

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 581**

51 Int. Cl.:

C07K 9/00 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

A61K 38/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12784004 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2776452**

54 Título: **Procesos de purificación de teicoplanina**

30 Prioridad:

11.11.2011 EP 11188759

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

05.02.2016

73 Titular/es:

**LEK PHARMACEUTICALS D.D. (100.0%)
Verovskova 57
1526 Ljubljana, SI**

72 Inventor/es:

**ANDRENSEK, SAMO y
SENICA, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 558 581 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

Procesos de purificación de teicoplanina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la tecnología química, más específicamente a una manera novedosa y efectiva de purificación del antibiótico teicoplanina.

Antecedentes de la invención

10 Teicoplanina es un término usado comúnmente para un grupo de antibióticos de glicopéptido a partir de la familia de vancomicina-ristocetina, producida por un microorganismo fúngico tal como, por ejemplo, *Actinoplanes teichomyceticus*. Teicoplanina se divulga por primera vez en J. Antibiotics 31 (1978), p. 170-177 como una mezcla de tres factores denominados teicomocina A₁, A₂ y A₃. El factor A₂, llamado más tarde teicoplanina A₂, fue identificado como el componente principal, el cual se aisló mediante cromatografía de columna sobre Sephadex LH-20™. Teicoplanina A₂ fue luego reconocida como una mezcla de cinco moléculas (J. Antibiotics 37 (1984), p. 615-620), las cuales pronto se dilucidaron como estructuras que difieren en la naturaleza de la cadena lateral aciloalifática (J. Am. Chem. Soc. 106 (1984), 4895-4902). Una representación de compuesto, ejemplificada y típica, de teicoplanina se ilustra en la Fig. 1 (R puede significar diversos residuos de alquilo de C₁₀-C₁₁). Estos cinco compuestos A₂ constituyen la teicoplanina conjuntamente con otro compuesto principal (A₃) y algunos otros compuestos secundarios (por ejemplo R_S-1 a R_S-4).

20 La mezcla de estos componentes en una variación de proporción limitada está disponible en el mercado como Targocid® para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram-positivas. Además de la vancomicina y de los antibióticos similares a vancomicina, aún sigue siendo un compuesto activo clave contra microorganismos altamente resistentes.

25 Se ha hecho una cantidad de esfuerzos para separar teicoplanina de un caldo de cultivo de los microorganismos y para purificar teicoplanina para lograr un grado farmacéutico. De acuerdo con la primera publicación en US 4239751, un caldo de cultivo se divide en una torta micelial y en un filtrado. Después del tratamiento de la torta, se extrajeron ambas fracciones con butanol a un pH ácido y el producto de fermentación crudo se precipitó después de retirar parcialmente el solvente. Los precipitados se recogieron, se purificaron en una columna de Sephadex LH20 y sobre una resina de intercambio iónico ácida, tal como Amberlite IR-120 y Dowex 50, con aislamiento final del producto mediante precipitación a 4°C. No obstante, este proceso es un experimento de laboratorio para aislamiento, el cual tiene varias desventajas para el uso industrial en vista de su complejidad, calidad, costes y rendimientos.

30 A fin de mejorar los rendimientos de fermentación en tal producción auto-inhibida de teicoplanina, se intentó retirar continuamente el producto adicionando solventes orgánicos miscibles con agua, tales como acetona, n-propanol, y acetonitrilo (patente coreana no. 367890), o adicionando una resina de intercambio iónico muy ácida, tal como Dow XFS-43278.00 y Diaion SK-1 02 (patente coreana no. 118034) a un caldo de cultivo. Pero tales procesos todavía necesitan grandes volúmenes de solventes orgánicos para extraer teicoplanina provocando problemas de manejo y contaminación ambiental.

35 La solicitud de patente estadounidense 4,845,194 reporta un proceso para purificación de teicoplanina que involucra una técnica de intercambio catiónico antes del ajuste del pH. Teicoplanina es eluida a partir de la resina de intercambio catiónico usando una solución que tiene un valor de pH desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 12.

40 Un progreso adicional en el aislamiento de teicoplanina fue hecho mediante el descubrimiento del enlace eficiente de teicoplanina con resinas hidrófobas, divulgadas por primera vez en la EP 0241758, usando una resina de poliamida especial y mejorando aún más la purificación mediante un proceso de extracción de teicoplanina a partir de *micelio* a un pH alcalino como una simplificación de los procesos primarios divulgados (EP 0479086). Sin embargo, la pureza de teicoplanina no fue superior a 85 % y el descoloramiento fue insuficiente.

45 La introducción de resinas hidrófobas, preferiblemente aplicadas como una columna antes que en un tratamiento de suspensión, representó otro progreso. La publicación J. Biochem. 275 (2000), p. 6201-6206 describe el uso de una resina hidrófoba comercial Dianion HP2 MGL™ con elución adicional usando solución de NaOH. Sin embargo, la estrategia requería la neutralización continua de la solución de elución a fin de impedir la epimerización del producto sensible en el medio alcalino. Incluso en compañía de otras estrategias especiales a fin de obtener teicoplanina pura, en vista de una pureza de sólo 50 a 60 % (p/p), este proceso de laboratorio es adecuado más bien para propósitos distintos del uso como ingrediente farmacéutico.

