water content of 5.6% and a diffractogram corresponding to the polymorphic form  $\beta$ . The product is further dried under vacuum until constant weight to afford 62.2 g of dried raw rifaximin having a water content of 2.2%, whose diffractogram corresponds to the polymorphic form  $\alpha$ .

The product is hygroscopic and the obtained polymorphic form is reversible: the polymorphic form  $\alpha$  absorbs water from atmospheric humidity, depending on the relative humidity and the exposure time. When the water content absorbed by the polymorphic form  $\alpha$  becomes higher than 4.5%, polymorphous  $\alpha$  turns to polymorphous  $\beta$ . This in its turn loses part of water by drying, changing into the polymorphic form  $\alpha$  when a water content between 2.0% and 3.0% is reached.

## Example 2

### Preparation of rifaximin $\gamma$

163 ml of ethyl alcohol and 62.2 g of dried raw rifaximin are loaded at room temperature into a three-necked flask equipped with mechanic stirrer, thermometer and reflux condenser. The suspension is heated at  $57\pm3^{\circ}\text{C}$  under stirring until complete dissolution of the solid, and added with 70 ml of demineralized water at this temperature in 30 minutes. After completion of the addition the temperature is brought to  $30^{\circ}\text{C}$  in 40 minutes and kept at this value until complete crystallization, then the temperature is further lowered to

0°C in 2 hours and kept at this value for 6 hours. The suspension is then filtered and the solid is washed with 180 g of demineralized water and dried under vacuum at room temperature until constant weight, thereby obtaining 52.7 g of pure rifaximin  $\gamma$  having water content of 1.5%.

- 5        The form  $\gamma$  is characterised by a powder X-ray diffractogram showing significant peaks at diffraction angles  $2\theta$  of 5.0°; 7.1°; 8.4°.

**Example 3**

**Preparation of rifaximin  $\alpha$**

- 10        62.2 Grams of dried raw rifaximin and 163 ml of ethyl alcohol are loaded at room temperature into a three-necked flask equipped with mechanic stirrer, thermometer and reflux condenser. The suspension is heated at  $57\pm3^\circ\text{C}$  until complete dissolution of the solid and then 70 ml of demineralized water are added at this temperature during 30 minutes. After completion of the addition, the temperature is brought to 30°C during 40 minutes and is kept at  
15        this value until plentiful crystallization. The temperature of the suspension is then brought to about 40°C and kept at this value during 20 hours under stirring; then the temperature is decreased to 0°C in 30 minutes and the suspension is immediately filtered. The solid is washed with 180 ml of demineralized water and dried under vacuum at room temperature until  
20        constant weight, thereby obtaining 51.9 g of rifaximin form  $\alpha$  with a water content equal to 2.5% and a powder X-ray diffractogram showing peaks at values of angles  $2\theta$  of 6.6°; 7.4°; 7.9°; 8.8°; 10.5°; 11.1°; 11.8°; 12.9°; 17.6°; 18.5°; 19.7°; 21.0°; 21.4°; 22.1°.

**Example 4**

25        **Preparation of rifaximin  $\alpha$**

89.2 Grams of raw rifaximin and 170 ml of ethyl alcohol are loaded at room temperature into a three-necked flask equipped with mechanic stirrer, thermometer and reflux condenser, then the suspension is heated at  $57\pm3^\circ\text{C}$

until complete dissolution of the solid. The temperature is brought to 50°C and then 51.7 ml of demineralized water are added at this temperature during 30 minutes. After completion of the addition the temperature is brought to 30°C in one hour and the suspension is kept for 30 minutes at this temperature  
5 obtaining a plentiful crystallization. The temperature of the suspension is brought to 40°C and kept at this value during 20 hours under stirring and then further lowered to 0°C during 30 minutes after which the suspension is immediately filtered. The solid is washed with 240 ml of demineralized water and dried under vacuum at 65°C until constant weight thereby obtaining 46.7  
10 g of rifaximin  $\alpha$  with a water content equal to 2.5%.

#### **Example 5**

##### **Preparation of rifaximin $\alpha$**

Example 3 is repeated, but increasing to 50°C the temperature at which the suspension is kept and lowering to 7 hours the time in which the suspension  
15 is kept at this temperature. The product obtained is equal to that of example 3.

