



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 255**

51 Int. Cl.:
C07K 9/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05764867 .7**
96 Fecha de presentación : **15.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1735337**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2006**

54 Título: **Método para producir teicoplanina altamente pura.**

30 Prioridad: **16.04.2004 KR 10-2004-0026354**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2009

73 Titular/es:
DONG KOOK PHARMACEUTICAL Co., Ltd.
977-8 Daechi-dong
Kangnam-ku, Seoul 135-281, KR

72 Inventor/es: **Youn, Deok-Joong;**
Ryu, Ho-Myeung;
Lee, Kang-Hee;
Lim, Dae-Sung;
Lee, In-Kyu;
Kim, Sung-Woo;
Paeng, Hyun-Ki y
Cha, Kyung-Hoi

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 331 255 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

Método para producir teicoplanina altamente pura.

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con un método para cultivar microorganismos, que es capaz de producir teicoplanina, y de producir teicoplanina altamente pura utilizando un caldo de cultivo. Más particularmente, la presente invención se relaciona con un método para producir económicamente teicoplanina altamente pura, en el cual se produce teicoplanina en una región estable de pH neutro.

Antecedentes del estado del arte

Actualmente se considera como un problema serio que se propague un microorganismo resistente a los antibióticos debido al abuso de los mismos. Con respecto a esto, la teicoplanina que es un antibiótico glicopeptídico, actúa contra bacterias gram positivas. Particularmente, la teicoplanina, un antibiótico glicopeptídico, que actúa contra bacterias gram positivas, tales como el *Estafilococo aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Estafilococo* negativo a la coagulasa, *Clostridium* y *Enterococos*, es llamada la última línea de defensa contra las enfermedades infecciosas. La teicoplanina es un complejo de cinco tipos de componentes A2, que tienen diferentes cadenas ramificadas de ácidos grasos, y A3, que tiene una estructura de aglicona en la cual se remueve una fracción de azúcar de N-acil- β -D-glucosamina, incluida la cadena ramificada de ácido graso, de una estructura básica de A2. En esta descripción detallada, se designa a la teicoplanina por medio del complejo A2 de teicoplanina que actúa como un componente efectivo.

Generalmente, se adopta un proceso de síntesis química o un proceso de biosíntesis que utiliza el cultivo del microorganismo para producir antibióticos en cantidades comerciales. Los antibióticos glicopeptídicos tienen una estructura química complicada, en la cual se enlaza el azúcar a un esqueleto peptídico. Por lo tanto, la teicoplanina y los antibióticos glicopeptídicos comercializados como compuestos farmacéuticos son producidos de acuerdo al proceso de biosíntesis denominado proceso de fermentación. En el proceso de biosíntesis, se producen diferentes impurezas, tales como componentes del medio y productos metabólicos, concomitantemente con el antibiótico. Por lo tanto, se requieren una cantidad de procesos de separación y de purificación para la purificación de los antibióticos, que son factores críticos para la producción en forma económica del antibiótico altamente puro.

La teicoplanina, un antibiótico glicopeptídico producido a partir de *Actinoplanes teichomyceticus*, fue reportado primero en "The Journal of Antibiotics (Vol. 31; 170-177, 1978)". Se han hecho una cantidad de esfuerzos para separar la teicoplanina de un caldo de cultivo del microorganismo y la purificación de la teicoplanina utilizando diferentes procesos con el fin de producir teicoplanina grado farmacéutico. De acuerdo con la revista anterior la con la patente estadounidense No. 4.239.751, se divide un caldo de cultivo en una torta de micelio y en un filtrado. Se extrae la torta de micelio con acetona y se extrae nuevamente el extracto con butanol a un pH ácido. Se extrae el filtrado, liberado de la masa de micelio por filtración, con butanol a pH ácido. Posteriormente, se concentran las capas de butanol por medio de destilación al vacío para formar un precipitado. Se mezclan los precipitados entre sí, y se purifica la mezcla con una columna de Sefadex LH20. Se purifica adicionalmente el eluato de la columna de Sefadex LH20 con una resina de intercambio iónica ácida, tal como IR-120 y Dowex 50, y luego, se precipita la teicoplanina a 4°C. Sin embargo, la patente estadounidense No. 4.239.751 tiene desventajas ya que la purificación es muy complicada. Además, es difícil porque la columna de Sefadex LH20 es muy costosa para la aplicación en una producción a gran escala. Otra desventaja es que la recuperación y la purificación de la teicoplanina son muy pobres.

La patente coreana No. 367890 describe un proceso para extraer directamente teicoplanina a partir de un caldo de cultivo, en el cual se añade un solvente orgánico miscible en agua, tal como acetona, n-propanol y acetonitrilo sin la separación del micelio. Además, la patente coreana No. 118034 describe un proceso para producir teicoplanina por medio de la adición directa de una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida, tal como Dow XFS-43278.00 y Diaion SK-102, a un caldo de cultivo. Sin embargo, las patentes coreanas Nos. 367890 y 118034 tienen el inconveniente de que, a pesar de tratarse de un proceso de extracción directa de teicoplanina del caldo de cultivo que es más sencillo que en el caso de la patente estadounidense No. 4.239.751, es difícil de emplear en el proceso de producción debido a que la gran cantidad de solvente orgánico que inevitablemente se utiliza para extraer teicoplanina puede ocasionar polución ambiental. Además, es difícil de producir teicoplanina de alta pureza modificando únicamente el proceso de extracción.

Se han llevado a cabo muchos estudios para la purificación de la teicoplanina por medio de procesos cromatográficos en columna utilizando resinas sintéticas, como lo sugieren Heydorn y colaboradores, "J. of Biochem. Vol. 275; 6201-6206, 2000", y como se describe en la patente europea No. 241.758, la patente coreana No. 321304, la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 2003-0017067, y la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 2003-0034949. Adicionalmente, la patente europea No. 241.758 describe un proceso de purificación de teicoplanina que utiliza una resina de poliamida. Además, la patente coreana No. 184644 describe un proceso de extracción de teicoplanina a partir de micelio con pH alcalino, simplificando así un proceso complicado de extracción de la patente estadounidense No. 4.239.751. En la patente coreana No. 184644, después de la extracción de la teicoplanina, se neutraliza el caldo de cultivo básico, y luego se lo purifica utilizando la resina de poliamida de acuerdo a un procedimiento de la patente europea No. 241.758. Sin embargo, cuando se analizó la teicoplanina purificada por medio de HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), la purificación de la teicoplanina no fue

superior al 85% y la decoloración fue pobre. Por lo tanto, se puede observar que se requiere llevar a cabo un proceso adicional de purificación con el fin de producir teicoplanina altamente pura. Con el propósito de estudiar una ruta de biosíntesis de teicoplanina, Heydom y colaboradores han separado y purificado teicoplanina de acuerdo a un proceso cromatográfico utilizando una resina de intercambio iónico (Amberlita IRA958) y una resina hidrófoba de adsorción (Diaion HP2MGL). Sin embargo, este método sugerido por Heydom y colaboradores es desventajoso ya que hay que añadir continuamente ácido acético a la solución básica pasando a través de la resina para neutralizarlo y evitar una epimerización. Adicionalmente, cuando se analiza la pureza de la teicoplanina por medio de HPLC después de desalinizar, concentrar y liofilizar la solución purificada para producir teicoplanina en polvo, la pureza es apenas del 50 al 60% (p/p). Por lo tanto, no es deseable utilizar la teicoplanina en polvo así producida como ingrediente farmacéutico.

Mientras tanto, se han utilizado frecuentemente resinas porosas de adsorción para purificar antibióticos glicopeptídicos, incluida teicoplanina. La patente coreana No. 321304 describe en detalle un proceso para purificar teicoplanina, que incluye una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba utilizando una resina neutra de adsorción y una etapa de cromatografía de afinidad inmovilizada de lecitina. En ese momento, se selecciona la resina de adsorción neutra del grupo que consiste de XAD 16, HP 20, gel de sílice y carbón activado. En esta patente, se purifica directamente un caldo de cultivo filtrado por medio de cromatografía de adsorción hidrófoba utilizando HP-20 y similares, y así, es conveniente llevar a cabo el proceso. Sin embargo, en caso de que el caldo de cultivo filtrado extraído de una solución básica se adsorba en una resina, tal como HP 20, de acuerdo con el proceso de la patente coreana No. 321304, se pierde una gran cantidad de teicoplanina en una etapa de adsorción, y la pureza de la teicoplanina eluida por medio de un gradiente de concentración de metanol es muy baja. Además, es necesario remover el metanol con el propósito de aplicar la solución a una resina inmovilizada de lecitina. Además, no es deseable la aplicación en una producción a gran escala debido al costo de las resinas inmovilizadas de lecitina.