50 La patente coreana 321304 divulga una resina de adsorción neutra y un paso de cromatografía de afinidad con inmovilización en lectina, usando resinas seleccionadas del grupo que consiste en Amberlite XAD 16, Diaion HP 20, gel de sílice y carbón activado. Sin embargo, en caso que el caldo de cultivo filtrado, extraído de una solución

básica, se adsorba a una resina, tal como Diaion HP 20, se pierde una cantidad sustancial de teicoplanina en el paso de adsorción y la pureza de teicoplanina eluída mediante un gradiente de concentración de metanol es muy baja. Además, es necesario retirar metanol a fin de aplicar la solución a una resina inmovilizada con lectina. Además, no es deseable aplicar la estrategia en producción a larga escala debido al coste de las resinas inmovilizadas con lectina. De acuerdo con la patente coreana 2003/017067, teicoplanina de un caldo de cultivo es adsorbida a una resina porosa de adsorción, la resina porosa de adsorción se lava con ácido clorhídrico diluido y la teicoplanina se desorbe de la resina de adsorción usando una solución mezclada de agua y acetona. La solución de elución que contiene teicoplanina se concentra mediante destilación al vacío, se trata con carbón activado y se somete a un proceso de precipitación; de esta manera se purifica la teicoplanina. Una vez más, el proceso es insuficiente para escalamiento debido a la adsorción irreversible de teicoplanina a la resina, lo cual reduce el rendimiento, y debido al uso de grandes cantidades de solvente. Por otra parte, es difícil de purificar teicoplanina a 95 % en área o más empleando solamente un proceso único que utilice resinas porosas de adsorción.

Como alternativa, algunos otros estudios han incluido resinas de fase inversa para separar y purificar teicoplanina del caldo de cultivo. Por ejemplo, un proceso publicado en *Chromatographia* 24 (1987) p. 295-301 propuso purificar teicoplanina usando una resina Lichrosorb™, pero el uso de grandes cantidades de acetonitrilo y el intercambio frecuente de resina puede aumentar considerablemente los costes de producción. Otras dos alternativas llevaron a cabo los métodos cromatográficos sobre resinas de fase inversa mediante maneras adicionales de purificación. Por ejemplo, la solicitud de patente coreana 2003/092504 describe la extracción de productos de fermentación con acetona acuosa, seguida de cromatografía sobre gel de sílice recubierta con silano, adsorción sobre carbón activado en el paso de aislamiento y ultrafiltración. US 7405267 describe un proceso para purificar teicoplanina de un caldo de cultivo que incluye un paso primario de purificación en el que se usa un absorbente sintético, un paso secundario de purificación en el que se usa una resina de intercambio iónico, una resina catalítica o una resina quelato, un paso terciario de purificación en el que se usa una resina de fase inversa y un paso final de liofilización. Por consiguiente, el uso de la fase inversa más costosa no puede impedir el uso de adsorbentes adicionales, de modo que no justifica los costes adicionales.

En resumen, todos los métodos descritos antes ofrecen solamente soluciones parciales que no resuelven la complejidad del aislamiento y de la purificación de teicoplanina. La EP 1735337B1 (WO 2005/116059) ha ofrecido la solución más completa para aislamiento y purificación de teicoplanina hasta ahora. Se devolvió al método de adsorción sobre resinas hidrófobas, describiendo los siguientes pasos claves de purificación y aislamiento de teicoplanina:

- separación de micelio de teicoplanina disuelta en un filtrado,
- adsorción de teicoplanina purificada aproximadamente en resinas porosas de adsorción desde un medio acuoso al 10-40% de alcoholes de C₁-C₄ o de acetonas de C₃-C₄ de pH 6.5 a 7.5, seguida por elución con alcoholes de C₁-C₄ acuosos al 40 a 90 % con control cuidadoso de la concentración de sal,
- adsorción de impurezas en carbón activado usando solución acuosa diluida de alcohol, calculada aproximadamente a partir de metanol acuoso con máximo 30 %
- desalinización mediante adsorción en resinas porosas, seguida de elución con alcoholes de C₁-C₄ acuosos al 40 a 90 %
- ultrafiltración sobre membranas con tamaño de poro desde 3 - 100 kDa a 0 - 4 kPa de presión usando soluciones alcohólicas acuosas diluidas de teicoplanina purificada en concentración menor a 20 %
- precipitación de teicoplanina.

Aunque este proceso puede representar la mejor opción bibliográfica para aislar teicoplanina, su reproducción presenta de manera sorprendente desventajas considerables:

- la desorción desde la resinas porosas no es completa (máximo 87.6 %);
- la disminución en los tamaños de poro en la ultrafiltración reduce sorprendentemente el paso de teicoplanina a través de las membranas, aunque los poros son considerablemente mayores que el radio de las moléculas de teicoplanina, mientras que el uso de poros más grandes reducen la selectividad, de modo que se requieren varios ciclos de ultrafiltración, lo cual incrementa la cantidad media de solvente a volúmenes enormes;
- la remoción de impurezas coloreadas sigue siendo el problema principal debido a que los colores no se retiran completamente ni en el paso de adsorción sobre la resinas ni durante la descoloración sobre carbón y ultrafiltración.

Una publicación posterior, CN 101423547A, representó una revisión de dicho procedimiento completo ajustando una solución de teicoplanina a 2,5 hasta 6 siguiendo los siguientes pasos:

- separación de micelio de la teicoplanina disuelta en un filtrado,
- adsorción de la teicoplanina aproximadamente purificada en resinas porosas de adsorción, seguida de elución con una composición ligeramente ácida (valor de pH = 3) de solvente orgánico miscible con agua y agua
- adsorción de impurezas en carbón activado

5 - utilización de nanofiltración en ejemplos prácticos, opcionalmente la mencionada ultrafiltración.

Los beneficios de métodos de estos pasos previos no están claramente identificados. La ultrafiltración como una alternativa a la nanofiltración no es clara específicamente porque la masa molecular de teicoplanina se encuentra entre cortes promedio de nanomembranas y ultra membranas, de modo que su función no debe ser la misma.

10 Por lo tanto, todavía existe una necesidad de un procedimiento completo de aislamiento de teicoplanina con grado farmacéutico.

Resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: ilustra una representación de compuesto ejemplificada y típica de teicoplanina.

