

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 457**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2010 E 10707694 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2398817**

54 Título: **Procedimiento para purificar lipopéptidos**

30 Prioridad:

19.02.2009 US 153660 P

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

19.08.2015

73 Titular/es:

**XELLIA PHARMACEUTICALS APS (100.0%)
Dalslandsgade 11
2300 Copenhagen S, DK**

72 Inventor/es:

**MÅNSSON, MARTIN;
DALE, ELI KARIN;
HAUGE, SISSEL;
OVERBALLE-PETERSEN, CARSTEN;
HIRTH, KJERSTI AASTORP y
HANSEN, DENNIS BRIAN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 543 457 T3

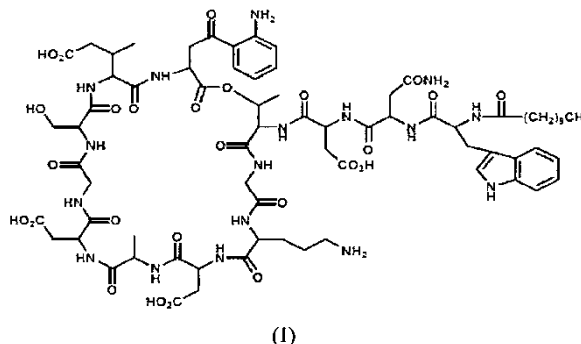
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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 para purificar lipopéptidos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de purificación para la purificación de daptomicina, representada por el nombre químico ϵ 1-lactona de *N*-decanoil-L-triptofil-D-asparaginil-L-aspartil-L-treonilglicil-L-ornitil-L-aspartil-D-alanil-L-aspartilglicil-D-seril-*treo*-3-metil-L-glutamil-3-antraniloil-L-alanina. La daptomicina se puede representar mediante la fórmula I:

15 **Antecedentes**

La daptomicina es un antibiótico lipopéptido con actividad frente a microorganismos grampositivos. Se produce mediante fermentación de *Streptomyces roseosporus* seguida de purificación del caldo de fermentación. El mecanismo de acción de la daptomicina consiste en que se une a las membranas bacterianas y provoca una rápida despolarización del potencial de membrana. Esta pérdida del potencial de membrana provoca una inhibición de las proteínas y una síntesis de ADN y ARN que conduce a la muerte celular bacteriana. La utilización de la daptomicina está aprobada para infecciones complicadas de la piel y sus estructuras (cSSSI), y para septicemias por *Staphylococcus aureus* (bacteriemia). La daptomicina está comercializada por Cubist Pharmaceuticals con el nombre comercial Cubicin®

La daptomicina fue descrita por primera vez a mediados de la década de los ochenta en diversas patentes y publicaciones periódicas: en la patente US nº 4.537.717 y en Debono M. y otros, Journal of Antibiotics, 1986, vol. XL, n.º 6, 761-777. Desde entonces se han publicado diversos trabajos dedicados a procesos de fermentación y procesos de purificación mejorados.

En la patente US nº 4.885.243 se describe un procedimiento de fermentación mejorado para la fabricación de daptomicina. Dicho procedimiento describe el suministro de ácido decanoico o un éster de dicho ácido graso, o sales de los mismos, a un caldo de fermentación de *Streptomyces roseosporus*. Durante la fermentación, el ácido decanoico se inserta en la molécula, formándose la cadena lateral de decanoico de la daptomicina.

En la técnica anterior se han descrito diversos procedimientos de purificación para purificar la daptomicina. La patente US nº 4.874.843 describe un procedimiento para purificar daptomicina en el que el caldo de fermentación se filtra y se introduce en una columna cromatográfica que contiene resina HP-20. Tras la elución, la daptomicina semipurificada se hace pasar a través de una columna que contiene resina HP-20ss y se introduce a continuación en otra columna que contiene resina HP-20. Además de estas etapas, se describen intentos de aumentar la pureza con diversas etapas cromatográficas adicionales, sin ningún éxito. La patente '843 da a conocer además que, mediante la utilización de una resina no funcional y una solución acuosa, e incluyendo una etapa en la que el agua se elimina físicamente y luego se rehumedece la resina con un disolvente orgánico polar, la pureza del producto se aumenta del 80% al 93%. Este procedimiento consume mucho tiempo y no resulta muy adecuado para la producción industrial.

