



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 378**

51 Int. Cl.:
C12P 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08161630 .2**

96 Fecha de presentación : **01.08.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2149609**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.02.2010**

54 Título: **Procedimiento mejorado para la producción de daptomicina.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

73 Titular/es: **OLON S.p.A.**
Strada Rivoltana, Km. 6/7
20090 Rodano, MI, IT

72 Inventor/es: **Bertetti, Gianluca;**
Malcangi, Antonella;
Muraca, Roberto;
Trione, Guido y
Rossi, Alessia

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 359 378 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

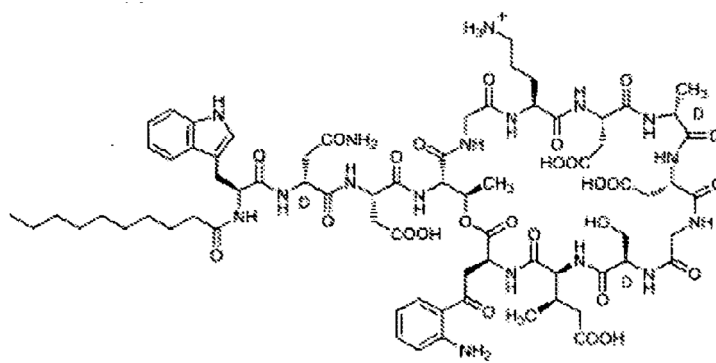
Procedimiento mejorado para la producción de daptomicina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la producción de daptomicina mediante fermentación con *Streptomyces roseosporus*, usando fuentes alternativas de la cadena lateral de n-decanoilo.

10 **Antecedentes de la invención**

A-21978C₁₀, conocido como daptomicina, es un antibiótico peptídico cíclico de 13 aminoácidos de fórmula (I)



(I)

15

que contiene una cadena lateral de n-decanoilo unida al triptófano N-terminal.

20

La daptomicina se produce mediante fermentación sumergida de *Streptomyces roseosporus*, en particular cepas NRRL 11379 (ATCC 31568) y NRRL 15998, así como cualquier mutante, variante y recombinante de las mismas.

La producción de daptomicina en cultivo sumergido se dio a conocer por primera vez en los documentos US 4.331.594 y US 4.800.157.

25

El documento US 4.885.243 da a conocer la preparación de daptomicina mediante fermentación discontinua alimentada, en la que se alimenta ácido decanoico, usado como fuente de la cadena lateral de n-decanoilo, como una disolución en un disolvente orgánico, concretamente oleato de metilo. La presencia del disolvente en la disolución de alimentación es necesaria, porque el ácido decanoico es un sólido ceroso a la temperatura de fermentación y sólo disoluciones que contienen al menos el 50% de disolvente son suficientemente fluidas para alimentarse. No obstante, incluso en presencia de un disolvente, a temperaturas inferiores a 25°C es difícil mantener una alimentación constante y homogénea, porque el ácido decanoico puede separarse de la disolución o formar copos y flóculos. El ácido decanoico ejerce un efecto tóxico sobre la bacteria y por este motivo la velocidad de alimentación debe mantenerse bajo control estricto.

30

35

Descripción de la invención

Se ha encontrado ahora que los inconvenientes mencionados anteriormente pueden superarse usando fuentes alternativas de la cadena lateral de n-decanoilo, concretamente decanal (n-decaldehído, caprinaldehído, aldehído cáprico) o aceite de *Cuphea*. Por consiguiente, en una primera realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de daptomicina mediante fermentación de *Streptomyces roseosporus* en presencia de n-decanal; en una segunda realización la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de daptomicina mediante fermentación de *Streptomyces roseosporus* en presencia de aceite de *Cuphea*. Cepas de *Streptomyces roseosporus* particularmente adecuadas para llevar a cabo el procedimiento son NRRL 11379 (ATCC 31568), NRRL 15998 y mutante B8.

40

45

En la primera realización, puede alimentarse n-decanal o bien como una disolución orgánica en un disolvente orgánico adecuado, tal como oleato de metilo, etanol, acetato de etilo, preferiblemente oleato de metilo, o bien sin disolventes, debido a que el n-decanal es líquido a temperatura ambiente y no se produce la separación de copos o formación de flóculos.

