

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 518**

51 Int. Cl.:

C07D 407/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2006 E 06723096 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 1856111**

54 Título: **Purificación de mupirocina**

30 Prioridad:

21.02.2005 DK 200500261

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

15.04.2014

73 Titular/es:

**SYNGEN BIOTECH CO., LTD. (100.0%)
No. 154, Kai Yuan Road, Hsin-Ying
T'ai nan 730 , TW**

72 Inventor/es:

**BISSCHOPS, MARC, ANTONIUS, THEODORUS;
REIJNS, TIEM, GEERT, PIETER;
MATHIESEN, ANITA y
AASSVEEN, LENE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 455 518 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

Purificación de mupirocina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación del antibiótico mupirocina (ácido pseudomónico A).

10 **Antecedentes de la invención**

Se sabe que las cepas de *Pseudomonas fluorescens* son capaces de biosintetizar en pequeñas cantidades, además de ácido pseudomónico A, otros antibióticos relacionados designados por las letras B-D [E. B. Chain, G. Mellows, J. Chem. Soc. Perkin Trans I. 318 (1977); J. P. Clayton *et al.*, Tetrahedron Lett., 21, 881 (1980); P. J. O. Hanlon, N. H. Rogers, J. Chem. Soc. Perkin Trans I. 2665 (1983)]. Entre los antibióticos de ácido pseudomónico, desde un punto de vista terapéutico, el más valioso es el ácido pseudomónico A, que tiene un efecto inhibitor del crecimiento principalmente frente bacterias grampositivas.

Un procedimiento para aislar ácido pseudomónico A a partir del caldo de cultivo que contiene un complejo de antibióticos es la extracción líquido-líquido. Según la patente alemana nº 2227739 y la patente US nº 4.289.703, se añaden sales de bario solubles al caldo de fermentación, después las células del microorganismo con los agentes inactivos insolubles se separan mediante centrifugación, y finalmente los antibióticos se extraen con metil isobutil cetona (MIBK). Los antibióticos se eliminan entonces del extracto de metil isobutil cetona mediante agua alcalina, y el extracto acuoso alcalino resultante se limpia mediante reextracción con metil isobutil cetona. El producto bruto obtenido se cromatografía, y se prepara un derivado de éster a partir del complejo de antibióticos de ácido pseudomónico y se purifica con cromatografía de capa fina preparativa. La forma ácida del antibiótico puro se obtiene mediante hidrólisis.

La patente belga nº 870.855 se refiere a un procedimiento en el que el caldo de cultivo se extrae con metil isobutil cetona, y del extracto se extrae la sustancia activa mediante disolución de hidrogenocarbonato de sodio. Los materiales insolubles en agua alcalina se separan mediante filtración, después el pH del filtrado se acidifica y se extrae con metil isobutil cetona. Finalmente, el ácido pseudomónico A se obtiene mediante la concentración del extracto y cristalización en una mezcla de metil isobutil cetona-n-heptano.

La patente US nº 4.222.942 se refiere a un procedimiento para el aislamiento de mupirocina extrayendo una disolución de preparación de mupirocina bruta en un disolvente orgánico inmiscible con agua con un medio acuoso, reduciendo el pH de dicha disolución acuosa, y extrayendo la disolución con un disolvente orgánico polar inmiscible con agua, y añadiendo después un diluyente que es suficientemente no polar para reducir la polaridad de, pero que es miscible con, dicho disolvente orgánico polar para efectuar la cristalización de mupirocina. Las etapas de este esquema de reacción son variadas y, como consecuencia, el esquema requiere una gran cantidad de disolvente.

La patente US nº 6.245.921 describe un procedimiento para el aislamiento de mupirocina, que comprende extraer un caldo de cultivo acidificado usando un hidrocarburo alifático clorado o acetato de isobutilo, de manera que se obtiene un extracto que contiene mupirocina; y purificando la mupirocina a partir de dicho extracto distribuyendo el extracto entre una fase acuosa y una fase orgánica que comprende al menos un disolvente orgánico, y evaporando el disolvente orgánico.

Ninguno de los procedimientos anteriores son satisfactorios desde un punto de vista comercial y ecológico. En consecuencia, existe todavía la necesidad de un nuevo procedimiento para la purificación de mupirocina, que esté libre de al menos algunas de las desventajas de los procedimientos conocidos, y cuya aplicación, a escala de producción, puede dar como resultado un rendimiento elevado de la recuperación del antibiótico mencionado anteriormente.

