

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 823**

51 Int. Cl.:

C12P 17/18 (2006.01)

C12P 19/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014** **PCT/EP2014/078552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15091851**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014** **E 14821152 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020** **EP 3083976**

54 Título: **Proceso para la preparación de Tiacumicina b**

30 Prioridad:

20.12.2013 NO 20131718

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.03.2021

73 Titular/es:

XELLIA PHARMACEUTICALS APS (100.0%)

Dalslandsgade 11

2300 Copenhagen S, DK

72 Inventor/es:

HANSEN, ESPEN FRIDTJOF y

KLEMSDAL, HÅVARD

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 813 823 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para la preparación de Tiacumicina b

5 La presente invención se refiere a un proceso mejorado para la preparación y purificación de Tiacumicina B. Específicamente, la invención se refiere a una purificación de Tiacumicina B a partir de un caldo de fermentación seco, seguida de técnicas de extracción y cromatografía. El proceso de acuerdo con la invención es más simple que los procesos de acuerdo con la técnica anterior y puede usarse fácilmente a gran escala para la producción comercial.

10 La Tiacumicina B se puede producir como se describe en US4918174 o enWO2004014295.

Resumen de la invención

15 La presente invención se refiere a un proceso para preparar Tiacumicina B que comprende las etapas de secar un caldo de fermentación antes de su extracción con metanol.

En particular, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de Tiacumicina B que comprende las etapas de:

20 a) fermentación de una cepa productora de Tiacumicina B;
b) secado del caldo de fermentación;
c) extracción del material seco con metanol
en donde la cepa de la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en *Dactylosporangium* y *Actinoplanes*.

25 La etapa de secado b) de acuerdo con la presente invención puede realizarse mediante secado por pulverización o liofilización.

El solvente usado de acuerdo con el presente método es metanol.

30 La relación entre el volumen del disolvente y la masa de caldo de fermentación seco de acuerdo con el presente método puede ser de 1-6 ml/g. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, la relación entre el volumen del disolvente y la masa del caldo de fermentación seco es de 2-4 ml/g.

35 De acuerdo con la presente invención, la cepa productora de Tiacumicina B que se usará en la etapa de fermentación se selecciona del grupo que consiste en *Dactylosporangium* y *Actinoplanes*.

Los diversos aspectos y más de la presente invención, incluidas varias modalidades, se describirán con más detalle, con referencia a la descripción detallada, los ejemplos y los dibujos adjuntos.

Figuras

40 La Figura 1 muestra la eficiencia de extracción a diferentes concentraciones de disolvente de un fermentado secado por pulverización.

La Figura 2 muestra el rendimiento de extracción a diferentes concentraciones de metanol de un fermentado secado por aspersión.

45 La Figura 3 muestra el rendimiento cuando se extrae un fermentado secado por pulverización a diferentes volúmenes de metanol acuoso al 75 % v/v.

Descripción detallada

50 De acuerdo con la presente invención, cualquier cepa bacteriana productora de Tiacumicina B seleccionada del grupo que consiste en *Dactylosporangium* y *Actinoplanes* puede usarse para proporcionar el caldo de fermentación según la presente invención. De acuerdo con una modalidad, la Tiacumicina B se puede producir por fermentación de *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie hamdenensis NRRL 18085 o *Actinoplanes deccanensis* ATCC 21983.

55 El caldo de fermentación es el medio nutritivo líquido que comprende la biomasa bacteriana y los compuestos de Tiacumicina.

El secado del caldo de fermentación se puede realizar mediante liofilización. Un proceso de liofilización preferido incluye reducir la temperatura a -40 °C y la presión a 200 mTorr, luego realizar un secado primario a una temperatura en el intervalo de -5 °C a 5 °C y luego un secado secundario a una temperatura de aproximadamente 20 °C.

60 El proceso de secado preferido para el caldo de fermentación de acuerdo con la presente invención es el secado por pulverización. A pesar de la alta temperatura en el proceso de secado por atomización, la Tiacumicina B se puede recuperar con un alto rendimiento.

Un proceso de secado por pulverización preferido incluye una temperatura de entrada de 180-220 °C y una temperatura de salida de 80-100 °C. El secado se realiza para lograr un contenido de agua de 0 %-12 % p/p, más preferido es un contenido de agua de menos del 10 % p/p; por ejemplo, 2m %-8 % p/p.

5 El caldo de fermentación seco se extrae con metanol.

El pH preferido durante la extracción es aproximadamente de 5-7, preferentemente de 6-7, y con mayor preferencia de 7. La temperatura preferida durante la extracción es de 20-25 °C.