15 Figura 2: muestra esquemáticamente una des-aminación típica de teicoplanina.

Figura 3: proporciona una visión esquemática de un proceso ejemplar según la invención.

Figura 4: muestra la porción de teicoplanina adsorbida como una proporción entre la concentración en un momento del tiempo dado y la concentración inicial.

20 Figura 5: Desorción de teicoplanina e impurezas relacionadas de la resina adsorbente Amberlite XAD16™ con mezclas neutras de agua-metanol: la dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresadas como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol se muestra en el diagrama como un resultado de dos conjuntos de experimentos.

25 Figura 6: Desorción de teicoplanina y sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD1600™ con mezclas neutras de agua-metanol: la dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (circles) y la parte de las impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol se muestra en el diagrama como un resultado de dos conjuntos de experimentos.

30 Figura 7: Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD1180™ con mezclas neutras de agua-metanol: la dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol se muestra en el diagrama.

35 Figura 8: Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD16™ con mezclas ácidas de agua-metanol: La dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol a pH diferente del eluyente (pH = 2 -línea llena, pH = 3 -línea sombreada, pH = 4 -línea punteada) se muestra en el diagrama.

40 Figura 9: Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD1600™ con mezclas ácidas de agua-metanol: la dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados) de la concentración de metanol a pH diferente del eluyente (pH = 2 - línea llena, pH = 3 - línea sombreada, pH = 4 - línea punteada) se muestra en el diagrama.

45 Figura 10: Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD1180™ con mezclas ácidas de agua-metanol: la dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol a pH diferente del eluyente (pH = 2 - línea llena, pH = 3 - línea sombreada, pH = 4 - línea punteada) se muestra en el diagrama.

Figura 11: descoloración de solución de teicoplanina con carbón activado en mezclas de agua-metanol: rendimiento (círculos) y reducción de absorbancia relativa (cuadrados) en dependencia de la concentración de metanol se muestran en el diagrama.

5 Figura 12: Descoloración de solución de teicoplanina con carbón activado en varias cargas: rendimiento (círculos) y reducción de absorbancia relativa (cuadrados), en dependencia de diversas cargas de carbón, expresados como una relación p/p a teicoplanina, se muestran en el diagrama.

Figura 13: permeabilidad de teicoplanina a través de membranas de ultrafiltración en diferentes mezclas metanol/agua: muestras del material permeado del material concentrado se tomaron se analizaron mediante HPLC.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se describe ahora con mayor detalle mediante realizaciones preferidas y ejemplos, los cuales se presentan, no obstante, solamente con un propósito ilustrativo y no deben entenderse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso económico para aislar teicoplanina de un cultivo de fermentación de un microorganismo fúngico que produce teicoplanina tal como, por ejemplo, *Actinoplanes teichomyceticus* en un grado para aplicación farmacéutica con remoción sustancial de colores.

20 El término "teicoplanina", tal como se usa en el contexto de la invención, se refiere a un antibiótico de glicopéptido que consiste en una mezcla de compuestos o se refiere a los componentes individuales de dicha mezcla. Los componentes individuales de la mezcla comprenden de manera típica cinco componentes principales (A₂-1, A₂-2, A₂-3, A₂-4, A₂-5), un núcleo de glicopéptido A₃-1 y componentes secundarios tales como RS-1, RS-2, RS-3 y RS-4. Se hace referencia explícita a la descripción de los antecedentes de la invención, tal como fueron citados en la presente. La proporción de contenido de los componentes individuales puede no ser constante y puede variar de acuerdo con la cepa utilizada, las condiciones de cultivo o el proceso de purificación aplicado.

25 La fermentación de teicoplanina produce un caldo coloreado de marrón intenso a casi negro, el cual puede descolorarse gradualmente mediante un procedimiento tecnológico seleccionado, por adsorción y métodos cromatográficos conocidos por el experto en la materia, a fin de obtener un producto final que está todavía considerablemente coloreado con un tono amarillo o cercano al marrón, el cual puede oscurecerse adicionalmente durante el almacenamiento. Hemos encontrado de manera sorprendente que las impurezas coloreadas pertenecen a al menos tres grupos fisicoquímicos que no pueden retirarse mediante solamente una operación técnica. Las impurezas críticas pueden categorizarse en los siguientes grupos.

30 Un grupo representa impurezas coloreadas con alto peso molecular las cuales pueden retirarse mediante métodos de separación adecuados para grandes moléculas, tales como adsorción sobre resinas o filtración con gel. Estas pueden comprender residuos macromoleculares de estructura celular.

35 Otro grupo representa impurezas de bajo peso molecular, probablemente menores a 1000 Da, de baja polaridad, lo cual también origina componentes de célula no específicos que comprenden moléculas con partes de lípido unidas mediante enlace doble.

40 El tercer grupo representa productos de degradación íntimamente relacionados, caracterizados en la publicación J. Antibiotics 49 (1996), p. 644-650, los cuales se producen supuestamente mediante aminólisis oxidativa. El reemplazo del grupo amino por un grupo ceto causa un doble efecto: la parte afectada de la molécula se vuelve una estructura similar a la quinona conjugativa que mueve el máximo de absorción al espectro visual y la molécula pierde carácter básico (Figura 2).

45 De esta manera, la invención proporciona un proceso para una remoción eficiente de impurezas por medio de adsorción de componentes particulares disueltos desde el material filtrado del caldo de fermentación de un cultivo de un microorganismo fúngico que produce teicoplanina, preferiblemente un cultivo de *Actinoplanes teichomyceticus*, sobre resinas adsorbentes hidrófobas comerciales o ligeramente polares con mayor elución selectiva del producto desde la resina. De acuerdo con la invención, el proceso incluye el uso de una mezcla de un solvente orgánico miscible con agua en una solución acuosa en varios pasos del proceso de purificación. Preferiblemente, el solvente orgánico miscible con agua se selecciona del grupo que consiste en alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄.