#### **Example 6**

##### **Preparation of rifaximin $\beta$**

The crystallization of the dried raw rifaximin is carried out according to the process described in example 3. Drying under vacuum at room temperature is  
20 monitored by Karl Fischer and stopped when the water content reaches 5.0%: 52.6 g of rifaximin  $\beta$  are obtained characterised by a powder X-ray diffractogram showing peaks at values of angles  $2\theta$  of 5.4°; 6.4°; 7.0°; 7.8°; 9.0°; 10.4°; 13.1°, 14.4°; 17.1°; 17.9°; 18.3°; 20.9°.

#### **Example 7**

##### **Preparation of rifaximin $\alpha$ starting from rifaximin $\gamma$**

5 Grams of rifaximin  $\gamma$  are suspended in a mixture of 13 ml of ethyl alcohol and 5.6 ml of water and the suspension is heated at 40°C during 24 hours under stirring in a 50 ml flask equipped with condenser, thermometer and mechanic

69  
stirrer. The suspension is then filtered and the solid is washed with water, then dried under vacuum at room temperature until constant weight. 4 Grams of rifaximin are obtained showing a powder X-ray diffractogram corresponding to that of the polymorphic form  $\alpha$  and a water content equal to 2.6%.

5       **Example 8**

**Preparation of rifaximin  $\gamma$  starting from rifaximin  $\alpha$**

          15 Grams of rifaximin form  $\alpha$  and 52.4 ml of ethyl alcohol are loaded into a 250 ml three-necked flask equipped with reflux condenser, thermometer and mechanical stirrer; the suspension is heated under stirring at the  
10       temperature of 50°C until complete dissolution of the solid.

          The clear solution is added with 22.5 ml of water in 30 minutes under stirring, cooled to 30°C and kept at this temperature for 30 minutes. The formed suspension is cooled to 0°C under strong stirring and kept at this temperature during 6 hours. After this time, part of the suspension is taken,  
15       filtered, washed with demineralized water and dried under vacuum at 30°C until constant weight.

          The resulting product, 3.7 g, shows a diffractogram consistent with that of the form  $\gamma$  and a water content of 1.7%.

          The remaining part of the suspension is kept at 0°C for further 18 hours  
20       under strong stirring and then is filtered, washed with demineralized water and dried at 30°C under vacuum until constant weight. 9 Grams of product showing a diffractogram consistent with that of the form  $\gamma$  and a water content equal to 1.6% are obtained.

**Example 9**

25       **Preparation of rifaximin  $\alpha$  starting from rifaximin  $\beta$**

          5 Grams of rifaximin  $\beta$  having a water content equal to 5.0% are dried under vacuum at +30°C during 8 hours obtaining 4.85 g of rifaximin  $\alpha$  having a water content equal to 2.3%.

**Example 10****Preparation of rifaximin  $\beta$  starting from rifaximin  $\alpha$** 

5 Grams of rifaximin  $\alpha$  having a water content equal to 2.5% are kept during 40 hours in an atmosphere containing a relative humidity equal to 56%  
5 made by means of a saturated aqueous solution of calcium nitrate tetrahydrate.  
5.17 Grams of rifaximin  $\beta$  with a water content equal to 5.9% are obtained after this time.

**Example 11****Bioavailability in dogs by oral route**

10 Twelve 20 week pure-bred Beagle females dogs, and weighing between 5.0 and 7.5 kg, have been divided into three groups of four.

The first of these three groups has been treated with rifaximin  $\alpha$ , the second with rifaximin  $\beta$  and third with rifaximin  $\gamma$  according to the following procedure.

15 Each dog received orally 100 mg/kg of one of the rifaximin polymorphs in gelatin capsules and 2 ml blood samples were collected from the jugular vein of each animal before each administration and 1, 2, 4, 6, 8 and 24 hours after the administration. Each sample was transferred into an heparinized tube and was centrifuged; the plasma was divided into 500  $\mu$ l two aliquots and  
20 frozen at -20°C.

The rifaximin contained in the plasma was assayed by means of the validated LC-MS/MS method and the following parameters were calculated according to standard non-compartmental analysis:

25  $C_{max}$  = maximum plasma concentration of rifaximin observed in the plasma;

$T_{max}$  = time at which the  $C_{max}$  is reached;

AUC = area under the concentration-time curve calculated through the linear trapezoidal rule.

The results reported in the following table 2 clearly show how the rifaximin  $\gamma$  is very much more absorbed, more than  $10^2$  times, in respect of rifaximin  $\alpha$  and rifaximin  $\beta$  which are practically not absorbed.