De acuerdo con la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 2003-0017067, después de que se adsorbe la teicoplanina de un caldo de cultivo en una resina porosa de adsorción, se lava la resina porosa de adsorción con ácido clorhídrico diluido y se desorbe la teicoplanina de la resina de adsorción utilizando una solución mezclada de agua y acetona. Se concentra la solución que eluye que contiene teicoplanina por medio de destilación al vacío, se la trata con un carbón activado, y se la somete a un proceso de precipitación, y así se purifica la teicoplanina. Sin embargo, la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 2003-0017067 no es conveniente ya que disminuyen la estabilidad y la actividad de la teicoplanina debido a que se cambia continuamente el pH de un líquido en proceso a ácido o a básico. Otras desventajas son que se acortan el tiempo de vida y el ciclo de intercambio de la resina y el rendimiento y la pureza de la recuperación de teicoplanina son pobres debido a que se adsorben irreversiblemente fracciones dentro de la resina. Mientras tanto, la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 2003-0034949 describe un método para producir teicoplanina, que incluye la purificación preliminar de teicoplanina a partir de un caldo de cultivo a través de un proceso en dos etapas que utiliza resinas porosas de adsorción, y la precipitación de teicoplanina a bajas temperaturas y pH ligeramente ácido. Sin embargo, este método tiene desventajas ya que el uso de una gran cantidad de solvente orgánico, tal como n-propanol, isopropanol, y metanol, puede ocasionar contaminación, y esa precipitación a baja temperatura y pH ligeramente ácido reduce la solubilidad y la actividad de la teicoplanina.

Además, es difícil la purificación de teicoplanina del 95% o superior a través únicamente de un proceso de purificación utilizando resinas porosas de adsorción. Por lo tanto, se han llevado a cabo muchos estudios con resinas de fase inversa para separar y purificar teicoplanina del caldo de cultivo. Por ejemplo, se puede hacer referencia a un proceso sugerido por Riva y colaboradores (Chromatographia Vol. 24; 295-301, 1987), y por la patente coreana No. 40453, y la publicación de las patentes coreanas abiertas a inspección pública Nos. 2003-0092504 y 10-2004-0008745. Riva y colaboradores propusieron un proceso para la purificación de teicoplanina utilizando una columna Lichrosorb RP-18. La patente coreana No. 40453 describe un proceso para la separación de cada componente individual del complejo A2 de teicoplanina utilizando una columna silanizada de gel de sílice. En este momento, en el caso de utilizar la resina de fase inversa, es posible producir teicoplanina más pura que en el caso de un proceso de separación que utiliza una combinación de una extracción, una resina de intercambio iónico, y una resina porosa de adsorción. Sin embargo, la patente coreana No. 40453 es problemática por la eficiencia económica ya que la resina en fase inversa y el sistema de cromatografía de alta presión son ambos costosos. Particularmente, se utiliza acetonitrilo, tóxico para el sistema nervioso humano, en la elución de teicoplanina de la resina en fase inversa en la patente coreana No. 40453. Además, la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 2003-0092504 proporciona un método para purificar teicoplanina, en el cual el caldo de cultivo libre de micelio pasa directamente a través de una resina de fase inversa, tal como gel de YMC ODS-A, o en el cual un líquido purificado en forma tosca, pretratado con una resina de intercambio catiónico, una resina de intercambio aniónico, o una resina de adsorción, pasa a través de un gel de YMC ODS-A. Sin embargo, este método no es conveniente ya que se utiliza acetonitrilo para la elución, y por lo tanto, se debe controlar la cantidad residual de acetonitrilo. Otra desventaja es que los costos de producción se incrementan inevitablemente debido a que la resina de fase inversa es frecuentemente reemplazada con una nueva. Igualmente, la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 10-2004-0008745 describe un proceso para purificación de teicoplanina a partir de un caldo de cultivo de un microorganismo capaz de producir teicoplanina, que incluye una etapa primaria de purificación que utiliza un adsorbente sintético, una purificación secundaria que utiliza una resina de intercambio catiónico, una resina catalítica, o una resina de quelato, una etapa de purificación terciaria que utiliza una resina de fase inversa, y una etapa final de liofilización. Sin embargo, la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 10-2004-0008745 es desventajosa pues a pesar de que se produce teicoplanina de alta pureza, el proceso es muy complicado pues incluye una cantidad de etapas, y el rendimiento de teicoplanina es muy bajo. Además, la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 10-2004-0008745 tiene

las mismas desventajas, relacionadas con el uso de la resina en fase inversa, que la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 2003-0092504. La EP 241758 describe un método para la purificación de teicoplanina que utiliza resina de adsorción e incluye adsorción sobre carbón activado en la etapa de aislamiento y ultrafiltración.

5 Descripción de la invención

Problema técnico

En consecuencia, las tecnologías convencionales para la purificación de teicoplanina a partir del caldo de cultivo son problemáticas porque no se produce una teicoplanina altamente purificada que no contenga impurezas y fracciones coloreadas, no se mantiene la estabilidad de la teicoplanina, se utilizan solventes orgánicos tóxicos para los humanos durante la purificación, el rendimiento es relativamente bajo y los costos de producción son relativamente altos. Por lo tanto, subsiste la necesidad de desarrollar una tecnología mejorada para purificar teicoplanina.

15 Solución técnica

Por lo tanto, la presente invención ha tenido en cuenta las anteriores desventajas que se presentan en el estado del arte, y un objetivo de la presente invención es el de proporcionar un método para producir en forma económica y segura teicoplanina de alta pureza. En este momento se lleva a cabo la producción de teicoplanina en un pH neutro, estable.

Se puede lograr el objetivo anterior a través de un método para producir teicoplanina de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención. Con el término “caldo de cultivo” como se lo utiliza en lo sucesivo se quiere indicar el caldo de cultivo filtrado elaborado a partir del micelio. El método incluye (a) la elución de un caldo de cultivo de una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* capaz de producir la teicoplanina, adsorbida en una resina porosa de adsorción, la producción a partir de la resina porosa de adsorción de un líquido purificado en forma tosca que contiene teicoplanina, y (b) el tratamiento del líquido purificado en forma tosca utilizando un carbón activado para recuperar la teicoplanina altamente pura.

En este momento, el método también incluye ultrafiltración del líquido tratado con el carbón activado después de la etapa (b).

El objetivo anterior se puede lograr a través de un método para producir teicoplanina de acuerdo a un segundo aspecto de la presente invención. El método incluye (a) la elución de un caldo de cultivo de una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* capaz de producir la teicoplanina, adsorbida en una resina porosa de adsorción, la producción a partir de la resina porosa de adsorción de un líquido purificado en forma tosca que contiene teicoplanina, y (b) ultrafiltración del líquido purificado en forma tosca para recuperar la teicoplanina altamente pura.

En este sentido, el método también incluye el tratamiento del filtrado fruto de la ultrafiltración utilizando un carbón activado después de la etapa (b).

El objetivo anterior se puede lograr a través de un método para producir teicoplanina de acuerdo a un tercer aspecto de la presente invención. El método incluye (a) ultrafiltración de un caldo de cultivo de una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* capaz de producir la teicoplanina, (b) la elución del filtrado fruto de la ultrafiltración, adsorbido en una resina porosa de adsorción, para producir a partir de la resina porosa de adsorción un líquido purificado en forma tosca que contiene teicoplanina, y (c) el tratamiento del líquido purificado en forma tosca utilizando un carbón activado para recuperar la teicoplanina altamente pura.

En este sentido, el método también incluye ultrafiltración del líquido tratado con el carbón activado después de la etapa (c).

El objetivo anterior se puede lograr a través de un método para producir teicoplanina de acuerdo a un cuarto aspecto de la presente invención. El método incluye (a) ultrafiltración de un caldo de cultivo de una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* capaz de producir la teicoplanina, (b) la elución del filtrado fruto de la ultrafiltración, adsorbido en una resina porosa de adsorción, para producir a partir de la resina porosa de adsorción un líquido purificado en forma tosca que contiene teicoplanina, y (c) ultrafiltración del líquido purificado en forma tosca para recuperar la teicoplanina altamente pura.

En este sentido, el método también incluye el tratamiento del filtrado producto de la ultrafiltración utilizando un carbón activado después de la etapa (c).

Adicionalmente, la cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* incluye a la cepa DKB 53 de *Actinoplanes teichomyceticus*.

Además, un agente de elución para eluir teicoplanina a partir de la resina porosa de adsorción incluye de 40 a 90% (v/v) de alcohol C1 a C4 miscible en agua con pH de 6,0 a 8,0, o de 40 a 90% (v/v) de cetona C3 a C6 miscible en agua con pH de 6,0 a 8,0.