50

De hecho, *S. roseosporus* puede convertir enzimáticamente el aldehído en ácido, que entonces se une al N-triptófano terminal; se señala que esta conversión no se produce con fuentes de C10 diferentes, por ejemplo decanol. El uso de n-decanal permite aumentar la productividad del 10% al 30% con respecto al 50% de ácido

decanóico + el 50% de oleato de metilo, probablemente debido al hecho de que este aldehído es líquido, de modo que se dispersa en el caldo de fermentación y está más biodisponible. Además, n-decanal es menos tóxico que el ácido n-decanóico: de hecho, en el microscopio, los micelios aparecen menos fragmentados o vacuolizados y esta toxicidad reducida permite mantener una velocidad de producción satisfactoria durante un periodo más largo.

En la segunda realización, se usa aceite de *Cuphea*, o bien como tal o bien disuelto en un disolvente orgánico o mezclado con otro aceite vegetal. El aceite de *Cuphea* adecuado para llevar a cabo la invención puede derivarse de las semillas de varias especies de *Cuphea*, tales como *C. lanceolata*, *C. viscosissima* y *C. koehneana* o especies híbridas obtenidas de las mismas. Los disolventes orgánicos adecuados son, por ejemplo, oleato de metilo, etanol, acetato de etilo, preferiblemente oleato de metilo; aceites vegetales adecuados son, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de palma; sin embargo, ya que el aceite de *Cuphea* es fluido a temperatura ambiente, se alimenta preferiblemente como tal. El aceite de *Cuphea* contiene triglicéridos con ácidos grasos de diferentes longitudes que se hidrolizan por el microorganismo y se usan para la síntesis de daptomicina. Se encontró sorprendentemente que el aceite de *Cuphea* tiene una toxicidad tan baja sobre el microorganismo que se tolera su acumulación en la fermentación; por tanto, a diferencia de ácido decanóico/oleato de metilo, no es necesario el control estricto de la velocidad de alimentación y el procedimiento puede llevarse a cabo de manera discontinua, es decir introduciendo todo el sustrato en el comienzo de la fermentación; esto significa que no se requiere un tanque de alimentación, un dispositivo de alimentación y controles durante la adición.

En el procedimiento de la invención, también puede alimentarse una fuente de carbono necesaria para el metabolismo primario del microorganismo, como glicerol, junto con n-decanal o aceite de *Cuphea*, alcanzando así un mejor equilibrio entre el crecimiento del microorganismo y la producción de daptomicina.

A partir de lo anterior parece que el procedimiento de la invención es ventajoso a escala industrial, ya que es más conveniente de llevar a cabo y más barato, principalmente debido al hecho de que puede evitarse el uso de disolventes y que las fuentes de carbono tienen una toxicidad limitada sobre el microorganismo. El uso de n-decanal puro es particularmente ventajoso porque el microorganismo se alimenta con un 100% de fuente de C10.

La invención se ilustrará en mayor detalle por medio de los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 - Decanal + oleato de metilo

1A: NRRL11379 de *Streptomyces roseosporus* en un fermentador de 20 l

Se almacenó un cultivo madre de *Streptomyces roseosporus* bajo nitrógeno, entonces se usó para inocular una primera fase de fermentación vegetativa. Se incubó el medio sembrado, cuya composición se notifica en las tablas 1 y 2, en un matraz de fondo redondo de 2 l, que contenía 450 ml de caldo, a 30°C durante 40 h sobre un agitador giratorio con una velocidad de agitación de 150 rpm.

Tabla 1: Medio

| | |
|---------------------------------|--------|
| COMPONENTE | 1 l |
| Dextrosa | 20 g |
| Harina de soja | 20 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,22 g |
| CaCO ₃ | 2 g |
| Solución salina | 2 ml |
| Sin ajuste de pH | |
| Esterilización 121°C x 20 min. | |

Tabla 2: Solución salina

| | |
|--------------------------------------|--------|
| COMPONENTE | 100 ml |
| FeSO ₄ | 0,2 g |
| HCl (37%) | 2 ml |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 10 g |
| KCl | 10 g |
| Esterilización 121°C x 20 min. | |

Al final de la incubación, se usó la fase crecida para sembrar un fermentador de producción (capacidad de 20 l, volumen de trabajo de 15 l) que contenía un medio que tenía la siguiente composición (tabla 3).

