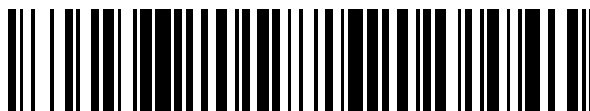


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 052**

51 Int. Cl.:

C12P 19/62 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2003 E 03784766 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 1539977**

54 Título: **Producción de tiacumicina**

30 Prioridad:

29.07.2002 US 399956 P

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

20.01.2015

73 Titular/es:

**OPTIMER PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
65 Hayden Avenue
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**SHUE, YOUE-KONG;
DU, CHI-JEN FRANK;
CHIOU, MING-HIS;
WU, MEI-CHIAO;
CHEN, YUAN-TING;
OKUMU, FRANKLIN W. y
DUFFIELD, JONATHAN JAMES**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 527 052 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

Producción de tiacumicina

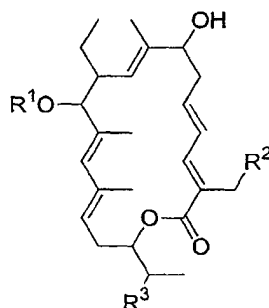
5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las tiacumicinas son una familia de compuestos estructuralmente relacionados que contienen el anillo de macrólido de 18 miembros mostrado a continuación.

10

15

20



Actualmente, se han identificado varias tiacumicinas distintas y seis de estas (tiacumicina A-F) se definen por su patrón particular de sustituyentes R^1 , R^2 y R^3 (patente de EE.UU. nº 4.918.174; J. Antibiotics, 1987, 575-588).

25 Las lipiarmicinas son una familia de productos naturales estrechamente relacionados con las tiacumicinas. Dos miembros de la familia de las lipiarmicinas (A3 y B3) son idénticos a las tiacumicinas B y C, respectivamente (J. Antibiotics, 1988, 308-315; J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1987, 1353-1359).

30 Las tiacumicinas y las lipiarmicinas se han caracterizado por numerosos procedimientos físicos. Las estructuras químicas informadas de estos compuestos se basan en espectroscopía (UV-vis, IR y RMN ^1H y ^{13}C), espectrometría de masas y análisis elemental (véanse, por ejemplo: J. Antibiotics, 1987, 575-588; J. Antibiotics, 1983, 1312-1322).

35 Las tiacumicinas se producen por bacterias, que incluye *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie *hamdenensis*, que puede obtenerse de ARS Patent Collection of the Northern Regional Research Center, United States Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, número de acceso NRRL 18085. Las características de la cepa AB 718C-41 se facilitan en J. Antibiotics, 1987, 567-574 y la patente de EE.UU. nº 4.918.174.

40 Las lipiarmicinas se producen por bacterias que incluye *Actinoplanes deccanensis* (patente de EE.UU. nº 3.978.211). Los estudios taxonómicos de la cepa tipo A/10655, que se ha depositado en la ATCC bajo el número 21983, se tratan en J. Antibiotics, 1975,247-25.

45 Las tiacumicinas, específicamente la tiacumicina B, muestran actividad contra una variedad de patógenos bacterianos, y en particular contra *Clostridium difficile*, una bacteria Gram-positiva (Antimicrob. Agents Chemother. 1991, 1108-1111). *Clostridium difficile* es una bacteria formadora de esporas anaerobia que produce una infección del intestino. La diarrea es el síntoma más común, pero también pueden producirse dolor abdominal y fiebre. *Clostridium difficile* es un agente causal importante de la colitis (inflamación del colon) y la diarrea que pueden producirse tras la ingestión de antibióticos. Esta bacteria se adquiere principalmente en hospitales e instituciones de cuidado de enfermos crónicos. Debido a que la tiacumicina B muestra actividad prometedora contra *C. difficile*, se espera que sea útil en el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente aquellas del tubo gastrointestinal, en mamíferos. Ejemplos de tales tratamientos incluyen, pero no se limitan a, tratamiento de colitis y tratamiento de síndrome del intestino irritable. Las tiacumicinas también pueden usarse para el tratamiento de cánceres gastrointestinales.

55 Se usan procedimientos de fermentación para obtener antibióticos, que incluyen tiacumicinas. Los antibióticos pueden producirse cultivando un microorganismo en un medio que contiene fuentes fácilmente asimiladas de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas bajo condiciones de fermentación aerobia sumergida, hasta que se produce una cantidad sustancial de actividad de antibiótico como se deduce de los análisis en el procedimiento. Debido al aumento de la demanda mundial de antibióticos, hay una necesidad continua de procedimientos mejorados para producir antibióticos.

65

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un cromatograma de HPLC de productos de fermentación en bruto producidos según el Ejemplo 1; la tiacumicina B tiene un tiempo de retención de aproximadamente 12,6 min.

La Figura 2 muestra un cromatograma de HPLC de productos de fermentación producidos según el Ejemplo 2; la tiacumicina B tiene un tiempo de retención de aproximadamente 11,8 min.