ES 2 331 255 T3

Alternativamente, un agente de elución para eluir teicoplanina a partir de la resina porosa de adsorción puede incluir una sal neutra.

Además, una sal neutra incluye una sal sódica o una sal de potasio de 0,05 a 0,5 M.

Igualmente, la resina porosa de adsorción tiene un radio de poro de 20 a 300 Å, y es al menos una seleccionada del grupo que consiste de DOWEX OPTIPORE L493, DOWEX OPTIPORE L323, DOWEX OPTIPORE SD-2, DIAION HP20, DIAION HP2MG, DIAION HP20SS, SEPABEADS SP825, SEPABEADS SP 850, SEPABEADS SP 700, SEPABEADS SP207, SEPABEADS SP20SS, AMBERLITE XAD4, AMBERLITE XAD7, AMBERLITE XAD16, y AMBERLITE XAD1600T.

Se añade el carbón activado dentro del líquido purificado en forma tosca en una proporción de 0,2 a 5 veces más en peso que de teicoplanina entre 10 y 40°C en el lapso de 12 horas.

Además, se añade el carbón activado dentro del líquido purificado en forma tosca en una proporción de 0,5 a 3 veces más peso que de teicoplanina entre 18 y 36°C en el lapso de 0,5 a 3 horas.

Además, el tratamiento del líquido purificado en forma tosca utilizando el carbón activado incluye añadir directamente el carbón activado en un líquido de proceso con un pH de 6 a 8 pasando a través de la resina porosa de adsorción, o añadiendo el carbón activado en el líquido de proceso diluido con agua.

Adicionalmente, el carbón activado es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de AQUA NUCHAR, NUCHAR SA, NUCHAR SA-20, NUCHAR SA-30, NUCHAR SN, NUCHAR SN-20, NORIT A SUPRA EUR, NORIT B SUPRA EUR, NORIT C EXTRA USP, NORIT CN 1, NORIT CN 3, DARCO G 60, DARCO KB, DARCO KB-B, NORIT E SUPRA USA, NORIT GBG, NORIT PN2, NORIT ROX 0.8, NORIT SX 1, NORIT SX 1G, NORIT SX 2, NORIT SX PLUS, NORIT SX SUPRA E 153, NORIT SX ULTRA, CAL 12X40, y GW 12X40.

Se remueve el carbón activado por medio de filtración. Igualmente, se purifica adicionalmente el líquido purificado en forma tosca por medio del método de adsorber el líquido filtrado dentro de la resina porosa de adsorción, lavando la resina porosa de adsorción usando agua, y eluyendo la teicoplanina utilizando de 40 a 90% (v/v) de solvente orgánico C1 a C4 miscible en agua.

Además, la resina porosa de adsorción que es removida y que es utilizada después del carbón activado, tiene un radio de poro de 20 a 300 Å y es al menos una seleccionada del grupo que consiste de DOWEX OPTIPORE L493, DOWEX OPTIPORE L323, DOWEX OPTIPORE SD-2, DIAION HP20, DIAION HP2MG, DIAION HP20SS, SEPABEADS SP825, SEPABEADS SP 850, SEPABEADS SP 700, SEPABEADS SP207, SEPABEADS SP20SS, AMBERLITE XAD4, AMBERLITE XAD7, AMBERLITE XAD16, y AMBERLITE XAD1600T.

Una membrana, utilizada en la ultrafiltración del caldo de cultivo o del líquido purificado en forma tosca, tiene un corte de peso molecular de 3000 a 100000 Da.

Además, se lleva a cabo la ultrafiltración a una temperatura de 8 a 30°C, una presión de entrada de 0 a 4 bares y una presión de retentado de 0 a 3,5 bares.

Alternativamente, se puede llevar a cabo la ultrafiltración a una temperatura de 12 a 18°C, una presión de entrada de 0 a 4 bares y una presión de retentado de 0 a 3,5 bares.

Igualmente, se elabora la membrana de ultrafiltración de poliéter sulfona o celulosa regenerada, y es al menos una seleccionada del grupo que consiste de Biomax, Ultracel, PT y PL de módulo Prostack, Helicon, Sartocoon, Ultrasart, OMEGA, ALPHA, REGEN, SUPOR, Filmtec, y Kwick.

Efectos ventajosos

Como se describió anteriormente, la presente invención es ventajosa ya que se lleva a cabo la producción de teicoplanina dentro de una región de pH neutro, asegurando así la alta estabilidad y mejorando la pureza de la teicoplanina. Otras ventajas son que impurezas, tales como componentes coloreados son claramente removidos, y es posible su aplicación en una producción a gran escala de teicoplanina.

La presente invención ha sido descrita de una manera ilustrativa, y se debe entender que la terminología utilizada corresponde a la naturaleza de la descripción en vez de ser una limitante. Son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, se entiende que permaneciendo dentro del alcance de las reivindicaciones anexas, se puede practicar la invención de otra manera diferente a la específicamente descrita aquí.

Breve descripción de los dibujos

El anterior y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos acompañantes, en los cuales:

La Fig. 1 ilustra resultados relacionados con un análisis de teicoplanina por HPLC.

Mejor Forma de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, se ofrecerá una descripción detallada de la presente invención.

En la presente invención, se puede utilizar cualquier cepa como microorganismo para producir teicoplanina altamente pura siempre y cuando la cepa sea capaz de producir teicoplanina. Con respecto a esto, los ejemplos de microorganismos incluyen *Actinoplanes teichomyceticus*, tales como la cepa DKB53 de *Actinoplanes teichomyceticus* (KCTC 10587BP) y el *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121 sugerido por la patente estadounidense No. 4.239.751. Preferiblemente, se utiliza la cepa DKB53 de *Actinoplanes teichomyceticus* (KCTC 10587BP) para producir teicoplanina. Adicionalmente, se puede cultivar opcionalmente el microorganismo bajo las siguientes condiciones.

En otras palabras, una fuente de carbono utilizada en un medio de cultivo para fermentación es ejemplificada por glucosa, maltosa, sacarosa, y galactosa. En consideración a los costos de las materias primas, es preferible utilizar almidón en el medio para cultivo de semillas y se utiliza maltosa en un medio de cultivo, para el cultivo de producción.

En caso de utilizar maltosa como fuente de carbono, se prefiere que el medio de cultivo para la producción de teicoplanina incluya de 40 a 100 g/l de maltosa, de 3 a 5 g/l de extracto de levadura, de 5 a 10 g/l de harina de soja, de 5 a 10 g/l de harina de semilla de algodón, de 3 a 5 g/l de licor de macerado de maíz (CSL), de 0,1 a 5 g/l de cloruro de sodio, y de 0,1 a 10 mg/l de elementos metálicos en trazas.

Cuando se cultiva la cepa DKB53 de *Actinoplanes teichomyceticus*, se prefiere un rango óptimo de pH de $6,8 \pm 0,2$. En este momento, se prefiere que la temperatura del cultivo sea de 28 a 34°C.

Las condiciones óptimas de cultivo de la cepa DKB53 de *Actinoplanes teichomyceticus* para producir teicoplanina con alto rendimiento son las siguientes.

En una etapa temprana de la fermentación, es preferible realizar el cultivo con una velocidad de flujo de aire de 1,0 a 1,5 vvm, se mantiene la presión en un dispositivo de fermentación entre 0,2 y 0,3 bares, la temperatura de fermentación es de 28 a 34°C, y se lleva a cabo la fermentación con una velocidad de agitación de 140 a 200 rpm.

En una etapa intermedia de la fermentación, es preferible incrementar gradualmente la velocidad de agitación hasta un rango de 200 a 400 rpm en el lapso de 48 a 90 horas ya que se inicia la fermentación. La razón para esto es que es preferible un incremento gradual de la velocidad de agitación en vista de la tasa de utilización del oxígeno (OUR). Más preferiblemente, después de incrementar gradualmente la velocidad de agitación, se controla la velocidad de flujo de aire entre 0,4 y 0,8 vvm mientras se mantiene la presión en el dispositivo de fermentación entre 0,1 y 0,2 bares, lo que conduce a un control apropiado de la presión parcial de oxígeno.

De acuerdo con la presente invención, un método para producir teicoplanina incluye una etapa de purificación preliminar utilizando una resina porosa de adsorción bajo una condición selectiva de elución y una etapa de recuperación de teicoplanina altamente pura utilizando un carbón activado y/o ultrafiltración. En este sentido, el método puede incluir además una etapa de ultrafiltración como etapa previa de tratamiento antes de que el caldo de cultivo sea adsorbido en la resina porosa de adsorción con el fin de incrementar la pureza de la teicoplanina.