La presente invención proporciona un procedimiento para la purificación de la mupirocina, que satisface al menos algunos de los objetivos definidos anteriormente en cuanto a que sea económicamente sensato y, preferentemente, menos perjudicial ecológicamente, y dé como resultado un rendimiento elevado de mupirocina con una pureza elevada. El procedimiento comprende precipitar mupirocina a partir de una disolución acuosa de mupirocina, y disolver el precipitado en un disolvente orgánico.

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar mupirocina, que comprende las etapas siguientes:

- a) provocar o permitir la precipitación de mupirocina a partir de una disolución acuosa de mupirocina;
- b) recuperar el precipitado;
- c) disolver el precipitado recuperado en un disolvente orgánico; y opcionalmente
- d) recuperar mupirocina a partir del disolvente.

La expresión "mupirocina" comprende mupirocina como se define en cualquiera de las referencias mencionadas anteriormente, así como sus derivados de origen natural y sintéticos. La expresión comprende la forma ácida y sus sales, tales como la sal cálcica, así como solvatos y formas polimórficas de éstos.

5 En una forma de realización de la invención, la disolución de mupirocina es caldo de fermentación, tal como caldo aclarado, tal como aclarado mediante centrifugación o filtración. La fuente del caldo de fermentación no es crucial, y el caldo se puede obtener como se describe en la técnica anterior, por ejemplo como se describe en las referencias mencionadas anteriormente, en los documentos US n° 3.977.943, n° 4.071.536 y n° 4.289.703, WO 00/46389 o
10 WO 03/000910. Opcionalmente, el caldo se puede concentrar antes de precipitar la mupirocina. Se pueden usar disoluciones distintas de caldos de fermentación, por ejemplo una disolución que resulta de la síntesis química de mupirocina o un derivado de la misma.

La mupirocina se puede precipitar a partir de la disolución acuosa añadiendo un ácido, tal como un ácido seleccionado de entre el grupo constituido por ácido acético; ácido cítrico; ácido sulfúrico; y ácido clorhídrico.
15 Cuando se usa un ácido, el pH durante la precipitación está convenientemente en el intervalo comprendido entre 2,0 y 6,0, preferentemente en el intervalo comprendido entre 3,5 y 5,0, y lo más preferido en el intervalo comprendido entre 4,2 y 4,6. En una forma de realización, la disolución se deja agitar hasta que ha precipitado mupirocina, tal como durante un periodo de 10-40 minutos.

20 El precipitado que contiene mupirocina se puede recuperar mediante centrifugación o filtración, prefiriéndose la centrifugación. La centrifugación se debería llevar a cabo en condiciones tales que se forme un gel, por ejemplo, centrifugando durante 5-30 minutos a 5000-15000 g, o en una centrifugadora continua a 5000-15000 g.

En una forma de realización de la invención, el precipitado recuperado se disuelve en un disolvente orgánico polar, sustancialmente inmiscible con agua. Como disolvente, se puede usar una cetona, por ejemplo que tiene la fórmula alquilo-C(=O)-alquilo, tal como metil isobutil cetona; un éster, por ejemplo, que tiene la fórmula alquilo-C(=O)-O-
25 alquilo, tal como acetato de etilo; un alcohol, por ejemplo que tiene la fórmula alquilo-OH, tal como n-butanol; o una mezcla que comprende cualquiera de éstos. En la presente memoria, la expresión "alquilo", cuando se refiere a alcoholes, se refiere a grupos de hidrocarburos alifáticos de más de cuatro carbonos, e incluye un grupo de hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada que está saturado o insaturado, y, en otros disolventes, la
30 expresión "alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada que está saturado o insaturado y tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más átomos de carbono.

Actualmente se prefiere que el disolvente sea metil isobutil cetona (MIBK) pura. Esto es, el disolvente debería comprender más de 90% (tal como más de 92%, más de 94%, más de 96%, o incluso más de 98% o 99%) de MIBK. Si es necesario, la mupirocina se puede recuperar del disolvente, tal como mediante cristalización, opcionalmente después de la eliminación del agua a partir del disolvente.