Tabla 3: Medio de producción

| COMPONENTE | g/l |
|---|------|
| Harina de soja | 22 |
| Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,66 |
| pH ajustado a 7,0 | |
| KH ₂ PO ₄ (opcional) | 0,22 |
| Dextrosa | 8,25 |
| Dextrina de patata | 33 |
| Melazas | 2,75 |
| Voranol | 0,8 |
| Esterilización 121°C x 45 min. | |

5 Se llevó a cabo la incubación de la fase de producción en las siguientes condiciones: 30°C, 1 vvm, agitación de 150-350 rpm y contrapresión de 0,5 bar. Se mantuvo el pH a 6,5 mediante adición de una disolución de hidróxido de amonio.

10 Tras 18 h, cuando la concentración en glucosa del medio disminuyó por debajo de 3-4 g/l, se alimentó el fermentador con una disolución que contenía el 50% de decanal y el 50% de oleato de metilo (v/v) a una velocidad de flujo que oscilaba desde 3 hasta 7 ml/h.

La producción de daptomicina empezó tras 40 h y alcanzó una productividad de 0,6 g/l en 186 h.

15 1B: NRRL11379 de *Streptomyces roseosporus* en un fermentador de 1000 l

20 Se almacenó *Streptomyces roseosporus* bajo nitrógeno. Entonces se usó el cultivo madre para inocular la primera fase de fermentación vegetativa. Se incubó el medio sembrado previamente, cuya composición se notifica en la tabla 4, en un matraz de fondo redondo de dos (2 l), que contenía 450 ml de caldo, a 30°C durante 40 h en un agitador giratorio con una velocidad de agitación de 150 rpm.

Tabla 4: Medio sembrado previamente

| COMPONENTE | 1 l |
|---------------------------------|--------|
| Bactotripton | 17 g |
| Peptona | 3 g |
| NaCl | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2,5 g |
| Dextrosa | 2,75 g |
| Almidón de patata | 25 g |
| Sin ajuste de pH | |
| Esterilización 121°C x 20 min. | |

25 Al final de la incubación, se usó el inoculo para sembrar una segunda fase vegetativa en un fermentador de 100 l (volumen de trabajo de 60 l) que contenía un medio que tenía la siguiente composición (tabla 5).

Tabla 5: Medio sembrado

| COMPONENTE | 1 l |
|--------------------------------------|--------|
| Dextrosa | 22 g |
| Harina de soja | 20 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| CaCO ₃ | 2 g |
| Voranol | 0,5 g |
| FeSO ₄ •7H ₂ O | 4 mg |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 200 mg |
| KCl | 200 mg |
| Sin ajuste de pH | |
| Esterilización 121°C x 30 min. | |

30 Se llevó a cabo la incubación de la fase sembrada en las siguientes condiciones: 30°C, 0,8 vvm, agitación de 160 rpm y contrapresión de 0,8 bar y durante un tiempo que oscilaba desde 22 hasta 28 h.

Al final de la incubación, se usó la fase sembrada para el inóculo de la fase de producción en un fermentador de 1000 l (volumen de trabajo de 600 l) que contenía un medio que tenía la siguiente composición (tabla 6).

5 Tabla 6: Medio de producción

| | |
|---|-----|
| COMPONENTE | g/l |
| Harina de soja | 22 |
| Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ • 6H ₂ O | 0,7 |
| Voranol | 1 |
| pH ajustado a 7,0 | |
| Dextrosa | 9,1 |
| Dextrina de patata | 33 |
| Melazas | 2,8 |
| Esterilización 121°C x 45 min. | |

10 Se llevó a cabo la incubación de la fase de producción en las siguientes condiciones: 30°C, 0,5 vvm, agitación de 120-160 rpm y contrapresión de 0,7 bar.

Se mantuvo el pH a 6,5 mediante adición de una disolución de hidróxido de amonio.

15 Tras 24 h, cuando la concentración en glucosa del medio disminuyó por debajo de 3-4 g/l, se alimentó el fermentador con una disolución de alimentación que contenía el 50% de decanal y el 50% de oleato de metilo (v/v) a una velocidad de flujo que oscilaba desde 180 hasta 210 ml/h.

La producción de daptomicina empezó tras 40 h y alcanzó una productividad de 460 mcg/ml en 180 h (+15% frente a fermentación con ácido decanóico).

20 Prolongando la fermentación a partir de 180 h (pico de productividad en el procedimiento con ácido decanóico) hasta 230 h, se obtuvo una concentración de 545 mcg/ml (+36% frente a fermentación con ácido decanóico).