La Figura 3 muestra un cromatograma de HPLC de tiacumicina B purificada (por HPLC) producida por fermentación según el Ejemplo 2; la tiacumicina B tiene un tiempo de retención de aproximadamente 12,0 min.

La Figura 4 muestra un cromatograma de HPLC de tiacumicina B producida por fermentación y purificada por cromatografía de líquidos de media presión de fase inversa, seguido de trituración según el Ejemplo 3; la tiacumicina B tiene un tiempo de retención de aproximadamente 10,1 min.

RESUMEN DE LA INVENCION

La materia de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. A continuación se describen procedimientos y materiales a modo de ejemplo.

Las composiciones que contienen la tiacumicina B producida usando el procedimiento de la invención pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una infección, como se ha descrito anteriormente, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la infección. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y evolución de la infección, terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el criterio del médico práctico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen la tiacumicina B producida mediante el procedimiento de la invención se administran a un paciente susceptible a o de otro modo en riesgo de una infección particular. Se define que una cantidad tal es una "cantidad o dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente, peso y similares.

Una vez se produce la mejora de las afecciones del paciente, se administra una dosis de mantenimiento si fuera necesario. Posteriormente, la dosificación o la frecuencia de administración, o ambas, puede reducirse, en función de los síntomas, a un nivel al que la afección mejorada se retiene. Cuando los síntomas se han aliviado al nivel deseado, puede cesarse el tratamiento. Sin embargo, los pacientes pueden requerir tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier reaparición de los síntomas de la enfermedad.

En general, una dosis eficaz adecuada de la tiacumicina B producida mediante el procedimiento de la presente invención estará en el intervalo de 0,1 a 1000 miligramos (mg) por receptor por día, preferentemente en el intervalo de 1 a 500 mg por día. La dosificación deseada se presenta preferentemente en una, dos, tres, cuatro o más subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo del día. Estas subdosis pueden administrarse como formas de dosificación unitaria, por ejemplo, que contienen 5 a 1000 mg, preferentemente 10 a 200 mg de principio activo por forma de dosificación unitaria. Preferentemente, los compuestos de la invención se administrarán en cantidades de entre aproximadamente 1,0 mg/kg y 250 mg/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente una a cuatro veces al día.

Una "composición farmacológica" se refiere a una mezcla de una o más de las tiacumicinas descritas en el presente documento, o sales fisiológicamente aceptables de las mismas, con otros componentes químicos, tales como vehículos y/o excipientes fisiológicamente aceptables. El fin de una composición farmacológica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

Las "sales farmacéuticamente aceptables" de los compuestos de la invención incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de ácidos adecuados incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, glucónico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico, 1,2-etanosulfónico (edisilato), ácido galactosil-D-glucónico, y similares.

Otros ácidos, tales como ácido oxálico, aunque en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse en la preparación de sales útiles como productos intermedios en la obtención del compuesto producido mediante el procedimiento de la presente invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio), metal alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amonio y N(alquilo C₁-C₄)₄⁺, y similares. Ejemplos ilustrativos de algunas de éstas incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de colina, carbonato sódico y similares.

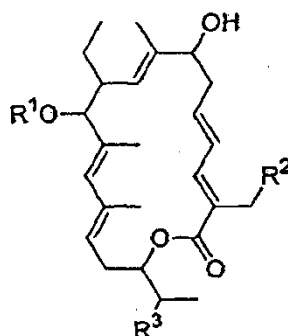
Un "vehículo fisiológicamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado.

5 Un "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacológica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

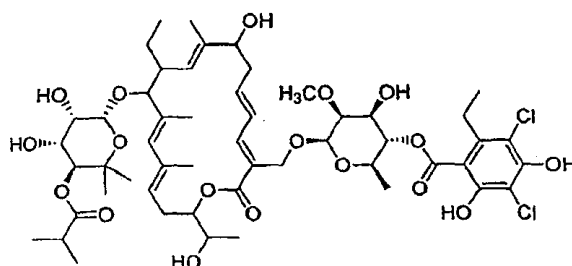
10 El término "medio nutritivo", como se usa en el presente documento, describe una mezcla de componentes sintéticos o que se producen naturalmente. En general, un medio nutritivo comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, oligoelementos tales como sales inorgánicas, y opcionalmente vitaminas u otros factores de crecimiento, y un adsorbente.

15 El término "caldo", como se usa en el presente documento, se refiere al medio de cultivo fluido que se obtiene durante o después de la fermentación. El caldo comprende una mezcla de agua, el (los) antibiótico(s) deseado(s), nutrientes no usados, organismos vivos o muertos, productos metabólicos y el adsorbente con o sin producto adsorbido.

20 El término "tiacumicina", como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de compuestos todos los cuales comprenden el anillo de macrólido de 18 miembros mostrado a continuación:



35 El término "tiacumicina B" se refiere a una molécula que tiene la estructura mostrada a continuación:



40 El término "rendimiento", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de tiacumicina en bruto reconstituida en metanol al mismo volumen que el caldo de fermentación original. El rendimiento se determina usando técnicas de HPLC estándar. El rendimiento se informa en unidades de mg/l.