50 El material filtrado del caldo de fermentación del cultivo de *Actinoplanes teichomyceticus* significa aquí un caldo de cultivo filtrado sin micelio, preparado mediante procedimientos conocidos por un biotecnólogo versado en la materia.

En una realización preferida, el proceso comprende los pasos de

a) adsorber teicoplanina a una resina hidrófoba de adsorción;

- b) desorber teicoplanina de dicha resina usando un medio que contiene agua y un solvente orgánico miscible con agua;
- c) tratar una solución que comprende teicoplanina con carbón vegetal, seguido de la remoción del carbón vegetal;
- 5 d) someter una solución que comprende teicoplanina a un proceso de ultrafiltración sobre membranas con un corte de 3-100 kDa, en cuyo caso la solución contiene más de 20 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua y no más de 90 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua;
- e) opcionalmente concentrar y/o desalinizar una solución que contiene teicoplanina después de la ultrafiltración definida en el paso d) mediante ultrafiltración sobre membranas con un corte de 1000 Da;
- f) finalmente obtener teicoplanina purificada.

- 10 La resinas adsorbentes hidrófobas o ligeramente polares, disponibles comercialmente pueden seleccionarse de resinas de poliestireno o poliacrilato reticuladas, no iónicas, macroreticulares con un radio de poro de 20 to 500 Å, seleccionadas de, pero no limitadas a, las marcas Hypersol-Macronet®, Amberlite® XAD, Diaion® HP y Sepabeads SP, o Dowex® Optipore, preferiblemente seleccionadas de las resinas con un radio de poro de 100 a 500 Å seleccionadas de las marcas Amberlite® XAD16, Amberlite® XAD 1600, Amberlite® XAD 1180, Diaion® HP20,
- 15 Diaion® Sepabeads SP207, Dianion® HP2MG, más preferiblemente de Amberlite® XAD16, Amberlite® XAD 1600, Amberlite® XAD 1180. Las resinas de este tipo adsorben selectivamente moléculas con residuos lipofílicos, incluidas moléculas de peso molecular ligeramente mayor, tal como teicoplanina, desde soluciones acuosas y dejan componentes polares de bajo peso molecular, incluidos solutos iónicos y una variedad de macromoléculas en la solución. Las moléculas menos polares se adsorben desde una solución acuosa que contiene no más de 30 % (v/v)
- 20 de solventes miscibles con agua, preferiblemente no más de 20 % de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄, preferiblemente metanol.

La facilidad de adsorción depende del tipo de resina; una adsorción menos favorable puede compensarse por un tiempo más largo de tratamiento. El ejemplo representativo 2 muestra la cinética de adsorción de teicoplanina en tres resinas típicas: Amberlite® XAD16, Amberlite® XAD 1600, Amberlite® XAD 1180. Todas las tres resinas muestran buena adsorción, pero algunas de ellas adsorben más rápido que otras. Usando Amberlite® XAD 1180,

25 más del 90% de la teicoplanina inicialmente presente se adsorbe desde la solución en 2 horas, mientras que con XAD16 solamente se adsorbe 50 %. Una resina con poros más grandes (por ejemplo Amberlite® XAD 1180) adsorbe más rápido que una con poros más pequeños (por ejemplo Amberlite® XAD16), pero esto puede compensarse con una partícula más pequeña y un área de superficie más grande (por ejemplo Amberlite® XAD 1600). Una cinética favorable conduce a una adsorción en columna más eficiente, lo cual es importante para la producción a escala industrial eficiente de teicoplanina.

Desde dichas soluciones, el adsorbente retira al menos 80 % de la teicoplanina total, preferiblemente al menos 90 %, y de la manera más preferida al menos 95 % de la teicoplanina total. El proceso de adsorción se realiza agitando la resina suspendida en dicha solución de teicoplanina durante al menos 2 horas, preferiblemente durante al menos

35 12 horas y de la manera más preferida durante al menos 24 horas a una temperatura de 0-40 °C, preferiblemente a temperatura ambiente. Finalmente, la resina que contiene teicoplanina se retira por filtración y opcionalmente se lava con agua mediante re-suspensión o enjuague. Como alternativa, el caldo filtrado que contiene teicoplanina es eluido a través de una columna de dicho adsorbente, cargando productos de fermentación sobre el adsorbente hasta la saturación.

En una realización preferida, el material adsorbido se libera de una resina mediante elución con soluciones acuosas ricas en solvente orgánico, que contienen preferiblemente al menos 40 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua, seleccionados de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄, preferiblemente metanol. La medida de elución de teicoplanina desde una resina puede mejorarse mediante adición de un solvente orgánico. Sin embargo, la elución no es completa y no es altamente selectiva. Conjuntamente con teicoplanina, también se eluye la mayoría de las impurezas. La concentración del solvente orgánico para elución de teicoplanina está limitada por la solubilidad de teicoplanina en el solvente orgánico. Por ejemplo, cuando se aplican mezclas de metanol/agua, la extensión de la elución de teicoplanina alcanza un máximo a concentraciones de 60 - 80 % (v/v) de metanol dependiendo del tipo de resina, pero la extensión de elución es aún menor a 60 % de la teicoplanina adsorbida total. Aumentando la fuerza iónica mediante adición de sales, puede eluirse 87.6 % de teicoplanina (EP 1735337B1), pero la selectividad sigue siendo insuficiente o incluso disminuye; especialmente, la remoción de impurezas coloreadas es aún mala. En general, adicionar una base al sistema de elución (J. Biochem. 275 (2000), p. 6201-6206) es otra solución, pero la estrategia no puede seguirse en el caso específico de teicoplanina puesto que la teicoplanina no es estable en medio alcalino.