El documento US RE 39071 describe las dos impurezas principales encontradas en la producción de daptomicina, la anhidro-daptomicina y el isómero beta de la daptomicina. El documento US RE 39071 establece, además, que mediante la forma de realización del procedimiento descrito en los ejemplos 1-3 se obtiene un producto de daptomicina que comprende menos del 6% de las dos impurezas mencionadas. El ejemplo 3 describe un procedimiento en el que la daptomicina de calidad intermedia se purifica adicionalmente en un procedimiento que comprende cuatro etapas cromatográficas y etapas adicionales de desalación, concentración y liofilización. En las etapas cromatográficas, se utiliza acetonitrilo para el lavado y la elución y, además, hay que llevar a cabo el método con soluciones refrigeradas y en un entorno refrigerado.

La patente US nº 6.696.412 da a conocer un procedimiento para purificar daptomicina mediante la utilización de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, en la que se utiliza un tampón modificado para la elución, y una etapa de microfiltración, en la que la daptomicina forma micelas. En esta patente se describen diversos métodos que son una combinación de las dos etapas mencionadas anteriormente junto con otras etapas de purificación conocidas por el experto en la materia. El producto de daptomicina altamente purificado se define en dicha patente como daptomicina con un nivel de pureza del 95-97%.

El documento US 2007/191280 da a conocer, entre otras cosas, un procedimiento para la preparación de daptomicina.

También se hace referencia a Gu y otros, Journal Natural Products, vol. 70, n.º 2, febrero de 2007, p. 233-24, que se refiere a la caracterización estructural de los análogos de la daptomicina producidos por una cepa recombinante de *Streptomyces roseosporus*.

15 **Características de la invención**

La presente invención da a conocer un procedimiento de purificación mejorado para la purificación de daptomicina, que da lugar a un producto con una pureza de por lo menos 95%. El procedimiento descrito es más simple que los descritos en la técnica anterior y, tal como se describe a continuación, hace superflua la utilización de tampones modificados y evita el uso de acetonitrilo, lo que supone un beneficio para el medio ambiente.

El procedimiento según la presente invención utiliza las etapas de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de fase inversa. Además, se pueden llevar a cabo las etapas normales de filtración y la liofilización del producto final.

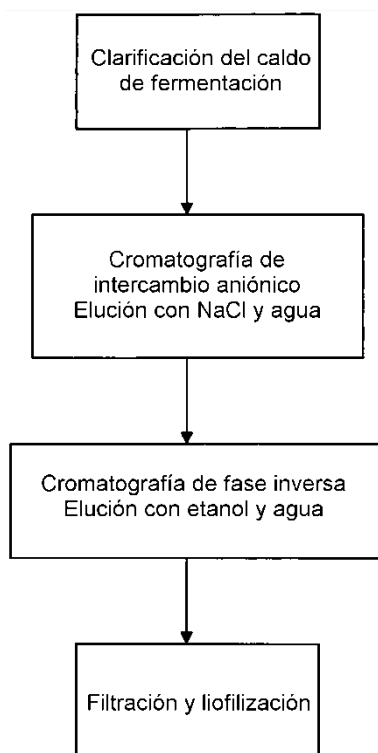
En particular, se da a conocer un procedimiento para la purificación de daptomicina, que comprende las siguientes etapas: a) carga de una solución que comprende daptomicina parcialmente purificada en una columna de cromatografía de intercambio aniónico; b) carga de la solución de la etapa a) en una columna de cromatografía de fase inversa; c) opcionalmente, carga de la solución de la etapa b) en otra columna de cromatografía de fase inversa, por lo menos una vez; en el que el tampón de elución de a) es una solución de sal monovalente y el tampón de elución de b) es alcohol acuoso.