45 Según una realización de la invención, la tiacumicina B se recupera en rendimiento excepcional (> 100 mg/l de caldo) del caldo de fermentación por absorción en resina y se eluye de la resina y micelio lavando con disolventes de diversas polaridades. La purificación puede ser además por extracción con disolventes y/o separación cromatográfica tal como Sephadex, gel de sílice, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de líquidos de media presión de fase inversa y/o recristalización con uno o más disolventes y/o trituración con uno o más disolventes.

60 Un microorganismo empleado en la presente invención se identificó como que pertenecía a la familia *Actinoplanaceae*, género *Dactylosporangium* (Journal of Antibiotics, 1987, pág. 567-574 y la patente de EE.UU. 4.918.174). Se ha designado *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie *hamdenensis* 718C-41. El subcultivo se obtuvo de ARS Patent Collection of the Northern Regional Research Center, United States Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, EE.UU., en la que se asignó el número de acceso NRRL 18085. Las características de la cepa AB 718C-41 se facilitan en Journal of Antibiotics, 1987, pág. 567-574, y la patente de EE.UU. 4.918.174.

- Microorganismos adicionales que pueden producir tiacumicinas incluyen especies mutantes, que muestran propiedades ventajosas en comparación con especies conocidas en la técnica. Tales cepas bacterianas pueden generarse por mutagénesis de una cepa parental. Estrategias y procedimientos de mutagénesis, procedimientos de cribado y aislamiento de cepas bacterianas mutadas, composiciones de medios usados en la producción de las cepas mutantes de la invención se conocen en la técnica. Los microorganismos designados como cepas pueden incluir ventajas tales como elevada producción del macrólido deseado, uso más eficaz de medios nutrientes, o disminución del requisito de oxígeno para el crecimiento aerobio.
- En la realización preferida, el cultivo de *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie *hamdenensis* AB 718C-41 NRRL 18085 para la producción de tiacumicina B se lleva a cabo en un medio que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y otros componentes orgánicos fácilmente asimilables con uno o más absorbentes bajo condiciones de aireación y mezcla apropiadas en un entorno estéril. Las composiciones de medios nutrientes usados en la producción de antibióticos de la invención se describirán en detalle en los ejemplos.
- Las fuentes de carbono que pueden soportar el crecimiento de microorganismos incluyen, pero no se limitan a, glucosa, sacarosa, galactosa, fructosa, almidón, molasas, extractos de malta, dextrinas, suero de la leche, glicerol, lípidos, harina de maíz y similares, y combinaciones de los mismos. Según una realización de la invención, la fuente de carbono está presente en el intervalo entre el 0,2-10 % en peso. Las cantidades de fuentes de carbono según una realización de la invención se facilitan en la Tabla 2.
- Las fuentes de nitrógeno que pueden soportar el crecimiento de microorganismos incluyen, pero no se limitan a, extracto bovino, sémola de soja, harina de semilla de algodón, levadura completa, extracto de levadura, harina de soja, peptona, casaminoácido, polvo de pescado, extracto soluble de maíz, sales de amonio, caseína, aminoácidos y similares, y combinaciones de los mismos. Según una realización de la presente invención, el medio nutritivo contiene polvo de pescado (harina de pescado de calidad 999 Prime, TripelNine Fish Protein, a.m.b.a. Fiskerihavsgade 35, 6700 Esbjerg, Dinamarca) como fuente de nitrógeno. Según una realización de la invención, la fuente de nitrógeno está presente en el intervalo entre el 0,1-5,0 % en peso. Las cantidades de las fuentes de nitrógeno según una realización de la invención se facilitan en la Tabla 2.
- Oligoelementos esenciales necesarios para el crecimiento y desarrollo del organismo pueden producirse como impurezas en otros constituyentes de los medios en cantidades suficientes para cumplir los requisitos de crecimiento y biosintéticos del organismo. Sin embargo, puede ser beneficioso incorporar en los medios de cultivo sales inorgánicas nutrientes solubles adicionales que pueden ayudar al crecimiento de microorganismos. Sales inorgánicas que pueden soportar el crecimiento de microorganismos incluyen, pero no se limitan a, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl, $CaCO_3$ y similares. Los oligoelementos esenciales están preferentemente presentes en el intervalo entre el 0,02-2,0 % en peso. Cantidades de elementos esenciales individuales según una realización de la invención se facilitan en la Tabla 2.
- Se encontró que las resinas adsorbentes comercialmente disponibles potenciaban el rendimiento y la eficiencia de recuperación de la tiacumicina B durante la fermentación. Tales adsorbentes incluyen, pero no se limitan a, Amberlite® XAD16, XAD16HP, XAD2, XAD7HP, XAD1180, XAD1600 y IRC50 (todos de Rohm & Haas Co., EE.UU.), Duolite® XAD761 (Rohm & Haas Co., EE.UU.) y similares. Los adsorbentes están preferentemente presentes en el intervalo entre el 0,5-15 % en peso. Cantidades de adsorbentes según una realización de la invención se facilitan en la Tabla 2.
- Como es habitual en los procedimiento de cultivo sumergidos aerobios, el aire estéril se dispersa a través del medio de cultivo. La concentración de oxígeno se mantuvo a más del 3 % (en sensores de O_2 serie 6000, Mettler Toledo). Bajo estas condiciones, el crecimiento de células se mantiene a un nivel que previene que las condiciones de crecimiento se vuelvan anaerobias. En algunas realizaciones, el componente limitante se elige de una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, o cualquier otro componente requerido por las células (por ejemplo, en el medio de alimentación).
- Las bacterias se cultivan bajo condiciones de crecimiento adecuadas. Tales condiciones de crecimiento adecuadas se caracterizan por limitar la disponibilidad de un componente del medio de crecimiento y/o medio de alimentación de tal forma que se mantengan condiciones aerobias para el crecimiento de dicha bacteria. Tales condiciones también pueden caracterizarse, por ejemplo, manteniendo un nivel de oxígeno disuelto a una concentración entre aproximadamente el 2 % y el 30 %. Tales niveles de oxígeno disuelto pueden variar dependiendo del equipo técnico específico usado para el crecimiento de bacterias y para medir la concentración de oxígeno disuelto.
- Las bacterias productoras de tiacumicina pueden cultivarse en recipientes que varían de matraces con agitación a grandes fermentadores "discontinuos", mediante procedimientos conocidos en la técnica. Para producir cantidades sustanciales de tiacumicinas, se utiliza fermentación aerobia sumergida en tanques. Sin embargo, pueden obtenerse pequeñas cantidades por cultivo en matraz con agitación. Para la fermentación en tanque, es preferible usar un inóculo vegetativo. El inóculo vegetativo se prepara inoculando un pequeño volumen de medio de cultivo con la forma de espora, fragmentos miceliales y un sedimento liofilizado del organismo para obtener un cultivo activamente en crecimiento reciente del organismo. El inóculo vegetativo se transfiere a continuación a un tanque mayor en el