De acuerdo con la invención, el medio de elución se acidifica preferiblemente; preferiblemente por medio de ácido mineral y de la manera más preferible por medio de ácido clorhídrico. Se ha encontrado de manera sorprendente que la eficiencia de elución de teicoplanina es superior a cuando se usan métodos de elución neutra, descritos en la técnica anterior. Aún más, la estrategia según la presente invención mejora la selectividad en vista de la remoción de

impurezas coloreadas, derivadas de dicha desaminación oxidativa. Los ejemplos 3-5, suplementados por las figuras correspondientes, muestran eficiencias de elución de teicoplanina y sus impurezas oxidativas a partir de tres resinas típicas (Amberlite® XAD 16, XAD1600 y XAD 1180) como una función de la concentración del solvente orgánico en medio neutro con valores de pH 6-7, mientras que los ejemplos 6-8 muestran características similares en un medio ácido con valores de pH 2, 3 y 4, respectivamente. Es evidente que en medio neutro, la concentración relativa de impurezas coloreadas alcanza 7-12 % de concentración de teicoplanina tal como se mide en porcentaje en área del análisis con HPLC a la concentración de solvente orgánico donde la desorción de teicoplanina tiene su máximo. La concentración relativa de dichas impurezas en medio ácido no excede 6 %, a pH 2 no excede 4 %. Los niveles de impurezas dos a tres veces más bajos son considerablemente más fáciles de retirar de modo cuantitativo en los siguientes pasos de aislamiento de teicoplanina. Además, teicoplanina es mucho más estable en condiciones ácidas que en medios alcalinos.

Los ejemplos 6-8 y las figuras 8-10 ilustran efectos benéficos de un medio ácido sobre la extensión de la liberación de teicoplanina y la selectividad en vista de impurezas coloreadas en un proceso por lotes. Cuando se realiza elución con 60 % (v/v) de solvente orgánico (metanol), el contenido de impureza en la teicoplanina eluida a un valor de pH de 2 se encuentra por debajo de 3 %, pero cuando el valor de pH se incrementa a 3 o 4 en las mismas condiciones de elución, el contenido de impureza se incrementa hasta 8 %. Teicoplanina de grado farmacéutico tiene permitido un máximo de 5% de impurezas de acuerdo con Ph. Eur. 7.2.

La separación de teicoplanina de las impurezas coloreadas puede mejorarse mediante elución continua desde una columna empacada con una resina cargada de teicoplanina, cuando el proceso se conduce de manera similar a un proceso cromatográfico en el cual primero se eluye teicoplanina, seguido por la elución de dichas impurezas. Allí, la selectividad depende del punto de corte de fracción lateral. Una mejor selectividad usualmente reduce el rendimiento. Sin embargo, la proporción rendimiento/selectividad podría mejorarse usando columnas más largas, reduciendo de esta manera el contenido relativo de impurezas por debajo de 4%, preferiblemente por debajo de 2%, de la manera más preferida por debajo de 1% en porcentaje en área relativa, tal como se determina por medio de HPLC.

De esta manera, de acuerdo con una realización preferida de la invención, teicoplanina es eluida a partir de una resina macroreticular no iónica, reticulada de poliestireno o poliácido que tiene un radio de poro entre 20 y 500 Å, preferiblemente seleccionada de Amberlite® XAD16, Amberlite® XAD 1600, Amberlite® XAD 1180 mediante un medio acuoso que contiene al menos 40 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua que se selecciona de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄, preferiblemente metanol, de la manera más preferible que contiene 60-70% (v/v) de metanol, a un valor de pH por debajo de 4, preferiblemente a un valor de pH entre 2 - 2.5. El valor de pH se regula mediante adición de una solución acuosa de ácido mineral u orgánico, preferiblemente seleccionados de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o cítrico o mediante un regulador ácido de pH.

En otra realización preferida de la invención, una solución que contiene moléculas de teicoplanina es tratada con carbón vegetal activo, en cuyo caso la solución contiene al menos 40 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua. La solución de partida se purifica preferiblemente antes de manera previa por medio de adsorción/desorción sobre resinas hidrófobas de adsorción, más preferiblemente mediante desorción con medios ácidos. En el caso más preferido, la proporción solvente/agua no se corrige antes del tratamiento con carbón vegetal, es decir que la solución de teicoplanina se transfiere directamente desde el paso previo ajustando solamente el valor de pH a un intervalo neutro de 6-8.

El tratamiento combinado con resina de adsorción y carbón vegetal ha sido descrito en la EP 1735337B1 (WO 2005/116059). De acuerdo con la descripción allí, una solución etanólica se diluye preferiblemente primero con agua para alcanzar la solución con, a lo sumo, 40 % (v/v) de metanol mediante cálculo y luego se trata con carbón vegetal. Este paso también es obvio para la persona versada en la materia que conoce que los compuestos no polares se adsorben mejor en el carbón vegetal desde medios más polares. Los inventores han encontrado de manera sorprendente que dicha dilución con agua no es necesaria. El tratamiento puede continuarse sin hidratación del medio sin perder la eficiencia de remoción de impurezas lipofílicas; aún más, la remoción de impurezas es más eficiente en mezclas acuosas ricas en metanol. Tal comportamiento es irregular pero se explica de manera hipotética por la propiedad anfifílica de las moléculas de teicoplanina, las cuales pueden ensamblarse en medios acuosos con micelas macromoleculares que tienen un núcleo lipofílico. Dicho núcleo puede ser capaz de atrapar algunas impurezas lipofílicas evitando que tenga contacto con la superficie de carbón vegetal.