La presente invención da a conocer, además, un procedimiento para la purificación de daptomicina, que comprende las siguientes etapas: a) someter un caldo de fermentación, que comprende daptomicina, a una o varias etapas de clarificación; b) carga de la solución de la etapa a) en una columna de cromatografía de intercambio aniónico; c) carga de la solución de la etapa b) en una columna de cromatografía de fase inversa; d) opcionalmente, carga de la solución de la etapa c) en otra columna de cromatografía de fase inversa, por lo menos una vez; e) sometimiento de la solución resultante de la etapa d) a una o varias etapas de filtración; f) sometimiento del filtrado de d) a liofilización; obteniéndose un polvo purificado de daptomicina; en el que el tampón de elución de la etapa c) y, opcionalmente, de la etapa d), es alcohol acuoso.

Según una forma de realización, la solución salina monovalente utilizada como tampón de elución en las etapas cromatográficas de intercambio aniónico es una solución de cloruro de sodio en agua.

Preferentemente, el alcohol acuoso de la etapa b) es etanol acuoso. Según una forma de realización de la presente invención, la daptomicina se eluye de la etapa cromatográfica de fase inversa utilizando un tampón de elución que comprende etanol al 5-80%.

La presente invención se puede ilustrar mediante las etapas que se indican en el esquema de reacción 1.



Esquema de reacción 1

La presente invención da lugar a un producto de daptomicina con una pureza total del 95% o mayor. La cantidad de anhidro-daptomicina varía entre el 0,5% y el 1,5%, y la cantidad del isómero beta es inferior a 0,5%.

5 El procedimiento según la presente invención da a conocer un procedimiento de purificación que es más simple que los procedimientos conocidos en la técnica con respecto a los tampones y etapas utilizados, y evita la utilización de disolventes tóxicos para el medio ambiente. Además, da lugar a una separación muy buena y a niveles bajos de las dos impurezas más importantes, la anhidro-daptomicina y el isómero beta de la daptomicina. El procedimiento según
10 la presente invención proporciona un procedimiento de purificación simple, a la vez que proporciona un producto que es por lo menos tan puro como los productos descritos en la técnica anterior.

Descripción detallada de la invención

15 El material de partida del procedimiento según la presente invención puede obtenerse por el método descrito en la patente US nº 4.885.243, en el que el ácido graso que debe proporcionarse es el ácido decanoico.

Según la presente invención, la daptomicina se purifica llevando a cabo una primera etapa de cromatografía aniónica, seguida de una segunda etapa de cromatografía de fase inversa.

20 El caldo de fermentación utilizado como material de partida de la presente invención se puede pretratar antes de dichas etapas cromatográficas a fin de eliminar partículas grandes y biomasa. Como método de pretratamiento, el caldo de fermentación utilizado como material de partida según la presente invención puede hacerse pasar por una o más etapas de clarificación. El experto en la materia conoce diversas etapas útiles de clarificación. Entre los
25 ejemplos no limitativos de etapas de clarificación útiles para pretratar el caldo de fermentación según la presente invención, se incluyen la ósmosis inversa, la centrifugación, la ultrafiltración, la microfiltración, la nanofiltración y la diafiltración. Incluso es posible aplicar una etapa de intercambio aniónico con una resina altamente porosa para la clarificación.

30 Debe apreciarse que pueden utilizarse diversas combinaciones de métodos de clarificación bien conocidos por el experto en la materia según la presente invención a fin de pretratar el caldo de fermentación antes de la purificación adicional de la daptomicina por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de fase inversa.

35 El caldo de fermentación clarificado se introduce en una columna de intercambio aniónico. Según la presente invención, pueden utilizarse resinas de intercambio aniónico fuertes, tales como Capto Q, Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, Source 15 Q, Source 30 Q o Macrorep High Q, o equivalentes de las mismas, así como resinas de intercambio aniónico débiles, tales como las resinas comercialmente disponibles DEAE Sepharose FF, ANX

Sepharose FF o Source 15 Q. La resina preferida es una resina de agarosa altamente reticulada con dextrano como extensor de superficie, tal como la resina comercialmente disponible Capto Q. Tras cargar la solución clarificada, la columna se lava con agua.