que, después de un tiempo de incubación adecuado, se produce el antibiótico tiacumicina con rendimiento muy mejorado.

5 Puede ser necesario añadir pequeñas cantidades de un agente antiespumante al medio de fermentación a gran escala si la espumación se vuelve un problema.

10 La producción avanza en un medio de control con otros aditivos/componentes para mejorar la producción. Se usa un procedimiento de cultivo con agitación sumergido en líquido para la producción de tiacumicinas. La fermentación se lleva a cabo a un intervalo de temperatura de 25 °C a 37 °C. El consumo de la fuente de carbono se monitoriza cuidadosamente y se añade una cantidad adicional de fuente de carbono según se necesite. El pH de la fermentación se mantiene preferentemente entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0. La tiacumicina B se produce y se acumula entre 3 y 15 días después de la inoculación de la fermentación. El medio de control estándar consiste en los siguientes componentes en las siguientes cantidades:

15	Polvo de pescado	0,1 % al 5 %
	Glucosa	0,2 % al 10 %
	K ₂ HPO ₄	0,02 % al 0,5 %
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 % al 0,5 %
20	KCl	0,01 % al 0,3 %
	CaCO ₃	0.1 % al 2 %

Otros aditivos/componentes consisten en:

25	Casaminoácido	0,05 % al 2 %,
	Extracto de levadura	0,05 % al 2 %
	Resina XAD-16	0,5 % al 15 %

30 Tras completarse la fermentación, la masa sólida (incluyendo la resina adsorbente) se separa del caldo por tamizado. Se eluyeron tiacumicinas de la resina con disolventes orgánicos tales como acetato de etilo, metanol, acetonitrilo o una mezcla de dos o más disolventes orgánicos. El extracto se concentra a continuación a presión reducida. Este residuo se purifica adicionalmente por trituración con disolventes de baja polaridad tales como hexanos, heptanos, metilciclohexano, o repartiendo entre sistemas de disolventes bifásicos tales como: acetato de etilo/agua; acetato de etilo/disolución acuosa de cloruro sódico; metanol/hexano, acetonitrilo/hexano u otras mezclas
35 de dos o más disolventes en diversas relaciones y combinaciones o por cromatografía en columna Sephadex eluyendo con un sistema de disolventes orgánicos apropiado. Si se necesita, las tiacumicinas pueden purificarse adicionalmente por cualquiera de cristalización, y/o separación cromatográfica y/o cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y/o reparto de líquido/líquido y/o trituración.

40 EJEMPLOS

Como puede apreciarse de la divulgación anterior, la presente invención tiene una amplia variedad de aplicaciones. Por consiguiente, los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no a modo de limitación.