De esta manera, en una realización preferida, el proceso mejorado de purificación y descoloración de la solución de teicoplanina sobre carbón vegetal activado incluye el tratamiento de una solución de teicoplanina rica en solventes orgánicos que contiene al menos 40 % (v/v) de un solvente orgánico que se selecciona particularmente del grupo de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄, preferiblemente metanol, más preferiblemente en 60 - 80 % (v/v) de metanol. En otra realización preferida, la proporción en peso de teicoplanina/carbón vegetal es de 1 : 0.05 a 1 : 2, preferiblemente de 1 : 0.2 a 1 : 1, más preferiblemente de 1 : 0.5 a 1: 0.8. En este caso, la incubación se realiza preferiblemente durante 5 minutos hasta 12 horas, preferiblemente durante 0.5 - 2 horas a 0-60 °C, preferiblemente a temperatura ambiente. El carbón vegetal activo se filtra luego y la solución de teicoplanina, con color amarillo reducido, sigue tratándose para aislar el producto sólido.

El tratamiento mejorado con carbón vegetal reduce principalmente los niveles de compuestos lipofílicos, coloreados, de bajo peso molecular y de otras impurezas que tienen polaridad más baja.

5 En una realización preferida, la solución de teicoplanina, previamente purificada de manera sustancial de las impurezas orgánicas con bajo peso molecular, sigue tratándose mediante ultrafiltración sobre membranas que tienen un corte de 1 kDa a 100 kDa.

10 La ultrafiltración es un método que se usa frecuentemente para aislamiento de productos de fermentación. El método se usa primariamente para eliminar impurezas macromoleculares. Esto es especialmente importante para ingredientes farmacéuticos para el uso parenteral debido a que tales macromoléculas pueden tener actividad pirogénica. Los métodos de ultrafiltración utilizan membranas porosas que permiten el pasaje de moléculas más pequeñas mientras retienen moléculas de peso molecular alto. El tamaño de los poros en la membrana es decisivo con respecto al cual las moléculas pasan la membrana (solución permeada) y al cual las moléculas tienen un corte (solución retenida). Las membranas de corte desde 1 kDa a 100 kDa se usan habitualmente para ultrafiltración, dependiendo del propósito. Las membranas con poros pequeños que son permeadas principalmente por solventes y por sales se usan para concentración y desalinización de la solución retenida, mientras que las membranas con poros más grandes se usan para retirar moléculas mayores. Este proceso también se denomina diafiltración. Las moléculas que tienen un peso molecular cercano al tamaño del poro se distribuyen entre la solución permeada y la retenida. En el caso de altas proporciones de concentración solución retenida/permeada, pueden hacerse correr varios ciclos de diafiltración usando solvente fresco con el fin de lograr un rendimiento aceptable del producto en la solución permeada.

20 Se espera que las moléculas de teicoplanina con peso molecular cercano a 1900 Da penetren fácilmente membranas con poros mayores a 5 kDa, de modo que las membranas con un corte de 5 kDa o 100 kDa deben ser útiles para una buena separación de moléculas más grandes de la teicoplanina. Una gran parte de las macromoléculas puede retirarse mediante un método de adsorción sobre resinas no polares, tal como se ha descrito antes. Sin embargo, este método no ofrece una remoción completa de moléculas más grandes, dejando de esta manera una cantidad considerable de pirógenos potenciales, colores macromoleculares y otras moléculas grandes en la solución. La EP 1735337B1 describe una ultrafiltración a través de membrana con 30 kDa o 50 kDa usando soluciones de teicoplanina con un máximo de 20 % (v/v) de metanol o isopropanol. Un procedimiento de este tipo puede ser insuficiente en vista de la remoción de pirógenos, porque se requieren membranas de corte de peso de 3 kDa a 10 kDa para la remoción de pirógenos. Además, se encontró que la proporción de concentración solución retenida/solución permeada es muy alta cuando se usan membranas con un corte de 30 kDa a 50 kDa, por ejemplo más de 80 % incluso en membranas de 50 - 100 kDa usando solución de alcohol diluida hasta 20 % (v/v). Tienen que aplicarse varios ciclos de diafiltración, lo cual dura días y enormes cantidades de solventes frescos. Usando poros más pequeños a fin de obtener un producto no pirogénico, la ultrafiltración se vuelve casi improductiva al aplicar métodos del estado de la técnica. Esta observación es sorprendente y no puede explicarse por el peso molecular calculado de teicoplanina, el cual es varias veces menor que el corte promedio de las membranas.

40 De acuerdo con la invención, la solución de teicoplanina se trata mediante ultrafiltración a través de membranas con un corte de 3 - 100 kDa, preferiblemente de 5 - 10 kDa, en cuyo caso la solución contiene más de 20 % (v/v), preferiblemente más de 60% (v/v), de un solvente orgánico miscible con agua, y no más de 90 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua, que se selecciona particularmente del grupo de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄, preferiblemente metanol, más preferiblemente 40-80 % (v/v) de metanol, y de la manera más preferida 60-80 % (v/v) de metanol. En una realización preferida se usa una membrana del tipo de corte de peso molecular de 5 - 10 kDa y una concentración preferida de metanol 60-80 % (v/v) en una solución de teicoplanina. La proporción retenida/permeada de la concentración de teicoplanina no excede 0.65, preferiblemente no excede 0.4, en cuyo caso la solución permeada está visualmente sin color amarillo. Preferiblemente, el proceso no necesita más de 6 ciclos de diafiltración sobre membranas de 5 kDa y no necesita más de 4 ciclos sobre membranas de 10 kDa, respectivamente, a fin de obtener un rendimiento por encima de 95 % de teicoplanina en la solución permeada, en cuyo caso el color amarillo se retira sustancialmente. Este proceso retira principalmente las impurezas macromoleculares coloreadas y otras impurezas macromoleculares que incluyen pirógenos potenciales. En una realización preferida, el método se combina con otros métodos para retirar colores de otras clases químicas.