Table 2

5        **Pharmacokinetic parameters for rifaximin polymorphs following single oral administration of 100 mg/kg by capsules to female dogs.**

|                    | $C_{max}$<br>ng/ml | $t_{max}$<br>h | $AUC_{0-24}$<br>ng·h/ml |
|--------------------|--------------------|----------------|-------------------------|
|                    | Mean               | Mean           | Mean                    |
| rifaximin $\alpha$ | 2.632              | 9.5            | 13                      |
| rifaximin $\beta$  | 1.096              | 4              | 11                      |
| rifaximin $\gamma$ | 668.22             | 2.25           | 3908                    |

**Example 12**

**Intrinsic dissolution test**

10        A sample of 100 mg of each rifaximin polymorph was submitted to the intrinsic dissolution test carried out as described in the monograph 1087 at pages 2512 - 2513 of the USP (U.S. Pharmacopoeia) 27.

100 Milligrams of a rifaximin polymorph were put into a die and compressed for 1 minute under a pressure of 5 tons by means of a punch in a hydraulic press.

15        A compacted pellet was formed in the die with a single face of defined area exposed on the bottom of the die so that from 50% to 75% of the compacted pellet could dissolve in an appropriate dissolution medium.

20        The holder containing the die was mounted on a laboratory stirring device, immersed in a glass vessel containing a dissolution medium and rotated at a rotation speed of 100 rpm by means of the stirring device, while keeping the temperature of the dissolution medium at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . The dissolution medium

contained in the glass vessel consisted of 1000 ml of 0.1 M aqueous phosphate buffer pH 7.4 containing 4.5 g of sodium lauryl sulfate and was kept at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  for the whole duration of the test.

Samples of 2 ml of solution were taken after 15, 30, 45 and 60 minutes from the start of the dissolution procedure and analysed by HPLC for the amount of rifaximin dissolved.

The sample containing rifaximin  $\alpha$  systematically showed disintegration of the compacted pellet within 10 minutes and said phenomenon was also present at lower concentrations (0.1% and 0.3%) of sodium lauryl sulfate and even in absence of said surfactant, so that the value of its intrinsic dissolution could not be calculated.

The intrinsic dissolution of rifaximin  $\gamma$  was about ten times as much that of rifaximin  $\beta$  at every time, as it can be inferred by the experimental results shown in the following table 3.

**Table 3**

**Intrinsic dissolution in 0.1 M aqueous phosphate buffer pH 7.4 with 0.45% sodium lauryl sulfate**

| Time (min)                                           | Rifaximin dissolved (mg/cm <sup>2</sup> ) |                    |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|
|                                                      | $\beta$ polymorph                         | $\gamma$ polymorph |
| 15                                                   | 0.28                                      | 2.46               |
| 30                                                   | 0.50                                      | 4.52               |
| 45                                                   | 0.72                                      | 6.44               |
| 60                                                   | 0.94                                      | 9.04               |
| Intrinsic dissolution rate (mg/min/cm <sup>2</sup> ) | 0.0147                                    | 0.1444             |

**CLAIMS**

1. Polymorph  $\alpha$  of rifaximin characterized by a water content lower than 4.5%, preferably comprised between 2.0% and 3.0%, and by a powder X-ray  
5 diffractogram showing peaks at values of the diffraction angles  $2\theta$  of 6.6°; 7.4°; 7.9°; 8.8°; 10.5°; 11.1°; 11.8°; 12.9°; 17.6°; 18.5°; 19.7°; 21.0°; 21.4°; 22.1°.
2. Polymorph  $\beta$  of rifaximin characterized by a water content higher than 4.5%, preferably comprised between 5.0% and 6.0% and by a powder X-ray  
10 diffractogram showing peaks at values of the diffraction angles  $2\theta$  of 5.4°; 6.4°; 7.0°; 7.8°; 9.0°; 10.4°; 13.1°; 14.4°; 17.1°; 17.9°; 18.3°; 20.9°.
3. Polymorph  $\gamma$  of rifaximin characterized by a water content comprised between 1.0% and 2.0% and by a powder X-ray diffractogram showing a mainly amorphous profile and few significant peaks at values of diffraction  
15 angles  $2\theta$  of 5.0°; 7.1°; 8.4°.
4. A process for the production of rifaximins  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , characterized in that a molar equivalent of rifamycin O is reacted with an excess of 2-amino-4-methylpyridine, preferably from 2.0 to 3.5 molar equivalents, in a solvent mixture consisting of water and ethyl alcohol in volumetric ratios between 1:1  
20 and 2:1 for a time between 2 and 8 hours, at a temperature between 40°C and 60°C; the reaction mixture is treated at room temperature with a solution of ascorbic acid in a mixture of water, ethyl alcohol and concentrated aqueous hydrochloric acid, then brought to pH 2.0 by hydrochloric acid concentrated aqueous solution, the suspension is filtered, the resulting solid is washed with  
25 the same water/ethyl alcohol solvent mixture as used in the previous reaction, the resulting raw rifaximin is purified by dissolution in ethyl alcohol at a temperature between 45°C and 65°C; precipitation by addition of water, preferably in weight amounts between 15% and 70% to the weight amount of