Después de la fermentación, se controla el pH del caldo de cultivo, en el cual se cultiva el microorganismo capaz de producir teicoplanina, y a partir del cual se remueve el micelio, hasta una región neutra de 6 a 8. En este sentido, se pueden utilizar hidróxido de sodio o ácido clorhídrico para controlar el pH del caldo de cultivo hasta la región neutra. Después de controlar el pH del caldo de cultivo clarificado como se describió anteriormente, no es necesario llevar a cabo un proceso adicional para controlar el pH. Más preferiblemente, el pH del caldo de cultivo clarificado como material de partida en la etapa de purificación preliminar que utiliza la resina porosa de adsorción es de 6,5 a 7,5. En este punto, se debe entender que el término "resina porosa de adsorción" como se lo utiliza aquí pretende incluir un adsorbente sintético con un radio de poro de 20 a 300 Å, que incluye un polímero que tiene grupos no iónicos de intercambio, tales como un polímero de estireno y divinil benceno, un polímero alifático o aromático entrecruzado y un adsorbente metacrílico. En forma detallada, los ejemplos de la resina porosa de adsorción incluyen DOWEX OPTIPORE L493, DOWEX OPTIPORE L323, y DOWEX OPTIPORE SD-2, fabricada por Dow Chemical Co., DIAION HP20, DIAION HP2MG, DIAION HP20SS, SEPABEADS SP825, SEPABEADS SP850, SEPABEADS SP700, SEPABEADS SP207, y SEPABEADS SP20SS, fabricada por Mitsubishi Chemical Co., y AMBERLITE XAD4, AMBERLITE XAD7, AMBERLITE XAD16, y AMBERLITE XAD1600T, fabricada por Rohm & Haas Co.

Después de empacar la resina porosa de adsorción en una columna, se aplica el caldo de cultivo sobre la columna, o se añade la resina porosa de adsorción dentro del caldo de cultivo en un recipiente y se agita la mezcla para adsorber

ES 2 331 255 T3

teicoplanina dentro de la resina porosa de adsorción. En este sentido, se puede añadir alcohol C1 a C4 miscible con agua al caldo neutro de cultivo preferiblemente en una cantidad menor al 40% (v/v), y más preferiblemente, en una cantidad del 5 al 20% (v/v) para evitar la adsorción de impurezas dentro de la resina porosa de adsorción y para evitar la desnaturalización de la teicoplanina debido a una enzima contenida en el caldo de cultivo. Se lava la resina porosa de adsorción, incluida la teicoplanina adsorbida allí dentro, con un líquido mezclado de 10 a 40% (v/v) de alcoholes C1 a C4 o cetonas C3 a C6 y agua para remover la mayor parte de las impurezas o componentes coloreados de allí.

Se puede eluir selectivamente la teicoplanina de la resina porosa de adsorción controlando la concentración de sal en el agente eluyente. El agente eluyente, utilizado para eluir la teicoplanina adsorbida en la resina porosa de adsorción, incluye una sal neutra de 0,05 a 0,5 M, y un líquido mezclado de alcohol C1 a C4 o cetona C3 a C6, y agua. La sal neutra está ejemplificada por una sal de sodio, tal como cloruro de sodio y fosfato de sodio, y una sal de potasio, tal como cloruro de potasio. Preferiblemente, una concentración añadida de sal al agente eluyente es de 0,1 a 0,3 M. En el caso de utilizar el agente eluyente que contiene la sal, se produce teicoplanina con una pureza relativamente alta en comparación con el caso donde se utiliza el líquido mezclado de solvente orgánico miscible en agua y agua, que no contiene sal, como agente eluyente. Además, ya que se mantiene neutro el pH de un líquido de proceso añadido a la resina porosa de adsorción, se evita una epimerización de teicoplanina, que se presenta cuando el líquido del proceso es básico, y la reducción de la actividad de la teicoplanina, que se presenta cuando el líquido del proceso es ácido.

La teicoplanina purificada en forma preliminar que pasa a través de la resina porosa de adsorción puede ser altamente purificada de acuerdo con un proceso de tratamiento con carbón activado, un proceso de ultrafiltración, o un proceso combinado de tratamiento con carbón activado y procesos de ultrafiltración.

Se ha utilizado carbón activado para remover diferentes impurezas, tales como componentes colorados y sustancias con olores ofensivos, durante la producción de compuestos químicos, productos alimenticios y compuestos farmacéuticos durante un largo período de tiempo. Los ejemplos de carbón comercial activado utilizado en la presente invención incluyen AQUA NUCHAR, NUCHAR SA, NUCHAR SA-20, NUCHAR SA-30, NUCHAR SN, y NUCHAR SN-20, fabricado por MeadWestvaco Co., NORIT A SUPRA EUR, NORIT B SUPRA EUR, NORIT C EXTRA USP, NORIT CN 1, NORIT CN 3, DARCO G 60, DARCO KB, DARCO KB-B, NORIT E SUPRA USA, NORIT GBG, NORIT PN 2, NORIT ROX 0.8, NORIT SX 1, NORIT SX 1G, NORIT SX 2, NORIT SX PLUS, NORIT SX SUPRA E 153, y NORIT SX ULTRA, fabricado por NORIT Nederland B.V., y CAL 12X40 y GW 12X40, fabricado por Calgon Carbon Co.. Adicionalmente, se puede añadir carbón activado directamente al líquido purificado en forma tosca pasándolo a través de la resina porosa de adsorción o añadiéndolo después de la dilución con agua. En otras palabras, el método de la presente invención es ventajoso porque se puede añadir directamente el carbón activado al líquido purificado en forma tosca que pasa a través de la resina porosa de adsorción, o se lo puede añadir al líquido purificado en forma tosca después de reducir la concentración del solvente orgánico miscible en agua o de la sal por medio de la adición de agua, y por lo tanto, se pueden obviar la remoción del solvente orgánico, de la sal y los procesos de concentración.

Después de medir el contenido de teicoplanina en el líquido de proceso que pasa a través de la resina porosa de adsorción utilizando HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) de acuerdo a un método como el descrito en la Farmacopea Japonesa, se añade preferiblemente el carbón activado al líquido del proceso en una cantidad 0,2 a 5 veces mayor que la teicoplanina medida. Más preferiblemente, se añade el carbón activado al líquido del proceso en una cantidad 0,5 a 3 veces mayor que la teicoplanina medida. Después de añadir el carbón activado al líquido del proceso, se revisa si el pH del líquido del proceso está entre 6 y 8, o no. Se agita luego el líquido del proceso entre 10 y 40°C en el lapso de 12 horas. Más preferiblemente, se trata el líquido del proceso con el carbón activado entre 18 y 36°C durante 0,5 a 3 horas, evitando así que la teicoplanina sea irreversiblemente adsorbida en el carbón activado y promoviendo la adsorción de las impurezas, tales como componentes coloreados, en el carbón activado.

Después de tratar el líquido del proceso con el carbón activado, se filtra el líquido del proceso utilizando un filtro KS 80 (fabricado por Pall Co.) o papel filtro número 4 de Whatman (fabricado por Whatman International Ltd.) para remover el carbón activado del líquido del proceso, y luego se lo pasa a través de la columna, en la cual está empacada la resina porosa de adsorción, o es adsorbida dentro de la resina porosa de adsorción en un recipiente. Posteriormente, se lava la resina porosa de adsorción con agua, y se eluye la teicoplanina de la resina porosa de adsorción utilizando el agente de elución en el cual se mezcla cualquiera de los alcoholes C1 a C4 miscibles en agua con agua en una cantidad de 40 a 90% (v/v). Con respecto a esto, se selecciona la resina porosa de adsorción del grupo que consiste de DOWEX OPTIPORE L493, DOWEX OPTIPORE L323, DOWEX OPTIPORE SD-2, DIAION HP20, DIAION HP2MG, DIAION HP20SS, SEPABEADS SP825, SEPABEADS SP850, SEPABEADS SP700, SEPABEADS SP207, SEPABEADS SP20SS, AMBERLITE XAD4, AMBERLITE XAD7, AMBERLITE XAD16, y AMBERLITE XAD1600T.