En otra forma de realización, el procedimiento de la invención comprende una o más etapas adicionales, a fin de obtener un antibiótico más puro. Tales etapas se pueden aplicar antes de la etapa a) y/o después de la etapa d), y/o entre las etapas a) y b) y/o entre las etapas b) y c) y/o después de la etapa c), y comprenden etapas seleccionadas de entre el grupo constituido por: una etapa de decoloración; una etapa para eliminar componentes hidrófilos; una etapa de concentración; una etapa de evaporación; una etapa de aclarado, una etapa de eliminación del agua; una etapa de secado; una etapa de filtración; una etapa de extracción; y una etapa de cristalización. Actualmente se
45 prefiere que la etapa o etapas adicionales se apliquen después de la etapa d) anterior.

El procedimiento de la invención se lleva a cabo preferentemente a una temperatura entre el punto de congelación de las disoluciones y la temperatura ambiente, tal como una temperatura en el intervalo 0-25°C, más preferentemente en el intervalo 5-20°C. Opcionalmente, se pueden llevar a cabo etapas de secado y evaporación a una temperatura elevada, tal como en el intervalo 20-50°C.
50

La mupirocina preparada según la invención es más pura que la mupirocina obtenida mediante los procedimientos de la técnica anterior. Mediante el procedimiento de la invención, es posible obtener mupirocina que tiene una pureza de al menos 93%, por ejemplo al menos 95%, preferentemente al menos 96%, más preferentemente al menos 97% y lo más preferible incluso al menos 98%. Típicamente, la mupirocina de la invención tiene una actividad específica de al menos 950 µg/mg, y preferentemente al menos 960 µg/mg.
55

60 Siguiendo la enseñanza de la técnica anterior (por ejemplo, documentos US n° 5.569.672 y US n° 5.594.026, cuya descripción completa se incorpora en la presente memoria como referencia), también es posible generar sales cálcicas y diferentes formas polimórficas de ácido pseudomónico.

El uso de las expresiones "un" y "una" y "el/la" y referencias similares a la hora de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones), se han de interpretar que cubren tanto el singular como el plural, excepto que indique en la presente memoria de otro modo o claramente contradiga el texto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" se han de interpretar como expresiones de extremos abiertos (es decir, quieren decir "que incluye, pero no se limita a,"), excepto que se señale de otro modo. La cita de
65

intervalos de valores en la presente memoria pretende simplemente servir como un procedimiento taquigráfico para hacer referencia individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, excepto que se indique en la presente memoria de otro modo, y cada valor separado se incorpora en la memoria como si se citase individualmente en la presente memoria. Todos los valores mencionados en la presente memoria deben entenderse como precedidos por “alrededor de”, es decir, “7” debería entenderse como “alrededor de” 7. Todos los procedimientos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado, excepto que se indique en la presente memoria o de otro modo se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o el uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en la presente memoria pretende simplemente iluminar mejor la invención.

Se describen en la presente memoria unas formas de realización preferidas de la presente invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de una disolución de mupirocina libre de células en agua

Ejemplo 1A

Un caldo de fermentación que contiene mupirocina se obtuvo fermentando de manera conocida per se un cultivo de *Pseudomonas fluorescens* productor de mupirocina, es decir, en línea con el procedimiento del Ejemplo 1 en la patente US n° 3.977.943.

Se ajustaron 2 l de caldo de fermentación de cultivo completo que contiene mupirocina, procedente de un fermentador de laboratorio, a pH = 7,1 (mediante adición de de NaOH 1 M), y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una disolución libre de células se obtuvo mediante centrifugación durante 10 minutos en una centrifugadora de laboratorio a 10000 g (5° Celsius). En la disolución aclarada final se recuperó alrededor de 90% de la mupirocina presente en el caldo de fermentación.

Ejemplo 1 B

Se ajustaron 5 l de caldo de fermentación de mupirocina obtenido como en el ejemplo 1a a pH = 8,3 (mediante adición de NaOH 3 M) y se filtraron a través de un filtro metálico de 144 µm a temperatura ambiente, seguido de ultrafiltración (Millipore Pellicon-2 Biomax-5). En la disolución aclarada final se recuperó alrededor de 70% de la mupirocina presente en el caldo de fermentación.

Ejemplo 1C

Se ajustaron 2600 l de caldo de fermentación de mupirocina obtenido como en el Ejemplo 1A a pH = 7,5 (mediante adición de NaOH al 20%) y se filtraron a través de un filtro cerámico de 0,1 µm (módulos SCT/Exekia MembraloxP19-40.0,1-a-Alu). La mupirocina residual se recuperó mediante diafiltración de la biomasa en modo discontinuo con 3*500 l de agua. Subsiguientemente, el permeado que contiene la mupirocina se concentró mediante RO (membrana Osmonics Desal DK). Se encontró que 80% de la mupirocina presente en el caldo de fermentación se recuperó en la disolución aclarada final.