ethyl alcohol used for the dissolution; lowering of the temperature of the suspension to values between 50°C and 0°C under stirring for a time between 4 and 36 hours, and finally filtration of the suspension, washing the resulting solid with water and drying it under vacuum or under conditions of normal pressure, optionally in the presence of a drying agent, at a temperature between room temperature and 105°C, for a time between 2 and 72 hours.

5. A process according to claim 4 for the preparation of rifaximin  $\alpha$ , characterized in that, after addition of water to the raw rifaximin ethanol solution, temperature is lowered to a value between 28°C and 32°C to start crystallization, the resulting suspension is kept between 40°C and 50°C under stirring for a time between 6 and 24 hours, cooled to 0°C during a time between 15 minutes and one hour, then filtered, and the resulting solid is dried to a water content lower than 4.5%, preferably between 2.0% and 3.0%.

6. A process according to claim 4 for the preparation of rifaximin  $\beta$ , characterized in that, after addition of water to the raw rifaximin ethanol solution, temperature is lowered to a value between 28°C and 32°C to start crystallization, the resulting suspension is kept between 40°C and 50°C under stirring for a time between 6 and 24 hours, cooled to 0°C during a time between 15 minutes and one hour, then filtered, and the resulting solid is dried to a water content higher than 4.5%, preferably between 5.0% and 6.0%.

7. A process according to claim 4 for the preparation of rifaximin  $\gamma$  characterized in that, after addition of water to the raw rifaximin ethanol solution, temperature is lowered to a value between 28°C and 32°C to start crystallization, the resulting suspension is cooled to about 0°C and kept at this temperature, under stirring, for a time between 6 and 24 hours, then is filtered, and the resulting solid is dried to a water content between 1.0% and 2.0%.

8. A process for the preparation of rifaximin  $\alpha$ , characterized in that rifaximin  $\gamma$  is suspended in a solvent mixture consisting of ethyl alcohol/water in

27  
a 7:3 volumetric ratio, the suspension is heated to a temperature between 38°C and 50°C and kept at this temperature, under stirring, for a time between 6 and 36 hours, the suspension is filtered, the resulting solid is washed with water and dried to a water content lower than 4.5%, preferably between 2.0% and 3.0%.

5 9. A process for the preparation of rifaximin  $\beta$ , characterized in that rifaximin  $\gamma$  is suspended in a solvent mixture consisting of ethyl alcohol/water in a 7:3 volumetric ratio, the suspension is heated to a temperature between 38°C and 50°C and kept at this temperature, under stirring, for a time between 6 and 36 hours, the suspension is filtered, the resulting solid is washed with water and is dried to a  
10 water content higher than 4.5%, preferably between 5.0% and 6.0%.

10. A process for the preparation of rifaximin  $\gamma$ , characterized in that rifaximin  $\alpha$  or  $\beta$  is dissolved in ethyl alcohol at a temperature between 50°C and 60°C, demineralized water is added to an ethyl alcohol/water 7:3 volumetric ratio, the solution is cooled to 30°C under strong stirring and the resulting  
15 suspension is cooled to 0°C and kept at this temperature for a time between 6 and 24 hours, then it is filtered and the resulting solid is washed with water and dried to a water content lower than 2.0%.

11. A process for the preparation of rifaximin  $\beta$  characterized in that rifaximin  $\alpha$  is kept in an ambient having relative humidity higher than 50% for a time  
20 between 12 and 48 hours.

12. A process for the preparation of rifaximin  $\alpha$  characterized in that rifaximin  $\beta$  is dried under atmospheric pressure, or under vacuum, or in the presence of a drying agent, at a temperature between the room temperature and 105°C, for a time between 2 and 72 hours.

25 13. The use of rifaximin  $\alpha$  in the preparation of medicaments for oral use with antibiotic activity together with the usual excipients like diluting, binding, lubricating, disintegrating, coloring, flavoring and sweetening agents.

14. The use of rifaximin  $\beta$  in the preparation of medicaments for the oral use

having antibiotic activity, together with conventional excipients.