10 La concentración de metanol en la solución de extracción se ajusta subsecuentemente por evaporación o dilución a una concentración adecuada para la unión de Tiacumicina B en una resina de adsorción, por ejemplo, 50 % de metanol en agua. Después de unirse a una resina de adsorción, la resina se lava con una solución de disolvente acuoso para eliminar las impurezas no unidas, por ejemplo, 50 % de disolvente orgánico. La Tiacumicina B unida se puede eluir con un disolvente que comprende un 60-100 % de disolvente orgánico y 0-40 v/v de agua.

15 Datos experimentales:

Ejemplo 1

20 *El fermentado de Dactylosporangium aurantiacum* la subespecie hamdenensis NRRL 18085 se secó por pulverización directamente mediante el uso de un secador por pulverización Niro Mobile Minor con una boquilla de 2 fluidos. La presión del aire fue de 1,2 bar. La temperatura de entrada fue de aprox. 200 °C y la temperatura de salida fue 90-92 °C. La tasa de alimentación fue de 0,5-1,0 litros por hora.

25 El polvo secado por pulverización se dividió en ocho matraces aforados de 5 ml con aprox. 1 g en cada uno. Luego se adicionó el disolvente hasta la marca de 5 ml. Se usaron diferentes disolventes: etanol, metanol, isopropanol, n-propanol, acetonitrilo, acetona, dimetilsulfóxido, agua. Los matraces se agitaron en un agitador de impelente durante una hora. La suspensión se retiró y se centrifugó. El sobrenadante resultante se analizó mediante HPLC. El DMSO fue el solvente más eficiente en la extracción. Sin embargo, el DMSO no es adecuado para la escala de producción debido a, por ejemplo, su alto punto de ebullición. Sorprendentemente, el metanol tuvo mayor rendimiento de los otros disolventes. El rendimiento fue de 50-100 % mayor en comparación con etanol, isopropanol, n-propanol, acetonitrilo y acetona.

30 Ejemplo 2

35 El fermentado secado por aspiración de *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie hamdenensis NRRL 18085 se extrajo con diferentes disolventes y diferentes composiciones de disolvente/agua. Se usaron etanol, metanol, isopropanol y acetona con concentraciones de 100 %, 75 %, 50 % y 25 % en agua. Se usó cinco veces el peso del fermentado seco en volumen (es decir, 200 mg de polvo por ml de solución). Las suspensiones se agitaron en un agitador de soporte durante cuatro horas. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se analizó por HPLC. Los resultados se muestran en la Figura 1.

40 Ejemplo 3

45 El fermentado secado por aspiración de *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie hamdenensis NRRL 18085 se extrajo con metanol a diferentes concentraciones en agua. Se transfirió 1 g de fermentado a un matraz de medición de 5 ml y se adicionó una solución de metanol/agua hasta la marca. Se probaron concentraciones de 65 %, 70 %, 75 %, 80 % y 85 % de metanol en agua purificada (RO). Las suspensiones se agitaron en un agitador de soporte durante 1,5 horas. Las suspensiones se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron por HPLC. También se determinaron los pesos en seco de los sobrenadantes.

50 Los resultados se muestran en la figura 2.

Hubo un pico en el rendimiento de extracción al 75-80 % de metanol. El peso en seco disminuyó al aumentar la concentración de metanol. La pureza por HPLC permaneció igual con todas las concentraciones de metanol.

55 Ejemplo 4

60 El fermentado secado por aspiración de *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie hamdenensis NRRL 18085 se extrajo con diferentes volúmenes de 75 % de metanol/agua. Se adicionó 1 g de fermentado a 2, 3, 4, 5 y 10 ml de metanol al 75 % en diferentes tubos. Las suspensiones se agitaron en un agitador de soporte durante 1,5 horas. Las suspensiones se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron por HPLC.

Los resultados se muestran en la Figura 3. El rendimiento fue similar para todos los volúmenes.

65 Ejemplo 5

5 El fermentado secado por aspiración de *Dactylosporangium aurantiacum* la subespecie hamdenensis NRRL 18085 se extrajo con una solución de metanol/agua al 75 % (3 veces el peso en volumen) en agitación durante dos horas. La suspensión se centrifugó y se concentró dos veces en un evaporador rotatorio para obtener un d 50 % de metanol en la solución. El concentrado se cargó directamente en una resina HP20 empaquetada en una columna. La columna se lavó con metanol al 50 % y se eluyó con un gradiente de metanol del 50 % al 100 %. El rendimiento fue del 92 %.