50 El beneficio sorprendente de la concentración de solvente orgánico incrementada en la solución de teicoplanina en la fase de ultrafiltración, indica adicionalmente que las moléculas de teicoplanina no se disuelven a nivel monomolecular en soluciones ricas en agua sino parecen ensamblarse en agrupaciones multimoleculares las cuales no pueden permear los poros de las membranas de ultrafiltración que en teoría son suficientemente grandes para una molécula pero no suficientemente grandes para agrupaciones.

55 La solución obtenida de teicoplanina se trata opcionalmente de manera adicional mediante ultrafiltración a través de membranas con corte de 1000 Da con el fin de desalinizar y concentrar la solución. La solución puede seguir tratándose con un anti-solvente seleccionado preferiblemente del grupo de ésteres, nitrilos o cetonas, preferiblemente acetona, para producir un precipitado blanco de teicoplanina de al menos 95% de área, preferiblemente de al menos 98% de área.

En una realización preferida, el proceso total para preparación de teicoplanina con pureza incrementada, que incluye la remoción de materiales coloreados de diferentes tipos moleculares y de otros productos de fermentación y degradación desde un caldo de fermentación de un cultivo que produce teicoplanina, de acuerdo con la invención comprende los siguientes pasos:

- 5 i) preparar una solución de caldo de fermentación;
- ii) adsorber teicoplanina en una resina hidrófoba de adsorción;
- iii) desorber teicoplanina de dicha resina mediante un medio ácido que contiene agua y un solvente miscible con agua;
- 10 iv) tratar la solución obtenida con carbón vegetal, en cuyo caso la solución contiene al menos 40 % (v/v) de solvente orgánico, seguido de la remoción del carbón vegetal;
- v) someter la solución a un proceso de ultrafiltración sobre membranas con un corte de 3-100 kDa, en cuyo caso la solución contiene más de 20 % (v/v) de solvente orgánico;
- vi) opcionalmente, concentrar y desalinizar la solución mediante ultrafiltración sobre membranas con un corte de 1000 Da;
- 15 vii) aislar teicoplanina sólida.

De acuerdo con esta realización, el paso i) incluye matar un microorganismo fúngico que produce teicoplanina, preferiblemente un cultivo de *Actinoplanes teichomyceticus*, descomponer estructuras celulares adicionando un solvente orgánico y retirar micelio y otros productos insolubles de fermentación mediante filtración o centrifugación para producir una solución transparente pero profundamente coloreada de marrón o casi negro.

- 20 La resina hidrófoba de adsorción del paso ii) se selecciona de resinas macroreticulares, no iónicas, reticuladas de poliestireno o poliacrilato, con un radio de poro de 20 a 500 Å, seleccionadas del grupo de las marcas Hypersol-Macronet®, Amberlite® XAD, Diaion® HP y Sepabeads SP, o Dowex® Optipore, preferiblemente seleccionadas de la resinas con radio de poro entre 100 y 500 Å seleccionadas de las marcas Amberlite® XAD16, Amberlite® XAD 1600, Amberlite® XAD 1180, Diaion® HP20, Diaion® Sepabeads SP207, Dianion® HP2MG, de la manera más preferida de Amberlite® XAD16, Amberlite® XAD 1600, Amberlite® XAD 1180. La adsorción puede realizarse
- 25 adicionando una resina a la solución revolviendo o agitando adicionalmente durante 1 - 48 horas, preferiblemente durante al menos 2 horas, más preferiblemente durante al menos 12 horas, de la manera más preferida durante al menos 24 horas a temperatura desde 0-40 °C, preferiblemente a temperatura ambiente. A continuación, la resina que contiene teicoplanina se filtra y se lava opcionalmente con agua mediante resuspensión o enjuague. Como una
- 30 alternativa, los productos de fermentación se adsorben cargando la solución a una columna que está llena con dicha resina y a continuación se lava opcionalmente.

- 35 La desorción del paso iii) puede realizarse por elución del material adsorbido con un medio acuoso que contiene al menos 40 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua, seleccionado del grupo de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄, preferiblemente metanol, de la manera más preferida que contiene 60-70% (v/v) de metanol, a un valor de pH por debajo de 4, preferiblemente a un valor de pH de 2-2.5. El valor de pH se regula por adición de una solución acuosa de ácido mineral o de ácido orgánico, preferiblemente seleccionado de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido cítrico o por adición de un regulador ácido de pH.

- 40 En el paso iv) de esta realización, la solución primero se concentra opcionalmente y se ajusta a un pH de 6-8 adicionando una base seleccionada de hidróxidos, carbonatos, fosfatos inorgánicos, o adicionando un regulador de pH y luego tratando con carbón vegetal activado. El medio de la solución usada para el tratamiento de este paso puede originarse del paso iii), el cual contiene al menos 40 % (v/v) de solvente orgánico, seleccionado del grupo de
- 45 alcohol de C₁-C₄, acetona o acetonitrilo, preferiblemente seleccionado de metanol, preferiblemente en 60 - 80 % (v/v) de metanol o se corrige por adición de solvente fresco para alcanzar dicho contenido de solvente. La cantidad de carbón vegetal activo en la solución se mide relativamente al ensayo de teicoplanina. La proporción en peso de teicoplanina/carbón vegetal se encuentra entre 1 : 0.05 y 1 : 2, preferiblemente desde 1 : 0.2 a 1 : 1, de la manera más preferible desde 1 : 0.5 hasta 1 : 0.8. La solución se trata con carbón vegetal durante 5 minutos hasta 12 horas, preferiblemente durante 0.5 - 2 horas a 0-60 °C, preferiblemente a temperatura ambiente. El carbón vegetal activo se filtra luego para obtener la solución de teicoplanina con color amarillo reducido.