Se aplica el proceso de ultrafiltración para separar unas de otras las sustancias con diferentes pesos moleculares de acuerdo a un corte de peso molecular de una membrana de filtración. Los procesos de ultrafiltración de tipo continuo o por lotes se llevan a cabo de acuerdo a las estructuras de la membrana de filtración y un dispositivo de filtración. En la presente invención, el término "ultrafiltración" significa preferiblemente un tipo de ultrafiltración de flujo cruzado continuo. De acuerdo con la presente invención, las impurezas en el líquido del proceso que contiene teicoplanina purificada, utilizando la resina porosa de adsorción y carbón activado, consisten principalmente de macromoléculas tales como lípidos, proteína y polisacáridos, o los componentes coloreados combinados con las macromoléculas o

ES 2 331 255 T3

están incluidos en las macromoléculas. Por lo tanto, las impurezas tienen un peso molecular mayor que la teicoplanina. La razón de por qué las impurezas consisten principalmente de macromoléculas es que los productos metabólicos con bajos pesos moleculares y componentes que resultan del medio de cultivo, son removidos principalmente por la resina porosa de adsorción y el carbón activado. El proceso de ultrafiltración no se limita a un proceso para el tratamiento del líquido del proceso purificado utilizando la resina porosa de adsorción y el carbón activado. En otras palabras, se puede llevar a cabo el proceso de ultrafiltración como un proceso de tratamiento previo antes de tratar el líquido del proceso con la resina porosa de adsorción, y se puede tratar luego el líquido del proceso purificado a través del proceso de ultrafiltración con la resina porosa de adsorción y carbón activado, pudiendo producir así teicoplanina altamente pura. En caso de que el líquido del proceso purificado en forma tosca tratado con la resina porosa de adsorción sea sometido al proceso de ultrafiltración sin ser tratado con el carbón activado, la pureza de la teicoplanina es del 90% (p/v) o más.

La membrana de ultrafiltración útil en el proceso de ultrafiltración de la presente invención puede estar elaborada con políter sulfona o celulosa regenerada, y tiene un corte de peso molecular de 3.000 a 100.000 Da. Más preferiblemente, el corte de peso molecular de la membrana de ultrafiltración es de 5.000 a 50.000 Da. La membrana de ultrafiltración es al menos una seleccionada del grupo que consiste de membranas de ultrafiltración Biomax y Ul-tracel del módulo de Pellicon, membranas de ultrafiltración PT y PL del módulo de Prostat, PT, PL, y membranas de ultrafiltración Helicon del módulo de filtración de Spiral Wound Ultra, fabricadas por Millipore Co., membranas de ultrafiltración Sartocor®, y Ultrasart®, fabricadas por Sartorius AG, membranas de ultrafiltración OMEGATM, ALPHATM, REGENTM, SUPOR®, fabricadas por Pall Co., membranas de ultrafiltración FilmtecTM, fabricadas por Dow Chemical Co., y membranas de ultrafiltración KwickTM, fabricadas por Amersham Pharmacia Biotech Inc..

Después de añadir el agua en el líquido del proceso, de tratarlo con la resina porosa de adsorción, o de tratarlo con el carbón activado y la resina porosa de adsorción, para reducir el contenido de alcohol en el líquido del proceso hasta un 20% (v/v) o menos, se lleva a cabo el proceso de ultrafiltración entre 8 y 30°C, más preferiblemente entre 12 y 18°C, y con una presión de entrada (Pin) de 0 a 4 bares y una presión de retentado de (Pret) de 0 a 3,5 bares. Más preferiblemente, la presión de entrada es de 0 a 2,5 bares, y la presión de retentado es de 0 a 2 bares. En el caso de que se concentre el líquido del proceso hasta que el volumen del retentado sea de 1/10 o menor del volumen del líquido del proceso antes de someterlo al proceso de ultrafiltración, se puede utilizar un proceso de ultrafiltración, en el cual se alimenta continuamente el agua purificada en el retentado manteniendo un volumen constante. En ese momento, el volumen del agua purificada es 0,5 a 5 veces mayor que aquel del líquido del proceso antes de ser sometido al proceso de ultrafiltración, y más preferiblemente, el volumen del agua purificada es 1 a 2 veces mayor que aquel del líquido del proceso antes de ser sometido al proceso de ultrafiltración.

El líquido del proceso, del cual se remueven las impurezas poliméricas y los componentes coloreados por medio de la membrana de ultrafiltración, y que contiene teicoplanina, es concentrado utilizando un sistema de evaporación de película delgada, un sistema de ósmosis inversa, o un sistema de destilación al vacío. Después de añadir acetona al concentrado por medio de un volumen de 3 a 10 veces mayor que el del concentrado para precipitar teicoplanina durante una hora o más, se filtra el precipitado y luego se lo seca para producir teicoplanina en polvo.

Habiendo descrito generalmente esta invención, se puede obtener una mejor comprensión haciendo referencia a ejemplos y ejemplos comparativos que se suministran aquí para propósitos de ilustración únicamente y no pretenden constituirse en limitantes a menos que se especifique otra cosa.

45

Ejemplo 1

Se filtraron 160 L del caldo de cultivo de la cepa DKB 53 de *Actinoplanes teichomyceticus* utilizando un filtro de tambor para remover un micelio de allí, y se obtuvieron 120 L de filtrado. Se analizó el filtrado por medio de una columna de HPLC OPTIMAPAK® C18 (4,6 X 250 mm, RStech Co.). Se utilizó el 1er Estándar Internacional de Teicoplanina (National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, RU) como estándar de referencia para cuantificación. Con respecto a eso, un contenido y una cantidad total de teicoplanina en el filtrado fueron 4.2 g/L y 504 g, respectivamente. Adicionalmente, el pH del filtrado fue de 6,8. Se añadieron 4 L de metanol a 20 L de filtrado (84 g de teicoplanina), y se aplicó la mezcla resultante sobre una columna (15 X 50 cm) empacada con 4 L de DOWEX OPTIPORE SD-2 con una velocidad de flujo de 2 BV (volumen de lecho)/h sin controlar el pH de la mezcla resultante. Posteriormente, se cargaron 4 BV (16 L) de metanol al 30% (v/v) con una velocidad de flujo de 4 BV/h en la columna para lavar la resina empacada en la columna. Además, se cargaron 8 BV (32 L) de metanol al 60% (v/v), que contenía cloruro de sodio 0,15 M, en la columna con una velocidad de flujo de 4 BV/h para eluir la teicoplanina. Se confirmó por medio de un análisis de un eluato utilizando HPLC que un área de pico de teicoplanina A2 era el 84,8% del área total del pico, y se produjo una sustancia purificada en forma preliminar con una pureza relativamente alta. Además, una cantidad de teicoplanina fue de 72,2 g, lo que significa que la recuperación de teicoplanina fue del 85,9% (consulte la Tabla 1).

65

Ejemplo 2

Se añadieron 2 L de isopropanol a 20 L de caldo de cultivo filtrado (84 g de teicoplanina) de acuerdo al ejemplo

ES 2 331 255 T3

1, y se aplicó la mezcla resultante sobre una columna (15 X 50 cm) empacada con 4 L de DOWEX OPTIPORE SD-2 con una velocidad de flujo de 2 BV/h. Posteriormente, se cargaron 4 BV (16 L) de isopropanol al 15% (v/v) con una velocidad de flujo de 4 BV/h dentro de la columna para lavar la resina empacada en la columna. Además, se cargaron 8 BV (32 L) de isopropanol al 40% (v/v), que contenía cloruro de sodio 0,15 M, en la columna con una velocidad de flujo de 4 BV/h para eluir la teicoplanina. Se confirmó por medio de un análisis de un eluato utilizando HPLC que un área de pico de teicoplanina A2 era el 81,7% del área total del pico. Además, una cantidad de teicoplanina era de 73,6 g, lo que significa que la recuperación de teicoplanina fue del 87,6% (consulte la Tabla 1).

10 Ejemplo 3

Se añadieron 4 L de metanol a 20 L de caldo de cultivo filtrado de acuerdo al ejemplo 1, y se aplicó la mezcla resultante sobre una columna (15 X 50 cm) empacada con 4 L de Diaion HP 20 con una velocidad de flujo de 2 BV/h. Posteriormente, se cargaron 4 BV (16 L) de una solución al 30% (v/v) de metanol con una velocidad de flujo de 4 BV/h en la columna para lavar la resina empacada en la columna. Además, se cargaron 8 BV (32 L) de una solución de metanol al 60% (v/v), que contiene cloruro de sodio 0,15 M, en la columna con una velocidad de flujo de 4 BV/h para eluir teicoplanina. Fue confirmado por medio de un análisis de un eluato utilizando HPLC que un área de pico de teicoplanina A2 era el 83,4% de un área total de pico. Además, una cantidad de teicoplanina era de 70,7 g, lo que significa que la recuperación de teicoplanina fue del 84,2% (consulte la Tabla 1).