Ejemplo 6

10 La etapa de secado de la presente invención se puede realizar liofilizando tanto a pequeña como a gran escala, como se muestra en los ejemplos más abajo.

6.1 Liofilización a pequeña escala

15 4 litros del fermentado de *Dactylosporangium aurantiacum* de la subespecie hamdenensis NRRL 18085 se vertieron en bandejas de acero (altura del líquido 1,5-2,0 cm). Las bandejas se montaron en un liofilizador Virtis Genesis 12ES y se congelaron a -40 °C. Una vez alcanzada la temperatura mencionada se dejó reposar durante dos horas. Luego, el condensador se enfrió hasta aproximadamente -50 °C y se estableció un vacío de 200 mTorr. La temperatura del estante se ajustó a -5 °C durante 600 min. Luego, la temperatura del estante se ajustó rápidamente a 0 °C y se mantuvo así durante 1250 min. Se realizó otro ajuste rápido de la temperatura del estante a + 5 °C, y el producto se mantuvo a esta temperatura durante 600 min. El secado secundario se realizó mediante ajuste rápido a + 20 °C, tras lo cual se dejó el producto durante 1250 min al vacío (200 mTorr). Luego se sacaron los tanques del liofilizador y se obtuvieron 179 g de material seco.

6.2 Liofilización a gran escala

25 110 litros aprox. del fermentado de *Dactylosporangium aurantiacum* de la subespecie hamdenensis NRRL 18085 en 48 se vertieron en bandejas de acero (altura del líquido 1,5-2,0 cm). Las bandejas se colocaron en dos liofilizadores y se congelaron a -20 °C. Una vez alcanzada la temperatura mencionada, el fermentado se dejó reposar un rato. El condensador se enfrió a aproximadamente -40 °C. Luego se estableció un vacío de aproximadamente 200 mTorr. La temperatura del estante se ajustó a + 40 °C durante aproximadamente 44 horas. Luego se sacaron las bandejas del liofilizador y se obtuvieron 6,6 kg de material seco.

35 400 g de liofilizado de *Dactylosporangium aurantiacum* de la subespecie hamdenensis NRRL 18085, se adicionaron a 2000 ml de metanol-agua al 80 % v/v y se agitó durante 1 hora. Luego, la mezcla se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min. Se decantó el sobrenadante (volumen de 1550 ml). Al sedimento se adicionó a 1400 ml de metanol-agua al 80 % v/v. La mezcla se dejó durante la noche y se agitó durante 1 hora al día siguiente. Luego se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min. Se decantó el sobrenadante (volumen de 1380 ml). Ambos sobrenadantes se combinaron hasta un volumen total de 2930 ml. Rendimiento total 79 %.

40 A continuación, la solución se evaporó a presión reducida en un baño de agua a 40 °C. El volumen final fue de 1220 ml que comprende un 40 % de agua medido por titulación de Karl Fisher. Esta solución se cargó en una columna empaquetada con una resina HP20.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de Tiacumicina B que comprende las etapas de:
 - a) fermentación de una cepa productora de Tiacumicina B;
 - b) secado del caldo de fermentación;
 - c) extracción del material seco con metanol,en donde la cepa de la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en *Dactylosporangium* y *Actinoplanes*.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el caldo se seca por pulverización o se liofiliza.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el caldo se seca por pulverización.
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el caldo se liofiliza.
5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de cromatografía que implica cargar la solución de extracción en una columna que comprende una resina adsorbente hidrófoba, opcionalmente lavar antes de la elución.