La observación microscópica del micelio no mostró ninguna fragmentación o vacuolización, que son los daños típicos provocados por el ácido decanóico.

25 1C: Mutante B8 de *Streptomyces roseosporus* en un fermentador de 1000 l

30 Se mantuvo un cultivo madre de mutante B8 de *Streptomyces roseosporus* bajo nitrógeno líquido y entonces se usó el cultivo madre para inocular la primera fase de fermentación vegetativa. Se incubó el medio sembrado previamente, cuya composición se notifica en la tabla 7, en dos matraces de fondo redondo (2 l), que contenían 450 ml de caldo; a 30°C durante 48 h sobre un agitador giratorio con una velocidad de agitación de 150 rpm.

Tabla 7: Medio

| | |
|--------------------------------------|--------|
| COMPONENTE | 1 l |
| Dextrosa | 20 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| Bactotripton | 17 g |
| Peptona | 3 g |
| FeSO ₄ •7H ₂ O | 4 mg |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 200 mg |
| KCl | 200 mg |
| CaCO ₃ | 2 g |
| Voranol | 1,1 g |
| Sin ajuste de pH | |
| Esterilización 121°C x 20 min. | |

35 Al final de la incubación, se usó el inóculo para sembrar una segunda fase vegetativa en un fermentador de 100 l (volumen de trabajo de 60 l) que contenía un medio que tenía la siguiente composición (tabla 8).

40 Tabla 8: Medio sembrado

| | |
|------------|-------|
| COMPONENTE | 1 l |
| Dextrosa | 2,5 g |

| | |
|---------------------------------|-------|
| Dextrina de patata | 25 g |
| Peptona de soja | 20 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2,5 g |
| NaCl | 5 g |
| Antiespumante | 1 g |
| Sin ajuste de pH | |
| Esterilización 120°C x 30 min. | |

Se llevó a cabo la incubación de la fase sembrada en las siguientes condiciones: 30°C, 0,8 vvm, agitación de 160 rpm y contrapresión de 0,8 bar y un tiempo que oscilaba desde 30 hasta 36 h.

5 Al final de la incubación, se usó la fase sembrada para el inóculo de la fase de producción en un fermentador de 1000 l (volumen de trabajo de 600 l) que contenía un medio que tenía la composición descrita en la tabla 6.

Se llevó a cabo la incubación de la fase de producción en las siguientes condiciones: 30°C, 0,5 vvm, agitación de 120÷160 rpm y contrapresión de 0,7 bar.

10

Se mantuvo el pH a 6,5 mediante adición de una disolución de hidróxido de amonio.

Tras 24 h, cuando la concentración en glucosa del medio disminuyó por debajo de 3-4 g/l, se alimentó el fermentador con una disolución que contenía el 50% de decanal y el 50% de oleato de metilo (v/v) con una velocidad de flujo que oscilaba desde 140 hasta 160 ml/h.

15

El uso del mutante B8 permitió obtener una productividad de 1,3 g/l en 180 h y alcanzar una potencia de 1,5 g/l en 230 h, con una velocidad de producción constante.

20 EJEMPLO 2 - Decanal + glicerol

Se llevó a cabo el inóculo tal como se describió en el ejemplo 1A.

25 Al final de la incubación, se usó el inóculo para sembrar un fermentador de producción con capacidad de 20 l (volumen de trabajo de 15 l), que contenía un medio que tenía la composición descrita en la tabla 3.

Se llevó a cabo la incubación de la fase de producción en las siguientes condiciones: 30°C, 1 vvm, agitación de 150÷350 rpm y contrapresión de 0,5 bar. Se mantuvo el pH a 6,5 mediante adición de una disolución de hidróxido de amonio. Tras 20 h, cuando la concentración en glucosa del medio disminuyó por debajo de 3-4 g/l, se alimentó el fermentador con el 100% de decanal a una velocidad de flujo que oscilaba desde 2 hasta 7 ml/h.

30

Se alimentó una segunda disolución de alimentación que contenía glicerol al mismo tiempo con una velocidad de flujo de 10 ml/h.

35 La producción de daptomicina empezó tras 40 h y alcanzó una productividad de 0,2 g/l en 160 h.

EJEMPLO 3 - Aceite de *Cuphea* + oleato de metilo

Se llevó a cabo el inóculo tal como se describió en el ejemplo 1A.