15. The use of rifaximin  $\gamma$  in the preparation of medicaments for the oral use having antibiotic activity, together with conventional excipients.

16. The use according to claims 13 to 15 characterized in that the preparations  
5 for oral use are selected from coated and uncoated tablets, hard and soft gelatine capsules, sugar-coated pills, lozenges, wafer sheets, pellets and powders in sealed packet.

17. The use of rifaximin  $\alpha$  in the preparation of medicaments with antibiotic activity for topical use.

10 18. The use of rifaximin  $\beta$  in the preparation of medicaments with antibiotic activity for topical use.

19. The use of rifaximin  $\gamma$  in the preparation of medicaments with antibiotic activity for topical use.

20. The use according to claims 17 to 19 characterized in that the preparations  
15 for the topical use are selected from ointments, pomades, creams, gels and lotions.

ht

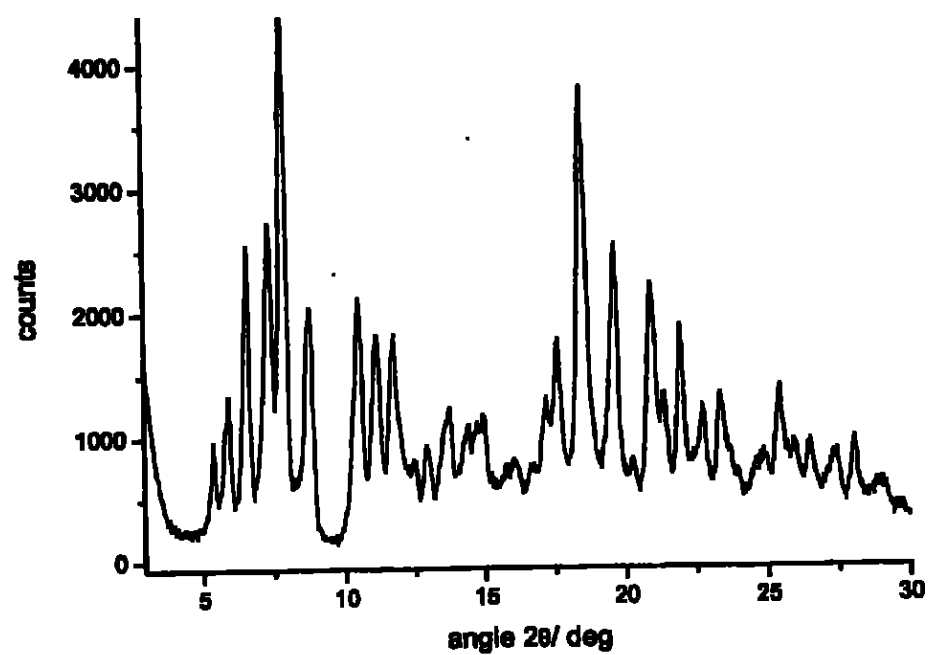