45 Ejemplo de referencia 1

50 Se mantuvo *Dactylosporangium aurantiacum* subesp. *hamdenensis* AB 718C-41 NRRL 18085 (disolución madre a -20 °C) sobre 1 ml de medio nº 104 (Tabla 1). Después de las condiciones de esterilización estándar (30 min, 121 °C, 1,05 kg/cm²), el matraz con semillas (250 ml) que contenía en medio nº 104 (50 ml) se inoculó con AB 718C-41 NRRL 18085 sobre un agitador (fijado a 250 rpm) a 30 °C durante 72 h. El cinco por ciento del inóculo vegetativo del matraz de semillas de primer pase se transfirió a continuación asépticamente a un matraz de fermentación que contenía los mismos componentes que en la Tabla 1.

55 Tabla 1: Componentes del medio nº 104

Polvo de pescado	Glucosa	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KCl	CaCO ₃	Casaminoácido	Extracto de levadura	XAD-16
10 g/l	20 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l	0,3 g/l	3 g/l	2,5 g/l	2,5 g/l	20 g/l

60 Los matraces de fermentación se incubaron sobre un agitador rotatorio a 30 °C durante 3 a 12 días. Se filtraron las muestras de caldo de fermentación de cultivo completo. La torta de filtración se lavó con MeOH y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se reconstituyó en metanol al mismo volumen de caldo de fermentación original. Se realizó un análisis usando un sistema de HPLC Waters BREEZE acoplado con un detector de UV/Vis de 2 canales Waters 2487. Las tiacumicinas se ensayaron sobre una columna YMC ODS-A de 5 µm de 50 x 4,6 µm de D.I. (catálogo de YMC nº CCA AS05-0546WT) con una fase móvil que consistía en 45 % de acetonitrilo en agua que
65

5 contenía 0,1 % de ácido fosfórico a una velocidad de flujo de 1,5 ml/minuto. Las tiacumicinas se detectaron a 266 nm. Se muestra un cromatograma de HPLC de un producto en bruto (tiempo de retención de la tiacumicina B a 12,6 minutos) en la Fig. 1. En este ejemplo, el rendimiento en bruto de la tiacumicina B fue aproximadamente 250 mg/l después de 7 días. Después de la purificación por HPLC, el rendimiento de tiacumicina B fue aproximadamente 100 mg/l.

Ejemplo 2

10 Después de las condiciones de esterilización estándar (30 min, 121 °C, 1,05 kg/cm²), el matraz de semillas (250 ml) que contenía el medio n° 104 (50 ml) se inoculó con AB 718C-41 NRRL 18085 y se incubó sobre un agitador (fijado a 250 rpm) a 30 °C durante 72 h. El cinco por ciento del inóculo vegetativo del matraz de semillas de primer pase se transfirió asépticamente a un matraz de semillas que contenía los mismos componentes que en la Tabla 1 y se incubó sobre un agitador rotatorio a 30 °C durante 72 h. El cinco por ciento del inóculo vegetativo del matraz de
15 semillas de segundo pase se usó a continuación para inocular con AB 718C-41 NRRL 18085 en un fermentador de 5 litros que contenía medio n° 104 (2,5 l). La excesiva formación de espuma se controló mediante la adición de un agente antiespumante (Sigma A-6426). Este producto es una mezcla de antiespumantes orgánicos de no silicona en una dispersión de polioli.

20 El consumo de glucosa se monitorizó como un parámetro de crecimiento y su nivel se controló mediante la adición del medio de alimentación. El medio de alimentación y las condiciones en el Ejemplo 2 fueron las siguientes:

Tabla 2

Medio de alimentación:					
Extracto de levadura	Casaminoácido	Glucosa	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KCl
1,5 %	1,5 %	30 %	0,5 %	0,5 %	0,3 %

25 Medio del fermentador: N° 104

Volumen del fermentador: 5 litros

30 Esterilización: 40 minutos, 121 °C, 1,05 kg/cm²

Temperatura de incubación: 30 °C.

Tasa de aireación: 0,5-1,5 volúmenes de aire por volumen de cultivo y minuto

Agitación del fermentador: 300-500 rpm

35 La fermentación se llevó a cabo durante 8 días y la resina XAD-16 se separó del caldo de cultivo por tamizado. Después de lavar con agua, la resina XAD-16 se eluyó con metanol (5-10 x volumen de XAD-16). El metanol se evaporó y el residuo aceitoso se extrajo tres veces con acetato de etilo. Los extractos se combinaron y se concentraron a presión reducida dando un residuo aceitoso. El residuo aceitoso se secó y se lavó con hexano dando el producto en bruto como un polvo marrón pálido y su cromatograma de HPLC (tiempo de retención de tiacumicina B a 11,8 minutos) se muestra en la Figura 2. Éste se purificó por columna de gel de sílice (mezcla de acetato de etilo y hexano como eluyente) y el material resultante se purificó adicionalmente por RP-HPLC (HPLC de fase inversa) dando tiacumicina B como un sólido blanco. Se determinó que la pureza era >95 % por cromatografía HPLC y el cromatograma (tiempo de retención de tiacumicina B a 12,0 minutos) se muestra en la Figura 3. El análisis de la tiacumicina B aislada dio datos de RMN ¹H y ¹³C idénticos a aquellos informados en J. Antibiotics, 1987, 575-588, y éstos se resumen a continuación.