40

Al final de la incubación, se usó el inóculo para sembrar un fermentador de producción con capacidad de 20 l (volumen de trabajo de 15 l) que contenía un medio que tenía la composición descrita en la tabla 3. Se llevó a cabo la incubación de la fase de producción en las siguientes condiciones: 30°C, 1 vvm, agitación de 150÷350 rpm y contrapresión de 0,5 bar. Se mantuvo el pH a 6,5 mediante adición de una disolución de hidróxido de amonio. Tras 18 h, cuando la concentración en glucosa del medio estaba por debajo de 3-4 g/l, se alimentó el fermentador con una disolución de alimentación que contenía el 70% de aceite de *Cuphea* y el 30% de oleato de metilo a una velocidad de flujo de 3÷6 ml/h.

45

Se llevó a cabo la fermentación durante 210 h cuando se alcanzó una productividad de 0,6 g/l de daptomicina.

50

EJEMPLO 4 - aceite de *Cuphea* + glicerol

Se llevó a cabo el inóculo tal como se describió en el ejemplo 1A.

55 Al final de la incubación, se usó el inóculo para sembrar un fermentador productivo con capacidad de 20 l (volumen de trabajo de 15 l) que contenía un medio que tenía la composición descrita en la tabla 3. Se llevó a cabo la incubación de la fase de producción en las siguientes condiciones: 30°C, 1 vvm, agitación de 150÷350 rpm y

contrapresión de 0,5 bar. Se mantuvo el pH a 6,5 mediante adición de una disolución de hidróxido de amonio.

5 Tras 20 h, cuando la concentración en glucosa del medio estaba por debajo de 3-4 g/l, se alimentó el fermentador con el 100% de aceite de *Cuphea* a una velocidad de flujo de 2÷5 ml/h. Se alimentó una segunda fuente de carbono, glicerol, durante la fermentación.

Se siguió el procedimiento durante 210 h y se alcanzó una productividad de 0,6 g/l de daptomicina.

10 EJEMPLO 5 - Aceite de *Cuphea* de manera discontinua

Se llevó a cabo el inoculo tal como se describió en el ejemplo 1A.

15 Al final de la incubación, se usó el inoculo para sembrar un fermentador productivo con capacidad de 20 l (volumen de trabajo de 15 l) que contenía un medio que tenía la siguiente composición (tabla 9).

Tabla 9: Medio de producción

| COMPONENTE | g/l |
|---|------|
| Harina de soja | 22 |
| Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,66 |
| pH ajustado a 7,0 | |
| Aceite de <i>Cuphea</i> | 42 |
| Dextrosa | 8,25 |
| Dextrina de patata | 33 |
| Melazas | 2,75 |
| Voranol | 0,8 |
| Esterilización 121°C x 45 min. | |

20 En la fase de producción, se llevó a cabo la incubación en las siguientes condiciones: 30°C, 1 vvm, agitación de 150÷350 rpm y contrapresión de 0,5 bar. Se mantuvo el pH a 6,5 mediante adición de una disolución de hidróxido de amonio.

25 Se ajustó la temperatura de fermentación de manera a mantener una tasa de captación de oxígeno constante desde 20 h hasta el fin del procedimiento.

Los materiales de partida presentes en el medio discontinuo fueron suficientes para soportar el crecimiento de microorganismo y la producción de daptomicina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de daptomicina mediante fermentación de *Streptomyces roseosporus* en presencia de n-decanal o aceite de *Cuphea* como fuentes de la cadena lateral de n-decanoílo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fuente de la cadena lateral de n-decanoílo es n-decanal.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que se alimenta n-decanal como una disolución en un disolvente orgánico seleccionado de oleato de metilo, etanol y acetato de etilo.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el disolvente es oleato de metilo.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que se alimenta n-decanal sin disolventes.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fuente de la cadena lateral de n-decanoílo es aceite de *Cuphea*.
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que se alimenta aceite de *Cuphea* como una disolución en un disolvente orgánico seleccionado de oleato de metilo, etanol o se mezcla con aceite de soja, aceite de palma o aceite de girasol.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el disolvente orgánico es oleato de metilo.
- 25 9. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que se alimenta aceite de *Cuphea* sin disolventes.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 - 9 que se lleva a cabo como fermentación discontinua con aceite de *Cuphea* puro.