FIGURE 1

57

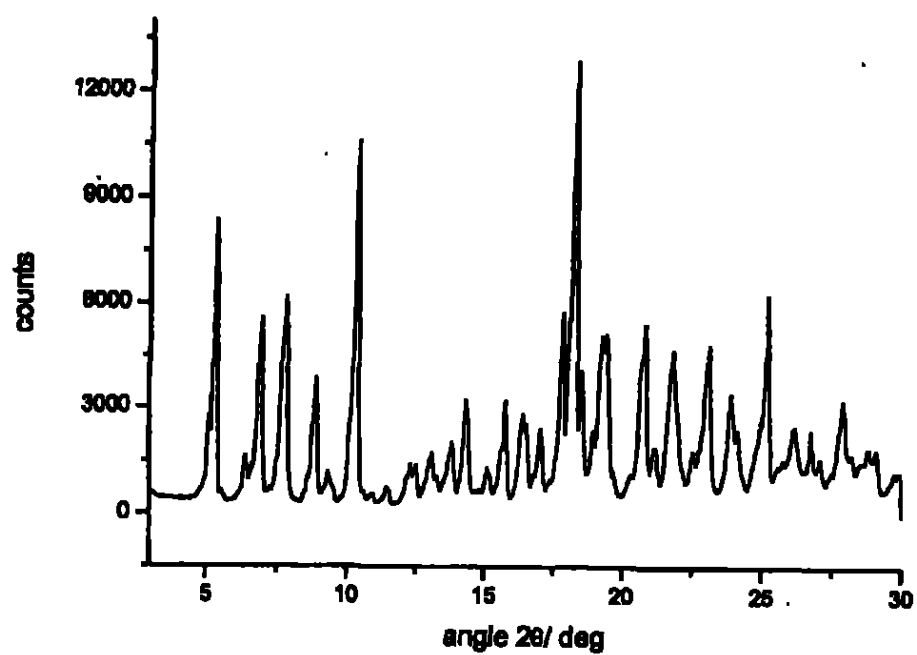


FIGURE 2

26

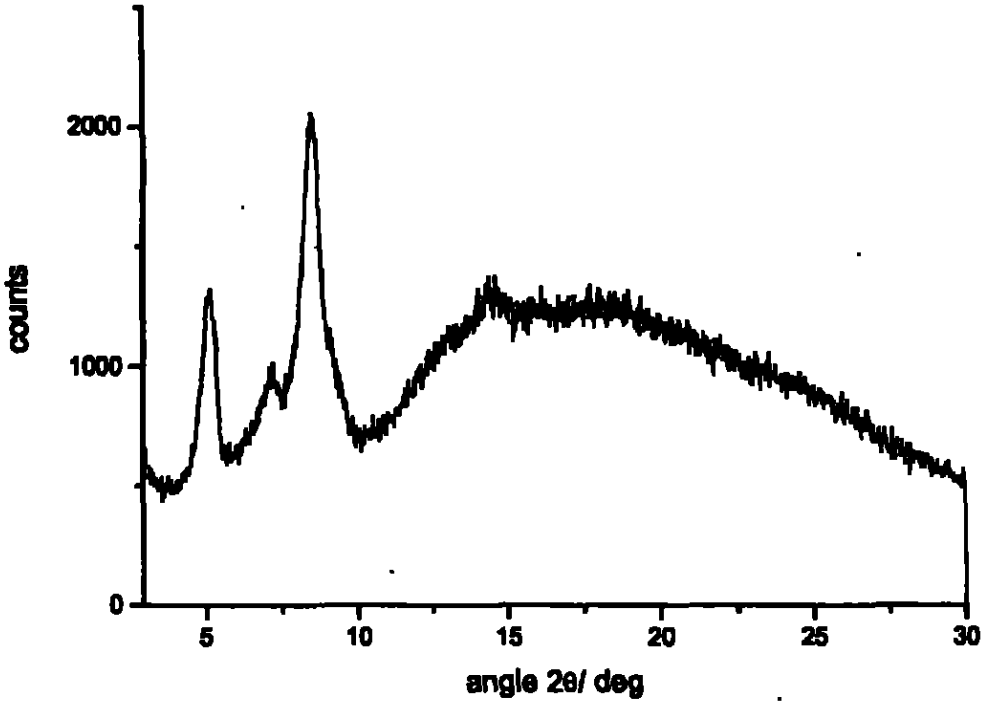


FIGURE 3

75 20 0

7

TRADUCCIÓN OFICIAL DEL ITALIANO AL ESPAÑOL DE APOSTILLE  
CORRESPONDIENTE AL TEXTO REDACTADO EN LENGUA INGLESA Y  
ESPAÑOLA DE PODER DE ALFA WASSERMANN S.p.A. A DILIA MARIA  
RODRÍGUEZ D'ALEMAN Y CLAUDIA LUCÍA CARO RAMÍREZ. 31 de marzo  
de 2004.

PRIMERA DE TRES PÁGINAS DEL DOCUMENTO:

- Encabezado de la firma Clarke, Modet & Co. Colombia. Propiedad industrial y derechos de autor. Poder.
- Dos columnas de texto, a la izquierda en español, a la derecha en inglés, sobre el poder en mención, firmado por Giampaolo Girotti, Representante Legal de ALFA WASSERMANN S.p.A.
- Firma ilegible del notario y sello circular: Vico Carlo di Aldo. Notario en Bologna. Parte superior derecha: sello del notario y estampilla de 10,33 Euros.

SEGUNDA DE TRES PÁGINAS DEL DOCUMENTO, TEXTO EN ITALIANO:

Certificado Notarial de firma y representación legal.