5 El tampón de elución de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico a) del presente procedimiento es una solución salina monovalente. Dicha sal monovalente puede ser, por ejemplo, una sal de cloruro, tal como NaCl o KCl. También pueden utilizarse otras sales monovalentes, tales como sales monovalentes de acetato, por ejemplo acetato de sodio.

10 Según una forma de realización, la daptomicina se puede eluir de la columna con un gradiente de NaCl en agua, variando dicho gradiente desde NaCl 0,1 M a NaCl 1,5 M, preferentemente desde NaCl 0,2 M a NaCl 1,0 M.

15 A continuación, la daptomicina semipurificada se introduce en una columna de fase inversa. La resina de fase inversa preferente es una resina porosa de un lado a base de poliestireno y divinilbenceno, tal como las resinas comercialmente disponibles Source PRC 30, SP20ss, HP20ss, o tipos equivalentes de resinas a base de poliestireno. Tras aplicar la solución de daptomicina a la columna, la misma se lava con agua con un 15% de alcohol, tal como etanol al 15%.

20 La daptomicina se puede eluir con un alcohol acuoso, por ejemplo un alcohol alquílico C1-C3, tal como metanol, etanol o isopropanol. Según una forma de realización de la presente invención, la daptomicina se eluye en una columna de fase inversa utilizando etanol como disolvente de elución.

25 Según una forma de realización, la daptomicina se eluye de la columna de fase inversa mediante un gradiente de etanol en agua. Dicho gradiente varía del 5% al 80% de etanol, y preferentemente del 40% al 70% de etanol.

30 En una forma de realización preferida de la presente invención, se lleva a cabo una etapa adicional de cromatografía de fase inversa. Una forma de realización preferida de la presente invención consiste en llevar a cabo las dos eluciones en columna de fase inversa a diferentes pH a fin de mejorar la pureza del producto. En una forma de realización preferida, la primera columna se hace funcionar a pH neutro y la segunda a pH ácido. No es esencial el orden en el que se llevan las dos etapas de cromatografía de fase inversa con respecto al pH. La primera columna se puede hacer funcionar a pH ácido y la segunda a pH neutro, o viceversa.

35 Según una forma de realización de la presente invención, la primera columna de cromatografía de fase inversa se eluye a pH 6,5-8,5, preferentemente a pH 7,5-8,0. Según otra forma de realización de la presente invención, la segunda columna de cromatografía de fase inversa se eluye a pH 2,5-3,5, preferentemente a pH 3,0-3,1.

40 La columna que se puede utilizar en la etapa de cromatografía de fase inversa en el método según la presente invención puede ser una resina a base de estireno, tal como la resina comercialmente disponible Source 30RPC. También se pueden utilizar otras resinas de cromatografía de fase inversa equivalentes, tales como SP20ss, HP20ss o tipos de resina equivalentes a base de poliestireno conocidas por el experto en la materia.

A continuación, la daptomicina purificada se filtra y se liofiliza en condiciones estándar. La daptomicina purificada final presenta una pureza de por lo menos 95%.

45 **Parte experimental**

Ejemplo 1

50 Tras la clarificación, la solución de daptomicina parcialmente purificada se cargó en una columna de intercambio aniónico. El material de partida se clarificó por diafiltración.

Purificación por cromatografía de intercambio iónico:

55 La daptomicina diafiltrada se cargó en una columna de intercambio aniónico con resina Capto Q.

Los tampones se prepararon en tanques separados con la siguiente composición:

Tampón 1: agua desionizada

60 Tampón 2: NaCl 0,2 M

Tampón 3: NaCl 0,4 M

65 Tampón 4: NaCl 1,0 M

La solución de partida se ajustó a pH 6-8 con NaOH diluido antes de la carga. La daptomicina se unió a la resina a

una capacidad máxima de 20 g/l de resina. Tras la unión a la resina, las impurezas derivadas de la fermentación se lavaron inicialmente con el tampón 1 y, a continuación, con el tampón 2.