Ejemplo 2: precipitación acuosa a pH bajo

Ejemplo 2A

Se transfirieron 2 l de filtrado obtenido como en el ejemplo 1c a botellas de centrifugadora y se añadieron lentamente con agitación 40 ml de ácido acético concentrado. El PH resultante fue 4,5. La muestra se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la centrifugación en una centrifugadora refrigerada a 13000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se eliminó por vertido dejando un gel, que contiene 0,6 g de mupirocina/g de gel. La recuperación total en la precipitación fue 90%.

Ejemplo 2B

Se hicieron precipitar 1000 l de disolución de mupirocina acuosa aclarada, obtenida como en el Ejemplo 1c, reduciendo el pH hasta 4,5. Se mezclaron alrededor de 50 l de ácido acético al 60% en línea con el filtrado. El precipitado se recogió mediante un separador industrial (Westfalia CSA-19), produciendo un gel de mupirocina que contiene 0,333 g de mupirocina/g de gel.

Ejemplo 2C

Se transfirieron 600 ml de filtrado, obtenido como en el Ejemplo 1A, a botellas de centrifugadora, y el pH se ajustó hasta 4,4 añadiendo lentamente de 2 ml de ácido clorhídrico concentrado con agitación. La muestra se dejó agitar a

temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la centrifugación en una centrifugadora refrigerada a 13000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se separó mediante vertido, dejando un gel.

Ejemplo 3: Precipitación acuosa repetida a pH bajo

Se disolvieron 3 ml de precipitado acuoso, obtenido como en el Ejemplo 2a, en 16 ml de hidróxido amónico al 8%. El pH de la disolución clara resultante (pH = 8,5) se ajustó hasta 4,4 mediante adición de 3 ml de ácido acético concentrado. La muestra se dejó a 4° Celsius toda la noche antes de la centrifugación en una centrifugadora refrigerada a 13000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se eliminó mediante vertido, dejando un gel. La recuperación total en la segunda precipitación fue 99%.

Ejemplo 4: Disolución de mupirocina en disolvente orgánico

Ejemplo 4A

Un precipitado acuoso que contiene 25 g de mupirocina, obtenido como en el Ejemplo 2a, se disolvió en 250 ml de MIBK. La mezcla se filtró.

Ejemplo 4B

Un precipitado acuoso que contiene 25 g de mupirocina, obtenido como en el Ejemplo 2a, se disolvió en 250 ml de acetato de etilo. La mezcla se filtró.

Ejemplo 5: Purificación adicional

Ejemplo 5A: Eliminación de componentes hidrófilos

Se transfirieron a un embudo de separación 180 ml de mupirocina en MIBK, obtenida como en el Ejemplo 4a, y se extrajo con 20 ml de agua MilliQ. Se dejó que las dos fases se separasen, y la fase acuosa se eliminó y se desechó. La extracción de la fase orgánica se repitió 4 veces, y después se recuperó mupirocina de la fase orgánica.

Ejemplo 5B: Eliminación del color mediante tratamiento con carbono

A 180 ml de mupirocina en MIBK obtenida como en el Ejemplo 4a se añadieron 4,5 g de carbono activado (Norit C extra) y se dejó agitar durante 30 minutos antes de que se eliminase el carbono por filtración, y la torta del filtro se lavó con 30 ml de MIBK.

Ejemplo 6: Cristalización

Ejemplo 6A: Preparación de forma polimorfa I de ácido pseudomónico

Se evaporaron a vacío en un evaporador giratorio de laboratorio (60 mbares, 40°C) 200 ml de disolución orgánica obtenida en el Ejemplo 5a, que contiene 17 g mupirocina. La evaporación se detuvo cuando quedaron 102 ml de disolución en el matraz del producto. Se añadieron 5 ml de heptano, y la disolución se dejó agitando a temperatura ambiente. Después de 22 horas con agitación, el material cristalino se filtró. La torta del filtro se lavó tres veces con 40 ml de MIBK, y después se secó (< 50 mbares, 40°C). Se recuperaron 13,2 g de producto seco con una actividad específica de 960 µg/mg (medida mediante HPLC).

Ejemplo 6B: Preparación de forma polimorfa II de ácido pseudomónico

A 100 ml de disolución orgánica, que contiene 17 g de mupirocina, obtenida como se describe en el Ejemplo 5b, se añadieron 150 ml de heptano durante alrededor de 2 horas con agitación. Después de alrededor de 24 horas con agitación, el material cristalino se filtró, se lavó con MIBK/heptano (50/50), y se secó en una secadora de vacío (< 50 mbares, 40°C).