Firma ilegible del notario y sello circular: Vico Carlo di Aldo. Notario en Bologna

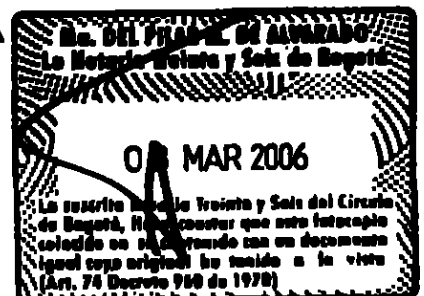
TERCERA DE TRES PÁGINAS DEL DOCUMENTO, TEXTO EN ITALIANO:

PROCURADURÍA DE LA REPÚBLICA DE BOLOÑA

"APOSTILLE"

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

*Sandra Cardona Mejía*  
SANDRA PATRICIA CARDONA MEJÍA  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
RESOLUCION No. 0324 M: JUSTICIA 1997



23

CARDONA MEJIA  
TRAD. OFICIAL  
RESOLUCION 1332 DE 1997

1. PAIS: ITALIA

El presente acto público

2. Ha sido suscrito por: VICO CARLO

3. Agente en calidad de: NOTARIO EN BOLOÑA

4. Tiene el sello /timbre de: Sello de Estado

CERTIFICADO

5. En: Boloña 6. El 5 de abril de 2004

7. Por : El Dr. Antonio Gustapane. Procurador Sustituto de la República

8. Con el número : 1179/2004 del Registro de Apostille

9. Sello /timbre: timbre de la Procuraduría de la República – Tribunal de Boloña

10. Firma: EL PROCURADOR SUSTITUTO DE LA REPUBLICA

Doctor Antonio Gustapane. Firma ilegible.

Sello del Procurador Sustituto de la República.

FIN DEL DOCUMENTO.

*Sandra Cordona*  
SANDRA PATRICIA CARDONA MEJIA  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
RESOLUCION No. 1332 DE JUSTICIA 1997



NO SE AGUIME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO  
2004 JUN 11 P 12:54  
JEFE DE RELACIONES  
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES  
*Santiago Cardenas*  
36925  
CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPLEA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

*Salvo*  
-in line 70  
"TERPES" 2  
"NIMINATI"

*[Signature]*  
Sr. DEL PILAR E. DE AVARADO  
La Notaría Tercera y Sala de Bogota  
08 MAR 2006  
La suscrita notaria, Cuenta y Sala del Circulo  
de Bogota, visto concur que esta fotocopia  
coincide en su contenido con el documento  
igual cuyo original ha tenido a la vista  
(Art. 74 Decreto 968 de 1970)

CLARKE, MODET & C<sup>o</sup> - COLOMBIA

PROPIEDAD INDUSTRIAL Y  
DERECHOS DE AUTOR

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DELIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Santa Fé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

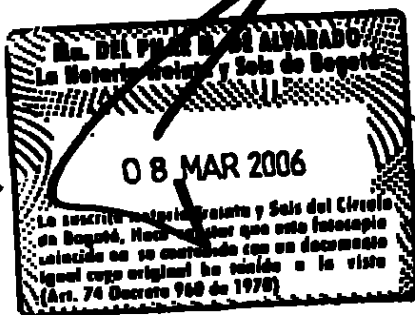
- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y señas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, laborales y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: condonar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistír, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistír a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculta (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieran.

Dado y firmado en

a los

días de

de



-COLOMBIA-

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned  
*Giampaolo Girotti*  
legal representative(s) of

ALFA WASSERMANN S.p.A.

an organization existing under the laws of  
Italy

and in present execution of its business activity, domiciled at  
Contrada 3, Ennio - ALANNO, Italy

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DELIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, Identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, Identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Santa Fé de Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, vegetal varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtention or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: condonate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the above mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at

on this 3<sup>rd</sup> day of March

of 2004

*Giampaolo Girotti*  
Firma / signature

Dr. Giampaolo Girotti, Chief Operating Officer  
on behalf of ALFA WASSERMANN S.p.A.



**CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es  
SOCIEDAD)**  
(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, Mexico  
y Venezuela)

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_  
el Notario que suscribe DA FE de que:

1. \_\_\_\_\_  
(nombre de la persona que firma el poder) mayor de  
edad y domiciliado en \_\_\_\_\_ firmó de su  
puño y letra el documento que antecede.
2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está  
legalmente capacitado para el otorgamiento.
3. El otorgante ha firmado el referido documento en su  
carácter de \_\_\_\_\_ de la persona jurídica  
\_\_\_\_\_
4. La citada persona jurídica con sede en \_\_\_\_\_  
está legalmente constituida, que  
tiene actualmente existencia legal y que el acto para  
el cual se ha otorgado este poder está comprendido  
entre los que constituyen su objeto social.
5. El otorgante tiene efectivamente la representación  
que ostenta, que esta es legítima y que está  
facultada para otorgar este poder.
6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me  
constan porque he tenido a la vista los documentos  
auténticos.