Tiacumicina B:

50 pf 129-140 °C (polvo blanco de RP-HPLC);

pf 166-169 °C (agujas blancas en isopropanol);

[α]_D²⁰ -6,9 (c 2,0, MeOH);

EM *m/z* (ESI) 1079,7(M + Na)⁺;

55 RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,21 (d, 1H), 6,59 (dd, 1H), 5,95 (ddd, 1H), 5,83 (s a, 1H), 5,57 (t, 1H), 5,13 (d a, 1H), 5,09 (t, 1H), 5,02 (d, 1H), 4,71 (m, 1H), 4,71 (s a, 1H), 4,64 (s a, 1H), 4,61 (d, 1H), 4,42 (d, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,02 (quintuplete, 1H), 3,92 (dd, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,70 (d, 1H), 3,56 (s, 3H), 3,52-3,56 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,64-2,76 (m, 3H), 2,59 (septuplete, 1H), 2,49 (ddd, 1H), 2,42 (ddd, 1H), 2,01 (dq, 1H), 1,81 (s, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,65 (s, 3H), 1,35 (d, 3H), 1,29 (m, 1H), 1,20 (t, 3H), 1,19 (d, 3 H), 1,17 (d, 3H), 1,16 (d, 3H), 1,14 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 0,87 (t, 3H);

60 RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 178,4, 169,7, 169,1, 154,6, 153,9, 146,2, 143,7, 141,9, 137,1, 137,0, 136,4, 134,6, 128,5, 126,9, 125,6, 124,6, 114,8, 112,8, 108,8, 102,3, 97,2, 94,3, 82,5, 78,6, 76,9, 75,9, 74,5, 73,5, 73,2, 72,8, 71,6, 70,5, 68,3, 63,9, 62,2, 42,5, 37,3, 35,4, 28,7, 28,3, 26,9, 26,4, 20,3, 19,6, 19,2, 18,7, 18,2, 17,6, 15,5, 14,6, 14,0, 11,4.

Ejemplo 3

65 Se obtuvo una muestra en bruto de tiacumicina B (15 g) por fermentación como un residuo aceitoso después de la

liberación de la resina como se describe en el Ejemplo 2. Ésta se disolvió en acetato de etilo (300 ml) a 35 °C y la disolución se agitó en un embudo de decantación con agua (300 ml) y se dejó sedimentar durante 1 minuto. Se añadió disolución acuosa saturada de cloruro sódico (100 ml) y la mezcla se dejó reposar durante otro 1 minuto. Se desecharon la fase inferior y cualquier sólido presente en la interfase y la fase superior se concentró dando un sólido marrón a presión reducida a 35 °C. La espuma resultante se sometió a cromatografía de líquidos de media presión de fase inversa usando un aparato Biotage 75L acoplado a un detector de UV/vis Isco UA-6 con los siguientes parámetros:

Columna: 1,2 kg, sílice KP-C18-HS de Biotage.

Equilibrio: 50:50:1, MeCN/H₂O/AcOH (6 l).

Carga: En metanol (20 ml) mediante módulo de inyección de muestras que contiene 25 g de sílice KP-C18-HS de Biotage.

Eluyente: 50:50:1, MeCN/H₂O/AcOH.

Flujo: 230 ml/min

Presión: Disolvente - 90 psi

Radial - 100 psi

Detector: Longitud de onda - 254 nm

Longitud de la trayectoria - 0,1 cm

Sensibilidad - 2

Velocidad de carta - 60 cm/h

Ruido del filtro - 5 s

Recogida de fracciones: Manual – la recogida empezó justo después de la inflexión entre el pico principal y el pico previo, la recogida terminó al 20 % de la altura del pico principal.

Acondicionamiento de la columna: 100 % de MeCN (4 l)

Se añadió disolución acuosa saturada de cloruro sódico (25 % del volumen de fracción) a la fracción recogida. La mezcla se agitó y se dejó que se separara en dos fases. Se eliminó la fase superior y se concentró a sequedad a presión reducida a 30 °C. El sólido resultante se disolvió en acetato de etilo (75 ml) y se lavó con agua (2 x 75 ml) para eliminar el cloruro sódico. La fase orgánica se concentró a presión reducida a 30 °C dando una espuma amarilla (recuperación: 4,56 g, 30 %; pureza ~93 %).