Ejemplo comparativo 1

Después de ajustar el pH del caldo de cultivo filtrado del ejemplo 1 en 11 utilizando NaOH 1 N, se aplicaron 20 L del filtrado sobre una columna (15 X 50 cm) empacada con 4 L de Diaion HP 20 con una velocidad de flujo de 2 BV/h de acuerdo con un proceso como el descrito en la patente coreana No. 321304. Posteriormente, se cargaron metanol al 30% (v/v), al 50% (v/v), y al 80% (v/v) con una velocidad de flujo de 2 BV/h dentro de la columna. En este momento, una cantidad de cada solución de metanol cargada en la columna fue de 4 BV (16 L). Se recolectaron todos los eluatos que pasaron a través de la columna por medio de metanol al 50% (v/v) y al 80% (v/v) que contenían teicoplanina. Con respecto a esto, se confirmó por medio de un análisis de eluatos mezclados utilizando HPLC que un área de pico de teicoplanina A2 era el 67,4% del área total del pico. Además, una cantidad de teicoplanina era de 53,74 g, lo cual significa que la recuperación de teicoplanina fue tan relativamente baja como 63,9% (consulte la Tabla 1). Los contenidos de teicoplanina en una porción de la solución que pasa a través de la columna sin ser adsorbida en Diaion HP 20 cuando se aplicó el filtrado con un pH de 11 a la columna, y en eluato de metanol al 30% (v/v) fueron del 11,8% y 21,7% del contenido de teicoplanina en el caldo de cultivo filtrado, respectivamente. Por lo tanto, se puede observar que se redujo el rendimiento de teicoplanina debido al pH básico del caldo de cultivo filtrado durante un proceso de adsorción utilizando la resina porosa de adsorción y un proceso de lavado de la resina porosa de adsorción.

40 Ejemplo comparativo 2

Se mezclaron 20 L del caldo de cultivo filtrado de acuerdo al ejemplo 1 con 4 L de metanol, y se aplicó la mezcla resultante sobre una columna (15 X 50 cm) empacada con 4 L de Diaion HP 20 con una velocidad de flujo de 1,2 BV/h. Posteriormente, se cargaron 4 BV (16 L) de agua destilada con una velocidad de flujo de 2 BV/h dentro de la columna, y se cargaron luego 5 BV de isopropanol al 20% (v/v) dentro de la columna para lavar la resina empacada en la columna de acuerdo con un proceso como el descrito en la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública No. 2003-0034949. Después de completar el lavado, se cargaron 4,5 BV de isopropanol al 40% (v/v) dentro de la columna para eluir teicoplanina de la columna. Se confirmó por medio de un análisis de un eluato utilizando HPLC que un área de pico de teicoplanina A2 era el 63,3% del área total del pico. Además, una cantidad de teicoplanina fue de 71,2 g, lo cual significa que la recuperación de teicoplanina fue del 84,8% (consulte la Tabla 1). A partir de la comparación de los ejemplos 1, 2, y 3 con el ejemplo comparativo 2, puede observarse que se produjo un líquido purificado en forma tosca que tenía un contenido relativamente alto de teicoplanina a partir de la resina porosa de adsorción en el caso de utilizar al eluyente que contiene una sal.

ES 2 331 255 T3

TABLA 1

Recuperación y purificación de teicoplanina de acuerdo con las condiciones de elución cuando se eluye teicoplanina a partir de la resina porosa de adsorción

	Resina porosa de adsorción	Agente de elución	Área del pico de HPLC de teicoplanina A2 (%)	Recuperación (%)
Ej. 1	DOWEX OPTIPORE SD- 2	60 % de metanol, NaCl 0,15 M	84,8	85,9
Ej. 2	DOWEX OPTIPORE SD-2	40% de isopropanol NaCl 0,15 M	81,7	87,6
Ej. 3	Diaion HP 20	60% metanol, NaCl 0,15 M	83,4	84,2
Ej. Co. 1	Diaion HP 20	50 a 80% de metanol	67,4	63,9
Ej. Co. 2	Diaion HP 20	40% de isopropanol	63,3	84,8

Ejemplo 4

Se mezcló una porción de 32 L de líquido purificado en forma tosca, que contenía teicoplanina, es decir, 8 L de líquido purificado en forma tosca (18 g de teicoplanina), de acuerdo con el ejemplo 1 con 8 L de agua destilada en un recipiente con un volumen de 20 L. Se ajustó el pH de la mezcla en 7,0 utilizando NaOH 0,1 N. Posteriormente, se añadieron 18 g de Darco KB-B como carbón activado a la mezcla, y se agitó la mezcla resultante utilizando un agitador mecánico. En este momento, la cantidad de carbón activado fue la misma que aquella de teicoplanina en el líquido purificado en forma tosca. Adicionalmente, se agitó la mezcla resultante a 28°C durante 2 horas, y luego se filtró a través de un filtro KS 80 para remover el carbón activado de la mezcla resultante. Se aplicó el líquido filtrado sobre una columna (15 X 50 cm) empacada con 4 L de DOWEX OPTIPORE SD-2 con una velocidad de flujo de 2 BV/h. Posteriormente, se cargaron 4 BV (16 L) de agua destilada con una velocidad de flujo de 4 BV/h en la columna para lavar la resina empacada en la columna. Después de completar el lavado, se cargaron 2 BV (8 L) de metanol al 70% (v/v) en la columna para eluir la teicoplanina de la columna. Se confirmó por medio de un análisis de un eluato utilizando HPLC que la pureza de teicoplanina era del 94,7%, y una cantidad de teicoplanina fue del 13,1 g.

Se cargaron 20 L de agua destilada al eluato para diluirlo de modo que se redujo una concentración de metanol hasta el 20% (v/v) o menos. Se filtró el eluato diluido por medio de una membrana de ultrafiltración Biomax 2 con un corte de peso molecular de 50.000 Da y un área de filtración de 0,1 m² con una Pin de 1 bar y una Pret de 0,5 bares. Cuando el volumen del retentado era de 2 L o menor, se alimentó el agua destilada continuamente dentro del retentado con la misma velocidad de flujo de la ultrafiltración. De este modo, se mantuvo un volumen del retentado en 1,8 a 2 L durante el proceso de diafiltración. Un volumen total del filtrado, incluida la etapa de diafiltración, fue de 42 L. Se concentró el filtrado por medio de una membrana de filtración para osmosis inversa (Nanomax-50, Millipore Co.) con una Pin de 1,5 bares y una Pret de 0 bares, y el volumen de un concentrado fue de 500 D. Se continuó la concentración mientras se alimentaban 2 L de agua destilada al concentrado manteniendo el volumen y se recuperaron 420 L del concentrado. Con respecto a esto, se confirmó por medio de un análisis del concentrado utilizando HPLC que la cantidad de teicoplanina en el concentrado era de 11,8 g. Igualmente, se añadieron lentamente 3,36 L de acetona al concentrado mientras se agitaba el concentrado para precipitar teicoplanina durante 12 horas, y se filtró el concentrado resultante a través de papel filtro Whatman No. 4 para recuperar un precipitado. Se secó el precipitado en un secador al vacío a 40°C durante 6 horas para recuperar 10,2 g de teicoplanina en polvo.

Se disolvió la teicoplanina en polvo en el agua destilada en tal forma que una concentración de la teicoplanina en el agua destilada era de 50 mg/L, y se comparó una suspensión de teicoplanina con teicoplanina que contenía Targocid[®] (Aventis) en la misma concentración que la suspensión de teicoplanina para evaluar la remoción de los componentes coloreados. En forma detallada, se dispensaron la suspensión de teicoplanina y Targocid[®] en pozos de una placa de 96 pozos, y se midieron sus absorbancias con una longitud de onda de 405 nm utilizando un lector de Microplacas THERMOmax (Molecular Devices Corp.). En consecuencia, la teicoplanina en polvo de la presente invención tenía una absorbancia menor que Targocid[®]. Por lo tanto, se puede observar que se produjo teicoplanina con excelente decoloración de acuerdo con la presente invención (consultar la Tabla 2). Con referencia a la Fig. 1, se ilustran los resultados con relación al análisis de teicoplanina, producida de acuerdo al ejemplo 4, utilizando una columna OPTIMAPAK[®] C18. En este momento, la pureza de la teicoplanina era del 97.8% (p/p).

ES 2 331 255 T3

Ejemplo 5

Se mezcló una porción de 32 L de líquido purificado en forma tosca, que contenía teicoplanina, es decir, 8 L de líquido purificado en forma tosca (18,4 g de teicoplanina), de acuerdo con el ejemplo 2 con 8 L de agua destilada en un recipiente con un volumen de 20 L. Se ajustó el pH de la mezcla en 7,0 utilizando NaOH 0,1 N. Posteriormente, se añadieron 18,4 g de NUCHAR SN-20 como carbón activado a la mezcla. En este momento, la cantidad de carbón activado era la misma que aquella de la teicoplanina en el líquido purificado en forma tosca. Adicionalmente, se agitó la mezcla resultante utilizando un agitador mecánico a 28°C durante 2 horas, y luego se filtró a través de un filtro KS 80 para remover el carbón activado de la mezcla resultante. Se aplicó el líquido filtrado sobre una columna (15 X 50 cm) empacada con 4 L de un DOWEX OPTIPORE SD-2 con una velocidad de flujo de 2 BV/h. Posteriormente, se cargaron 4 BV (16 L) de agua destilada con una velocidad de flujo de 4 BV/h en la columna para lavar la resina empacada en la columna. Después de completar el lavado, se cargaron 2 BV (8 L) de isopropanol al 40% (v/v) en la columna para eluir la teicoplanina de la columna. Se confirmó por medio de un análisis de un eluato utilizando HPLC que la pureza de la teicoplanina era del 93,6%, y la cantidad de teicoplanina fue de 13,4 g.