Ejemplo 6C: Preparación de forma polimorfo III

A 100 ml de disolución orgánica, que contiene 17 g mupirocina, obtenida como se describe en el Ejemplo 4b, se añadieron 90 ml de heptano con agitación. La disolución se calentó hasta 40°C, y se mantuvo a esta temperatura durante el resto del procedimiento. La disolución se sembró con producto cristalino obtenido del Ejemplo 6A. Después de tres días con agitación, el material cristalino se filtró, se lavó con MIBK/heptano (50/50), y se secó en una secadora de vacío (< 50 mbares, 40°C).

Ejemplo 6D: Preparación de pseudomonato de calcio

Se disolvió lentamente precipitado acuoso obtenido como en el Ejemplo 2A, que contiene 25 g de mupirocina, con

disolución de hidróxido sódico (1M, 45 ml) para dar una disolución neutra (pH 7). La disolución se filtró. Se añadió cloruro de calcio (6,3 g) a la mezcla, y la agitación se mantuvo para dar una disolución clara. Después de dejar reposar durante 20 horas, el producto cristalino se separó por filtración, se lavó con agua (50 ml) y se secó (50 mbares, 40°C) para dar pseudomonato cálcico dihidratado.

5

Ejemplo 6E: Preparación de pseudomonato cálcico

Se añadió precipitado acuoso obtenido como en el Ejemplo 2A, que contiene 25 g de mupirocina, a metanol acuoso al 50% hasta un volumen de 250 ml. Se añadió óxido de calcio (1,8 g) para dar una disolución neutra (pH 7). La disolución se evaporó a fin de eliminar el metanol. El residuo libre de metanol (120 ml) se diluyó con agua (50 ml) y se permitió cristalizar con agitación a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la mezcla se filtró, y el producto recogido se lavó suspendiendo con agua (50 ml). El producto cristalino se secó en un horno de vacío (50 mbares, 40°C).

10

15 Comparación

Calidad del procedimiento y producto final:

	Ej. 1 del documento US n° 4.222.942	Ej. 2 del documento US n° 4.222.942	Ej. 6a de la invención
Pureza (producto final)	92-93%		96%
Rendimiento (desde el filtrado hasta el producto final)	31%	47%	47%
Uso de disolvente Litro/g de producto	2,5	1,7	0,03
"Etapas"	8	9	3
"Etapas" = Número de etapas requeridas para obtener un extracto de disolvente concentrado a partir de un caldo/filtrado aclarado			

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para purificar mupirocina, que comprende las etapas siguientes:
 - 5 a) provocar o permitir la precipitación de mupirocina a partir de una disolución acuosa de mupirocina, estando el pH de la disolución durante la precipitación en el intervalo comprendido entre 2,0 y 6,0;
 - b) recuperar el precipitado;
 - 10 c) disolver el precipitado recuperado en un disolvente orgánico; y opcionalmente
 - d) recuperar mupirocina a partir del disolvente.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hace precipitar mupirocina añadiendo un ácido, tal como un ácido seleccionado de entre el grupo constituido por ácido acético; ácido cítrico; ácido sulfúrico; y ácido clorhídrico.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el pH de la disolución durante la precipitación está en el intervalo comprendido entre 3,5 y 5,0.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el pH de la disolución durante la precipitación está en el intervalo comprendido entre 4,2 y 4,6.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la disolución de mupirocina es caldo de fermentación aclarado.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el precipitado que contiene mupirocina se recupera en la etapa b) mediante centrifugación o filtración.
- 30 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa c), el precipitado recuperado orgánico se disuelve en un disolvente orgánico polar, inmiscible o moderadamente soluble en agua.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el disolvente orgánico es una cetona; un éster; o un alcohol; o una mezcla que comprende cualquiera de éstos.
- 35 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el disolvente orgánico es metil isobutil cetona pura.
- 40 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mupirocina se recupera a partir del disolvente mediante cristalización.
- 45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una o más etapas adicionales seleccionadas de entre el grupo constituido por una etapa de decoloración; una etapa de eliminación de componentes hidrófilos; una etapa de concentración; una etapa de evaporación; una etapa de aclarado; una etapa de eliminación del agua; una etapa de secado; una etapa de filtración; una etapa de extracción; y una etapa de cristalización.