El material se combinó con varios otros lotes (total: 156,0 g, 90,8 % de pureza) y a éste se añadió isopropanol (1000 ml). La mezcla se sonicó con agitación a temperatura ambiente durante 20 min para producir una suspensión blanquecina. En este momento, el material se filtró y la torta de filtración se lavó con isopropanol (300 ml). El sólido se secó bajo alto vacío dando un polvo blanquecino (recuperación: 146,2 g, 94 %; pureza: 91,1 %) (Figura 4). Pf 156-160 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -8,4 (c 2,0, MeOH); EM *m/z* (ESI) 1079,7 (M + Na)⁺; Calcd para C₅₂H₇₄Cl₂O₁₈: C, 59,03; H, 7,05; Cl, 6,70. Hallado: C, 58,75; H, 7,04; Cl, 6,91.

La invención descrita ilustrativamente en el presente documento puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no específicamente desvelados en el presente documento. Así, por ejemplo, los términos “que comprende”, “que incluye”, “que contiene,” etc., deben leerse extensamente y sin limitación.

Reivindicaciones

1. Un procedimiento de producción de tiacumicina B que comprende:

5 cultivar un microorganismo en un medio nutritivo para acumular tiacumicina B en el medio nutritivo; y
aislar la tiacumicina B del medio nutritivo;
en el que el medio nutritivo comprende al menos una resina adsorbente que puede adsorber tiacumicina B.

10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio nutritivo comprende 0,5 %-15 % en peso de la al menos una resina adsorbente que puede adsorber la tiacumicina B.

15 3. El procedimiento según la reivindicación 1 que comprende cultivar un microorganismo que tiene la capacidad para producir tiacumicina B en un medio nutritivo que comprende al menos un adsorbente que puede adsorber tiacumicina B durante dicho cultivo, en el que dicho adsorbente está seleccionado del grupo que consiste en un gel de sílice de fase inversa, Amberlite® XAD16, XAD16HP, XAD2, XAD7HP, XAD1180, XAD1600, IRC50 y Duolite® XAD761 y acumular la tiacumicina B en el medio nutritivo.

20 4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho microorganismo es *Dactylosporangium aurantiacum* NRRL 18085.

25 5. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha tiacumicina B se aísla de dicho medio nutritivo usando técnicas seleccionadas del grupo que consiste en: tamizar y eliminar material no deseado eluyendo con al menos un disolvente o una mezcla de disolventes; extracción con al menos un disolvente o una mezcla de disolventes; cristalización; separación cromatográfica; cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC); MPLC; trituración; y extracción con salmuera saturada con al menos un disolvente o una mezcla de disolventes.

6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho microorganismo se cultiva a una temperatura de aproximadamente 25 °C a 35 °C y a un pH de aproximadamente 6,0 a 8,0.

30 7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio nutritivo comprende una o más fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, almidón, molasas, dextrinas, suero de la leche, glicerol, lípidos y harina de maíz.

35 8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio nutritivo se alimenta con una fuente de carbono adicional, según se necesite.

40 9. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio nutritivo comprende una o más fuentes de nitrógeno/orgánicas que pueden soportar el crecimiento de microorganismos seleccionadas del grupo que consiste en extracto bovino, sémola de soja, levadura completa, extracto de levadura, harina de soja, peptona, casaminoácido, polvo de pescado, extracto soluble de maíz, sales de amonio, caseína y aminoácidos.

10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el medio nutritivo comprende polvo de pescado.

45 11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio nutritivo comprende una o más sales inorgánicas que pueden soportar el crecimiento de microorganismos seleccionadas del grupo que consiste en K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y $CaCO_3$.

50 12. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el gel de sílice de fase inversa está seleccionado del grupo que consiste en KP-C18, KP-C 18-WP y KP-C18HS.