5 La elución y la recuperación de la daptomicina se llevaron a cabo de forma isocrática con el tampón 3. Tras la elución, la columna se lavó con el tampón 4 a fin de eliminar cualquier resto de daptomicina o de impurezas de unión fuerte.

La daptomicina se recogió considerando un volumen de aproximadamente 5 - 10 BV.

10 Cromatografía de fase inversa I (RPC I):

La daptomicina se purificó por HPLC utilizando una resina Source 30RPC a base de estireno.

Los tampones para esta etapa se prepararon en tanques separados:

15 Tampón 1: agua desionizada

Tampón 2: Etanol al 12-16%

20 Tampón 3: Etanol al 55-65%

La daptomicina se purificó a pH neutro (pH 7,5-8,0). Inicialmente, la columna se equilibró con tampón 1. La daptomicina se cargó en la columna (grado máximo de carga < 30 g/l de resina) antes de lavar las impurezas menos hidrófobas (principalmente productos de degradación) utilizando el tampón 2.

25 A continuación, la daptomicina se recuperó por elución en gradiente de etanol desde el 15% al 60% (mezcla en gradiente de tampón 1 a 2) durante 12-16 BV. La daptomicina se recogió en función de la señal de UV.

30 Cromatografía de fase inversa II:

Teniendo en cuenta la pureza, se recogieron y agruparon fracciones de la primera etapa de cromatografía de fase inversa (RPC I) y el pH se ajustó a 3,0-3,1 con ácido acético con agitación rápida a fin de evitar la precipitación de la daptomicina en el tanque.

35 Los tampones para esta etapa se prepararon en tanques separados:

Tampón 1: Agua desionizada, el pH se ajustó a 3,0-3,1 con ácido acético

40 Tampón 2: Etanol al 30-35%, el pH se ajustó a 3,0-3,1 con ácido acético

Tampón 3: Etanol al 65-75%, el pH se ajustó a 3,0-3,1 con ácido acético

45 La solución de daptomicina con el pH ajustado se cargó en la columna (grado máximo de carga < 30 g/l de resina) y las impurezas menos hidrófobas se lavaron con el tampón 1. La elución y la recuperación de la daptomicina se llevaron a cabo haciendo pasar un gradiente de etanol desde el 35% al 70% mezclando los tampones 2 y 3 a lo largo de 8-12 BV.

La daptomicina se recogió en función de la señal de UV.

50 **Ejemplo 2**

Para clarificar el caldo de fermentación se utilizaron varios métodos de clarificación. En primer lugar, el caldo de fermentación se centrifugó para eliminar partículas grandes y biomasa. El pH en el caldo de fermentación era de 6,4 y el material seco (MS) representaba aproximadamente el 6-7%. Tras la centrifugación, el sobrenadante contenía únicamente el 3% de MS. A continuación, el sobrenadante se prefiltró a través de un filtro de 25-100 µm a fin de eliminar las partículas más grandes de 25-100 µm.

60 A continuación, la solución centrifugada y prefiltrada se sometió a ultrafiltración a través de un filtro Pellicon 2.500 kD (Millipore) para eliminar las moléculas grandes. Tras dicha ultrafiltración, la solución se concentró por nanofiltración. Se utilizó un filtro DL-series, 350D (GE Osmonics). El retenido contenía 5 g/l de daptomicina y tenía un pH de 6.

65 El retenido se purificó adicionalmente con una columna de cromatografía de intercambio aniónico según la presente invención. Se utilizó una resina Capto Q (90 µm), de GE Healthcare. El pH del retenido se ajustó a 6 con NaOH, si era necesario, antes de la carga en la columna. Tras cargar el retenido en la columna, ésta se lavó con agua y la daptomicina se eluyó con un gradiente escalonado de NaCl. Las soluciones de elución contenían NaCl 0,2 M, 0,4 M y 1,0 M en agua. Las fracciones agrupadas de la columna de intercambio aniónico contenían aproximadamente 2,5

g/l de daptomicina.