Se añadieron 24 L de agua destilada al eluato para diluirlo de modo que se redujo la concentración de isopropanol hasta un 10% (v/v) o menos. Se filtró el eluato diluido a través de una membrana de ultrafiltración Sartocoon con un corte de peso molecular de 30.000 Da y un área de filtración de 0,1 m² con una Pin de 1 bar y una Pret de 0,5 bares. Cuando el volumen del retentado era de 2 L o menor, se alimentó continuamente el agua destilada dentro del retentado con la misma velocidad de flujo de la ultrafiltración. De este modo, se mantuvo el volumen del retentado entre 1,8 y 2 L durante la diafiltración. El volumen total del filtrado, incluida el agua destilada utilizada en la diafiltración, fue de 48 L. Se concentró el filtrado por medio de una membrana de filtración de ósmosis inversa (Nanomax-50, Millipore Co.) con una Pin de 1,5 bares y una Pet de 0 bares, y el volumen del concentrado fue de 480 L. Se continuó la concentración mientras que 2 L de agua destilada eran alimentados al concentrado para mantener el volumen y se recuperaron 460 L de concentrado. Con relación a esto, se confirmó por medio del análisis del concentrado utilizando HPLC que la cantidad de teicoplanina en el concentrado era de 11,9 g. Igualmente, se añadieron lentamente 3,68 L de acetona al concentrado mientras se lo agitaba para precipitar la teicoplanina durante 12 horas, y se filtró el concentrado resultante por medio de un papel filtro Whatman No. 4 para recuperar el precipitado. Se secó el precipitado en un secador al vacío a 40°C durante 6 horas para recuperar teicoplanina en polvo. Se analizó la teicoplanina en polvo utilizando HPLC, y la pureza y la cantidad de la teicoplanina en polvo eran del 97,1% (v/v) y 10,7 g, respectivamente. Como en el caso del ejemplo 4, se disolvió la teicoplanina en polvo en el agua destilada en tal forma que la concentración de la teicoplanina en el agua destilada era de 50 mg/L, y se midió la absorbancia de la suspensión de teicoplanina con una longitud de onda de 405 nm (consultar la Tabla 2).

TABLA 2

Absorbancia de la suspensión de teicoplanina

Muestra	Concentración	OD a 405 nm
Targocid®	50 mg/ml	0,061
Ejemplo 4	50 mg/ml	0,031
Ejemplo 5	50 mg/ml	0,037

Ejemplo 6

Se sometieron 20 L de caldo de cultivo filtrado de acuerdo con el ejemplo 1 a un proceso de ultrafiltración antes de que fuera adsorbido dentro de una resina porosa de adsorción. En forma detallada, se sometieron 20 L del caldo de cultivo filtrado de acuerdo al ejemplo 1 a una ultrafiltración por medio de una membrana de ultrafiltración Biomax 2 montada en un sistema ETU-11 para MF/UF (Millipore Co.), que tiene un corte de peso molecular de 50.000 Da y una área de filtración de 0,5 m², a una Pin de 2,0 bares y una Pret de 1,0 bar sin controlar el pH del caldo de cultivo. En este momento, cuando el volumen del retentado era de 2 L o menos, se alimentó agua destilada al retentado con la misma velocidad de flujo de la ultrafiltración. El volumen total del filtrado, incluida la diafiltración, era de 50 L. Se analizó el filtrado por medio de HPLC con el uso de una columna OPTIMAPAK® C18 (4,6 X 250 mm, RStcch Co.). Con respecto a esto, el contenido y la cantidad total de teicoplanina en el filtrado fueron de 1.58 g/L y 79 g, respectivamente. Por lo tanto, el rendimiento en la recuperación de teicoplanina fue del 94%. Se aplicó el filtrado sobre una columna (15 X 50 cm) empacada con 4 L de DOWEX OPTIPORE SD-2 con una velocidad de flujo de 2 BV (volumen de lecho)/h. Posteriormente, se cargaron 4 BV (16 L) de metanol al 30% (v/v) con una velocidad de flujo de 4 BV/h dentro de la columna para lavar la resina empacada en la columna. Además, se cargaron 8 BV (32 L) de metanol al 60% (v/v), que contenían cloruro de sodio 0,15 M, en la columna con una velocidad de flujo de 4 BV/h para eluir la teicoplanina. Se confirmó por medio del análisis de un eluato utilizando HPLC que el área de pico de la teicoplanina A2 era del 87,4% del área total del pico. Igualmente, la cantidad de teicoplanina era de 70 g, lo que significa que la recuperación de teicoplanina fue del 88,6%.

ES 2 331 255 T3

Se añadieron 17,5 g de Darco KB-B como carbón activado en una porción de 32 L de eluato pasando a través de la resina porosa de adsorción, es decir, 8 L de eluato (que contenían 17,5 g de teicoplanina), y se agitó la mezcla resultante utilizando un agitador mecánico a 28°C durante 2 horas. Se filtró la mezcla agitada por medio de un filtro KS 80 para remover el carbón activado de la mezcla. Se aplicó el líquido filtrado sobre una columna (5 X 30 cm) empacada con 0,4 L de DOWEX OPTIPORE SD-2 con una velocidad de flujo de 4 BV/h. Posteriormente, se cargaron 4 BV (1,6 L) de agua destilada con una velocidad de flujo de 4 BV/h dentro de la columna para lavar la resina empacada en la columna. Después de completar el lavado, se cargaron 2 BV (800 L) de metanol al 70% (v/v) en la columna para eluir la teicoplanina de la columna. Se concentró el metanol al 70% (v/v), que fue eluido de la resina y contenía teicoplanina, por medio de destilación al vacío hasta que su volumen fue de 200 L. Se añadieron lentamente 1,6 L de acetona al concentrado mientras se lo agitaba para precipitar la teicoplanina durante 8 horas, y se filtró la mezcla resultante por medio de papel filtro Whatman No. 4 para recuperar el precipitado. Se secó el precipitado en un secador al vacío a 40°C durante 6 horas para recuperar 10,9 g de teicoplanina en polvo. Se suspendió luego la teicoplanina en polvo en agua destilada de modo que la concentración de la teicoplanina era de 1 mg/L. Se confirmó por medio de un análisis utilizando HPLC que la pureza de la teicoplanina era del 95,8% (p/p).

15

Ejemplo 7

Se mezcló una porción de 32 L de líquido purificado en forma tosca, que contenía teicoplanina, y se la pasó a través de una resina porosa de adsorción, es decir, 8 L de líquido purificado en forma tosca (18 g de teicoplanina), de acuerdo con el ejemplo 1 con 16 L de agua destilada. La mezcla fue sometida a ultrafiltración con una membrana de ultrafiltración Biomax 2 montada en un sistema ETU-11 para MF/UF (Millipore Co.), que tiene un corte de peso molecular de 50.000 Da y un área de filtración de 0,5 m², a una Pin de 2,0 bares y una Pret de 1,0 bar. En este momento, cuando el volumen del retentado era de 2 L o menos, se alimentó agua destilada al retentado con la misma velocidad de flujo de la ultrafiltración. El volumen total del filtrado, incluida la diafiltración, era de 36 L. Se concentró el filtrado por medio de una membrana de ósmosis inversa (Nanomax-50, Millipore Co.) a una Pin de 1,5 bares y una Pret de 0 bares, y el volumen del concentrado fue de 500 L. Posteriormente, se continuó el proceso de concentración mientras se alimentaban 4 L de agua destilada al concentrado con la misma velocidad de flujo de la ósmosis inversa y se recuperaron 380 L de concentrado. Se añadieron lentamente 3 L de acetona al concentrado mientras se agitaba el concentrado para precipitar teicoplanina durante 12 horas, y se filtró la mezcla resultante a través de papel filtro Whatman No. 4 para recuperar un precipitado. Se secó el precipitado en un secador al vacío a 40°C durante 6 horas para recuperar 12,9 g de teicoplanina en polvo. Se disolvió luego la teicoplanina en polvo en agua destilada de tal manera que la concentración de teicoplanina fue de 1 mg/L. Se confirmó por medio de un análisis utilizando HPLC que la pureza de la teicoplanina era del 90,2% (p/p).