55

60

65

Figura 1

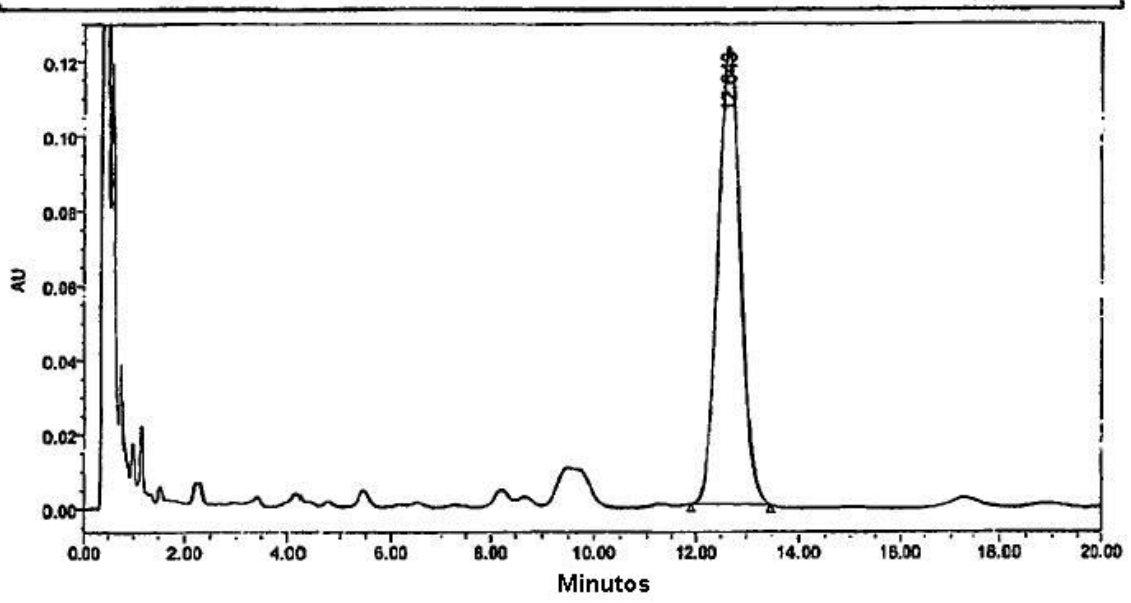


Figura 2

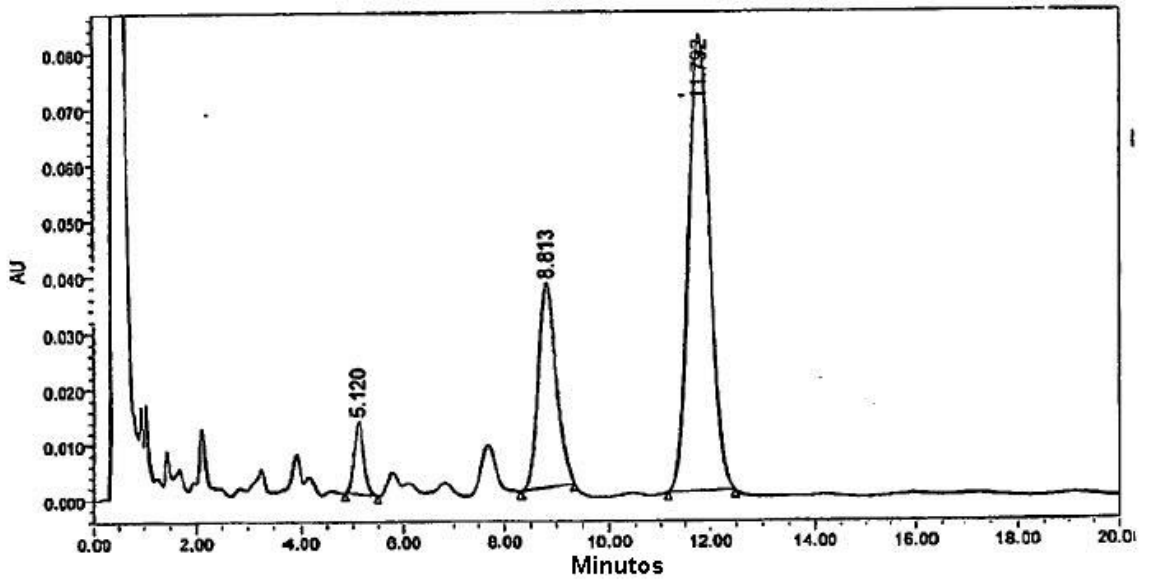


Figura 3

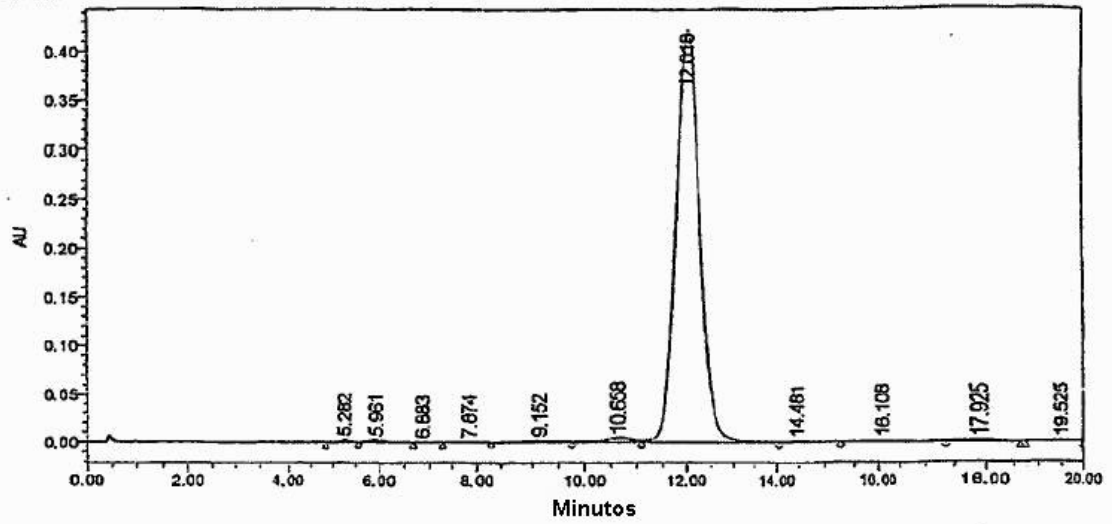


Figura 4