Figura 1

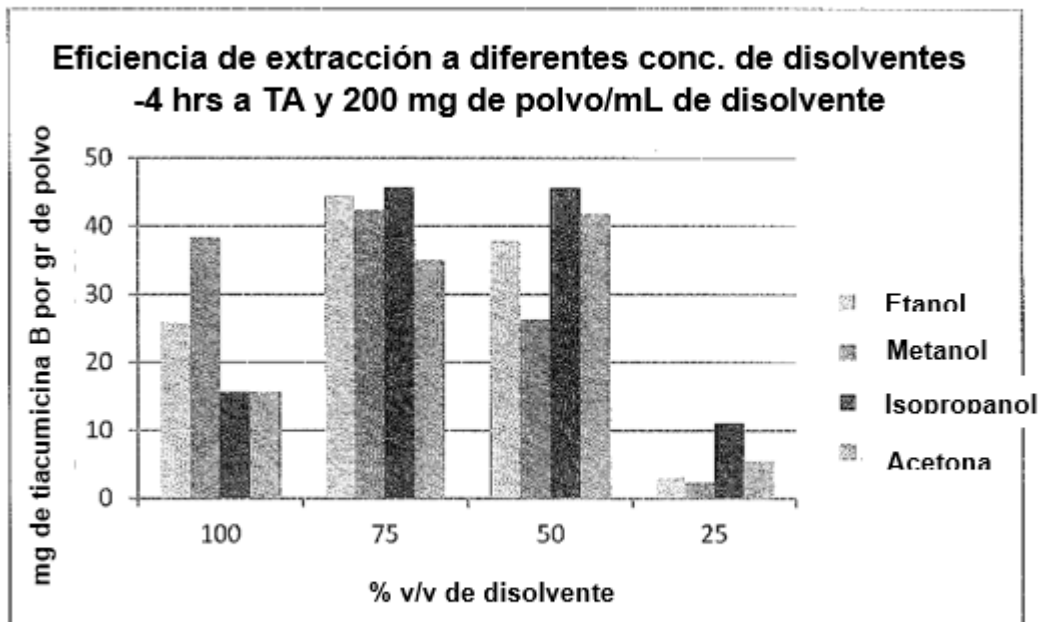


Figura 2

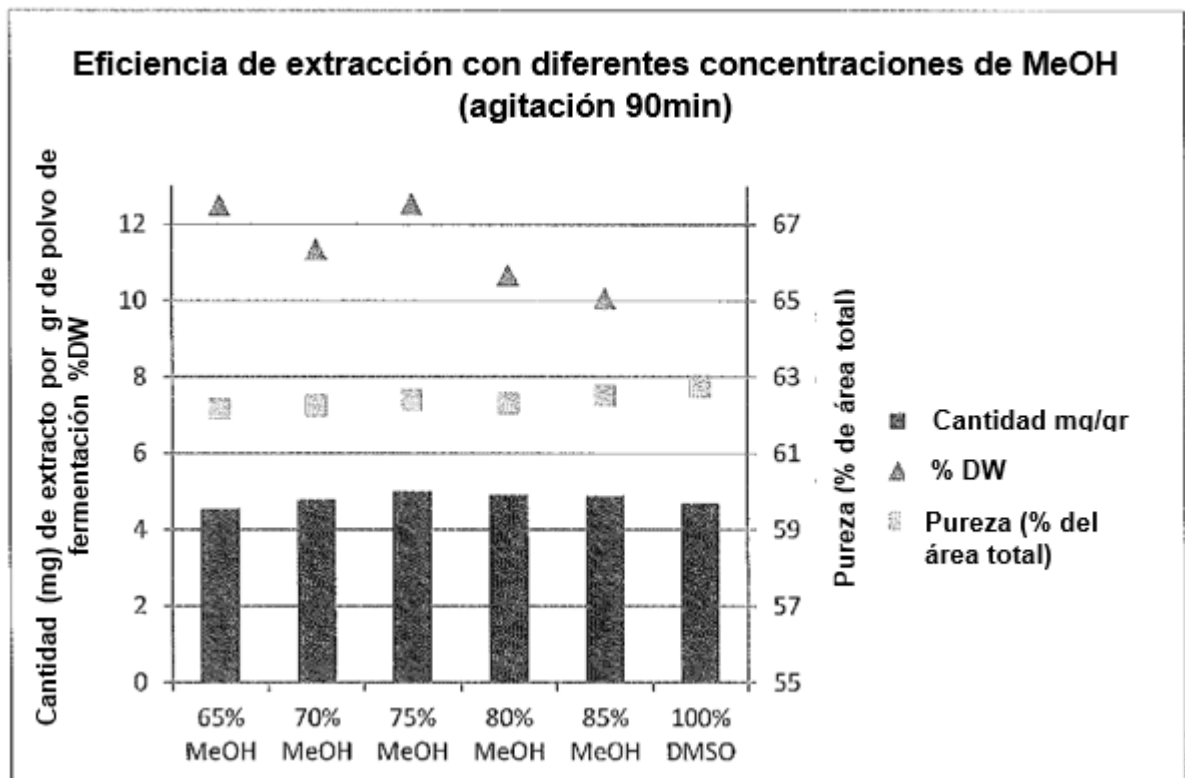


Figura 3