35

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

40

Documentos de patente citados en la descripción

- 45 • US 4239751 A [0004] [0004] [0005] [0006] [0040]
- KR 36780 [0005]
- KR 118034 [0005] [0005]
- 50 • KR 367890 [0005]
- EP 241758 A [0006] [0006] [0006] [0009]
- 55 • KR 321304 [0006] [0007] [0007] [0067]
- KR 20030017067 [0006] [0008] [0008]
- KR 20030034949 [0006] [0008] [0069]
- 60 • KR 184644 [0006] [0006]
- KR 40453 [0009] [0009] [0009] [0009]
- 65 • KR 20030092504 [0009] [0009] [0009]
- KR 1020040008745 [0009] [0009] [0009] [0009]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- *The Journal of Antibiotics*, 1978, vol. 31, 170-177 [0004]
- 5 • **Heydorn** y colaboradores, *J. of Biochem.*, 2000, vol. 275, 6201-6206 [0006]
- **Riva** y colaboradores, *Chromatographia*, 1987, vol. 24, 295-301 [0009].

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 331 255 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir teicoplanina, que comprende:

- 5 (a) ultrafiltración de un caldo de cultivo de una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* capaz de producir la teicoplanina;
- 10 (b) la elución con alcohol del filtrado fruto de la ultrafiltración, adsorbido en una resina porosa de adsorción, para producir a partir de la resina porosa de adsorción un líquido purificado en forma tosca, que contiene teicoplanina; en donde la resina porosa de adsorción, utilizada en la elución de la teicoplanina a partir de la resina porosa de adsorción, incluye de 40 a 90% (v/v) de alcohol C1 a C4 miscible en agua con pH de 6,0 a 8,0, o de 40 a 90% (v/v) de cetona C3 a C6 miscible en agua con pH de 6,0 a 8,0; y
- 15 (c) el tratamiento del líquido purificado en forma tosca utilizando un carbón activado para recuperar la teicoplanina altamente pura, en donde el tratamiento del líquido purificado en forma tosca utilizando el carbón activado incluye la adición directa del carbón activado dentro del líquido del proceso con un pH de 6 a 8 pasando a través de la resina porosa de adsorción, o añadiendo el carbón activado dentro del líquido del proceso diluido con agua.
- 20

2. El método como el expuesto en la reivindicación 1, que comprende además la ultrafiltración del líquido tratado con el carbón activado después de la etapa (c).

25 3. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* incluye a la cepa DKB 53 de *Actinoplanes teichomyceticus*.

4. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el agente de elución, utilizado en la elución de la teicoplanina a partir de la resina porosa de adsorción, incluye una sal neutra.

30 5. El método como el expuesto en la reivindicación 4, en donde una sal neutra incluye una sal sódica o una sal de potasio de 0,05 a 0,5 M.

35 6. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la resina porosa de adsorción tiene un radio de poro de 20 a 300 Å, y es al menos una seleccionada del grupo que consiste de DOWEX OPTIPORE L493, DOWEX OPTIPORE L323, DOWEX OPTIPORE SD-2, DIAION HP20, DIAION HP2MG, DIAION HP20SS, SEPABEADS SP825, SEPABEADS SP 850, SEPABEADS SP 700, SEPABEADS SP207, SEPABEADS SP20SS, AMBERLITE XAD4, AMBERLITE XAD7, AMBERLITE XAD16, y AMBERLITE XAD1600T.

40 7. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde se añade el carbón activado en el líquido purificado en forma tosca en una proporción de 0,2 a 5 veces más en peso que de teicoplanina para adsorber al líquido purificado en forma tosca entre 10 y 40°C en el lapso de 12 horas.

45 8. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde se añade el carbón activado en el líquido purificado en forma tosca en una proporción de 0,5 a 3 veces más en peso que de teicoplanina para adsorber al líquido purificado en forma tosca entre 18 y 36°C en el lapso de 0,5 a 3 horas.

50 9. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el carbón activado es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de AQUA NUCHAR, NUCHAR SA, NUCHAR SA-20, NUCHAR SA-30, NUCHAR SN, NUCHAR SN-20, NORIT A SUPRA EUR, NORIT B SUPRA EUR, NORIT C EXTRA USP, NORIT CN 1, NORIT CN 3, DARCO G 60, DARCO KB, DARCO KB-B, NORIT E SUPRA USA, NORIT GBG, NORIT PN2, NORIT ROX 0.8, NORIT SX 1, NORIT SX 1G, NORIT SX 2, NORIT SX PLUS, NORIT SX SUPRA E 153, NORIT SX ULTRA, CAL 12X40, y GW 12X40.

55 10. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el tratamiento del líquido purificado en forma tosca utilizando el carbón activado comprende la filtración del líquido purificado en forma tosca para remover el carbón activado del líquido purificado en forma tosca, la adsorción del líquido filtrado dentro de la resina porosa de adsorción, lavando la resina porosa de adsorción usando agua, y eluyendo la teicoplanina utilizando de 40 a 90% (v/v) de solvente orgánico C1 a C4 miscible en agua.

60

65 11. El método como el expuesto en la reivindicación 10, en donde la resina porosa de adsorción tiene un radio de poro de 20 a 300 Å, y es al menos una seleccionada del grupo que consiste de DOWEX OPTIPORE L493, DOWEX OPTIPORE L323, DOWEX OPTIPORE SD-2, DIAION HP20, DIAION HP2MG, DIAION HP20SS, SEPABEADS SP825, SEPABEADS SP 850, SEPABEADS SP 700, SEPABEADS SP207, SEPABEADS SP20SS, AMBERLITE XAD4, AMBERLITE XAD7, AMBERLITE XAD16, y AMBERLITE XAD1600T.

ES 2 331 255 T3

12. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la membrana de ultrafiltración, utilizada cuando se ultrafiltra el caldo de cultivo o el líquido purificado en forma tosca, tiene un corte de peso molecular de 3.000 a 100.000 Da.

5 13. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde se lleva a cabo la ultrafiltración a una temperatura de 8 a 30°C, una presión de entrada de 0 a 4 bares y una presión de retentado de 0 a 3,5 bares.

10 14. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde se lleva cabo la ultrafiltración a una temperatura de 12 a 18°C, una presión de entrada de 0 a 4 bares y una presión de retentado de 0 a 3,5 bares.

15 15. El método como el expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde se elabora la membrana de ultrafiltración de poliéter sulfona o celulosa regenerada, y es al menos una seleccionada del grupo que consiste de Biomax, Ultracel, PT y PL de módulo Prostack, Helicon, Sartocoon, Ultrasart, OMEGA, ALPHA, REGEN, SUPOR, Filmtec, y Kwick.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

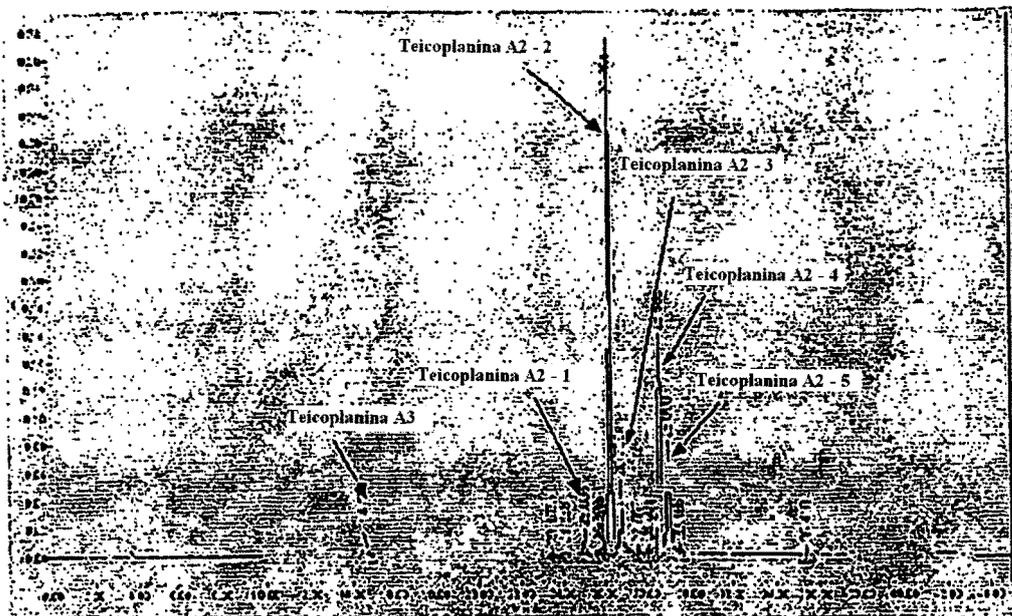


Fig.1