\_\_\_\_\_  
Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consul de  
Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

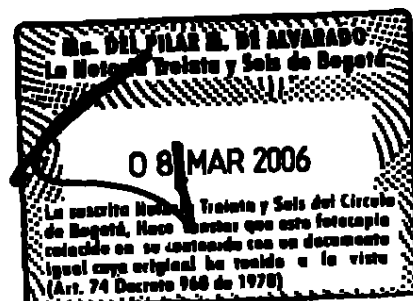
**NOTARIAL CERTIFICATE ( When the applicant is a  
CORPORATION)**  
(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A.  
and Venezuela)

This 31st day of March .....2004  
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. Dr. Giampaolo Girotti  
(name of the person who signs the power of attorney)  
of legal age and domiciled in Via Ragazzi  
del '99 n.5, Bologna, Italy set his  
hand on the foregoing document.
2. The grantor is to him personally known and that he/she  
has legal capacity to execute the document.
3. The grantor has executed the foregoing document in  
his capacity / of Chief Operating  
Officer of the juridical person  
ALFA WASSERMANN S.p.A.
4. The mentioned juridical person with place of business in  
ALANNO (PE) Italy is duly  
organized, has actual legal existence and that the  
purposes for which the power of attorney is granted  
are within the scope of its corporate purposes.
5. The grantor has in fact the referred quality and that  
his/her representation is legal and that he/she is  
empowered to grant this power of attorney.
6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on  
the authentic documents which for such purpose were  
exhibited to me.

\_\_\_\_\_  
Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the  
signature of the Notary Public.





## PROCURA DELLA REPUBBLICA DI BOLOGNA

### APOSTILLE

Convention de l'Aja du 5 October 1961

1) Paese **ITALIA**

Il presente atto pubblico

2) è stato sottoscritto da **VICO CARLO**

3) agente in qualità di **NOTAIO IN BOLOGNA**

4) è segnato dal contrassegno / timbro  
il sigillo di Stato

### ATTESTATO

5) a Bologna

6) il **05 APR 2004**

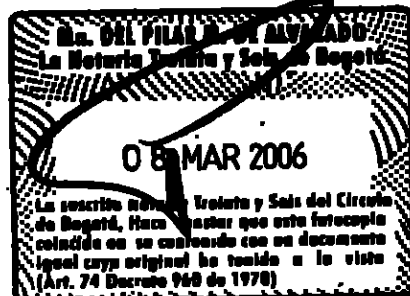
6) da Dr. Antonio Gustapane Sostituto Procuratore della Repubblica

7) sotto il numero **1179** /2004 Reg. Apostille

8) contrassegno / 



Il Sostituto Procuratore della Repubblica  
**Dr. Antonio Gustapane**





# Industria y Comercio

## SUPERINTENDENCIA

### Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

### REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

| PATENTE DE INVENCION ( )                                                               | MODELO DE UTILIDAD ( ) | USUARIO | RADICADOR |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------|-----------|
| -Indicación de que se solicita la concesión de una patente.                            | ( )                    | ( )     | ( )       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. | ( )                    | ( )     | ( )       |
| -Descripción de la invención.                                                          | ( )                    | ( )     | ( )       |
| -Dibujos de ser estos pertinentes.                                                     | ( )                    | ( )     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                        | ( )                    | ( )     | ( )       |
| COMPLETA ( )                                                                           | INCOMPLETA ( )         | ( )     | ( )       |

### DISEÑO INDUSTRIAL ( )

|                                                                                                             |                |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----|
| -Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.                                            | ( )            | ( ) |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | ( )            | ( ) |
| -Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | ( )            | ( ) |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )            | ( ) |
| COMPLETA ( )                                                                                                | INCOMPLETA ( ) | ( ) |

### ESQUEMA DE TRAZADO ( )

|                                                                                        |                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----|
| -Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.                       | ( )            | ( ) |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. | ( )            | ( ) |
| -Representación gráfica del Esquema Trazado.                                           | ( )            | ( ) |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                        | ( )            | ( ) |
| COMPLETA ( )                                                                           | INCOMPLETA ( ) | ( ) |

Firma Responsable:

Fecha:

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI**

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
RODRIGUEZ DILIA MARIA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
ALFA WASSERMANN S.P.A.

P670

|            |                            |               |
|------------|----------------------------|---------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 06 23325      |
|            | Solicitud internacional    | EP2004/012490 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 07/06/2006    |
|            | Trámite                    | 11            |
|            | Evento                     | 378           |
|            | Actuación                  | 430           |
|            | Oficio No.                 | 6540          |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 16 JUN. 2006  
jramos