5 A continuación, las fracciones agrupadas de la columna de intercambio aniónico se cargaron en la primera cromatografía de fase inversa (RPC I). Se utilizó una resina Source 30RPC (30 µm), de GE Healthcare. Tras la carga, la columna se lavó con agua y se eluyó con un gradiente de etanol al 20-50% a pH 7-8. El grupo de fracciones de esta etapa comprendía aproximadamente 6 g/l de daptomicina.

10 Este grupo de fracciones se cargó de nuevo en una segunda columna de fase inversa con la misma resina. Tras cargar la solución de daptomicina procedente de la columna de fase inversa anterior, la columna se lavó con agua y la daptomicina se eluyó con un gradiente de etanol al 20-50% a pH 3,0. El grupo de fracciones de esta etapa comprendía aproximadamente 8 g/l de daptomicina.

15 A continuación, la solución de daptomicina se sometió a una etapa de nanofiltración con una membrana DL-series, 350D, de GE Osmonics.

Tras la nanofiltración, la solución de daptomicina se liofilizó en condiciones estándar.

La pureza del producto final está comprendida dentro del intervalo 95-97%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para purificar daptomicina que comprende las etapas siguientes
 - 5 a) cargar una solución que comprende daptomicina purificada parcialmente sobre una columna de cromatografía de intercambio aniónico;
 - b) cargar la solución de la etapa a) sobre una columna de cromatografía de fase inversa;
 - 10 c) cargar opcionalmente la solución de la etapa b) sobre otra columna de cromatografía de fase inversa por lo menos una vez;

en el que el tampón de elución de a) es una solución de sal monovalente y el tampón de elución de b) es alcohol acuoso.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se llevan a cabo una o varias etapas de clarificación antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico a).
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1-2, en el que el producto de la etapa de cromatografía de fase inversa b) se purifica además mediante una o varias etapas de filtración.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el producto de la fase inversa es seguido además por una etapa de liofilización.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la solución de elución en a) es NaCl.
6. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el tampón de elución es NaCl 0,1-1,5 M.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tampón de elución en b) es etanol acuoso.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el tampón de elución es etanol al 5-80%.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo utilizando una resina de agarosa altamente reticulada con un extensor de superficie dextrano.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de cromatografía de fase inversa se lleva a cabo utilizando una columna de resina a base de estireno.
- 40 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa b) se repite una vez.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la primera columna de cromatografía de fase inversa se eluye a un pH de 6,5-8,5.
- 45 13. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la segunda columna de cromatografía de fase inversa se eluye a un pH de 2,5-3,5.
14. Procedimiento para purificar daptomicina que contiene las etapas siguientes
 - 50 a) someter un caldo de fermentación que comprende daptomicina a una o varias etapas de clarificación;
 - b) cargar la solución de la etapa a) sobre una columna de cromatografía de intercambio aniónico;
 - c) cargar la solución de la etapa b) sobre una columna de cromatografía de fase inversa;
 - 55 d) cargar opcionalmente la solución de la etapa c) sobre otra columna de cromatografía de fase inversa por lo menos una vez;
 - e) someter la solución resultante de la etapa d) a una o varias etapas de filtración;
 - 60 f) someter el filtrado de d) a liofilización; dando como resultado un polvo purificado de daptomicina;

en el que el tampón de elución en la etapa c) y opcionalmente en la etapa d), es alcohol acuoso.
- 65 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que las etapas de clarificación en a) es una o una combinación de las técnicas siguientes: ósmosis inversa, centrifugación, filtración, ultrafiltración, nanofiltración, cromatografía de intercambio aniónico.

16. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la solución de elución de b) es NaCl.
- 5 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el tampón de elución es NaCl 0,1-1,5 M.
18. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el tampón de elución de c) es etanol acuoso.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que el tampón de elución es etanol al 5-80%.
- 10 20. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la etapa c) se repite una vez.