- 50 La ultrafiltración del paso v) se realiza preferiblemente usando la solución del paso previo. La mezcla puede corregirse opcionalmente mediante adición de solvente fresco a fin de que contenga 20-90 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua, seleccionado del grupo de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄, preferiblemente metanol, más preferiblemente que contengan 40-80 % (v/v) de metanol, de la manera más preferible 60-80 % (v/v) de metanol. Las membranas de este paso se seleccionan de las membranas que tienen un corte de 3 - 100 kDa, preferiblemente de 5 - 100 kDa, más preferiblemente de 5 - 10 kDa. En una realización preferida, la

membrana tiene un corte de 5 - 10 KDa y la concentración de metanol es de 60-80 % (v/v). En la solución de teicoplanina la proporción retenida/permeada de la concentración de teicoplanina no exceden 0.65, preferiblemente no excede 0.4.

- 5 La ultrafiltración del paso opcional vi) se realiza preferiblemente sobre la solución del paso previo usando membranas que tienen un corte de 1000 Da. La teicoplanina permanece en la solución retenida mientras que algunas moléculas pequeñas como solventes y sales inorgánicas permean. La solución debe concentrarse para lograr la proporción de solvente y la concentración de teicoplanina adecuadas a fin de proporcionar un alto rendimiento en el siguiente paso.
- 10 El aislamiento de teicoplanina en el paso vii) puede realizarse de manera adecuada retirando solvente usando evaporación, evaporación al vacío, liofilización, secado por aspersion o precipitación adicionando un antisolvente. Se prefiere la precipitación con un antisolvente usando la solución del paso previo como una solución básica y un solvente orgánico, preferiblemente acetona, en calidad de antisolvente. El producto precipitado se aísla por filtración o centrifugación y se seca al vacío. Un proceso total de una realización según la presente invención se muestra esquemáticamente en la figura 3.
- 15 La preparación de una composición farmacéutica que comprende teicoplanina de alta pureza y excipientes farmacéuticamente aceptables es otro aspecto de la presente invención. La composición farmacéutica de la invención es adecuada para administración parenteral y la dosis terapéutica de teicoplanina de acuerdo con la invención en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y severidad de la enfermedad que va a tratarse. La dosis y la frecuencia de dosis también pueden variar de acuerdo con la edad, el peso corporal y la respuesta del
- 20 paciente individual. En general, una dosis adecuada del ingrediente activo se encuentra dentro del rango de 50 mg a 800 mg diario, preferiblemente 100 mg a 400 mg, preferiblemente entre 100 y 800 mg de dosificación diaria total. Las formas de dosificación incluyen dispersiones, soluciones, suspensiones, emulsiones, polvos, implantes, en cuyo caso las formas de dosificación más preferidas de teicoplanina son inyecciones de polvo seco e infusiones. En la realización más preferida, la teicoplanina novedosa descrita en la presente se disuelve en agua estéril y no pirogénica conjuntamente con estabilizantes, reguladores de pH y aditivos y la mezcla se liofiliza para producir un polvo amorfo que se reconstituye en líquido preparado precisamente antes de usar. La inyección reconstituida puede
- 25 administrarse por vía intravenosa o intramuscular. La inyección intravenosa puede administrarse, por ejemplo, como un bolo o como una infusión de 30 minutos. La dosificación es habitualmente una vez al día pero, en casos de infección severa, debe administrarse una segunda inyección el primer día a fin de lograr las concentraciones requeridas en suero de manera más rápida.
- 30

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran aún más la invención. Éstos se proporcionan para propósitos ilustrativos solamente y no tienen la intención de limitar la invención de ninguna manera.

- 35 La cantidad de componentes de teicoplanina en diversas soluciones intermedias o en intermediarios sólidos aislados y productos finales de los ejemplos experimentales representativos se miden mediante métodos de HPLC en un instrumento Agilent 1100™. La fase móvil A contiene un regulador de pH de fosfato de 5 mM de pH 4.9 y la fase móvil B contiene acetonitrilo. Se detectaron picos cromatográficos a 280 nm, la temperatura de la columna fue de 45 °C y se inyectaron 5 µl de muestra. La separación se llevó a cabo sobre la columna Ascentis Express C18™, 10 cm x 4.6 mm, 2.7 µm equipada con una precolumna C18, 2 cm x 4.0 mm, 3 µm. Caudal de 2.2 ml/min y el gradiente durante la cromatografía fue tal como sigue:
- 40

Tabla 1

Tiempo (min)	Fase móvil B
0.0	15 %
0.8	20 %
0.9	24 %
3.3	25 %
4.8	29 %
8.4	41 %
8.7	60 %
9.2	60 %
9.5	15 %
11.0	15 %

Los valores se expresan como porcentaje en área de la suma de todos los componentes de teicoplanina o de los componentes particulares mismos y tienen principalmente un significado relativo o comparativo.

La transmitancia se mide sobre un espectrómetro Perkin Elmer Lamda 25 UV-VIS a 405 nm y a una concentración de teicoplanina en las muestras de 40 g/l en agua.

EJEMPLO 1

Aislamiento de caldo de fermentación crudo

- 5 El caldo entero recién hecho, recogido inmediatamente después del final de la fermentación de *Actinoplanes teichomyceticus* fue usado para los experimentos. Un sobrenadante de caldo (caldo clarificado) fue producido centrifugando el caldo en una centrífuga de laboratorio (Megafuge 1.0R™, Heraeus) a 4000-6000 rpm durante 10-30 minutos. El sobrenadante se filtró adicionalmente a través de un embudo de filtro de vidrio sinterizado (porosidad 4 y 5, Schott Duran GmbH) y se analizó más tarde mediante HPLC.
- 10 El filtrado claro (permeado) se produjo por medio de una filtración de flujo cruzado. Se usó un módulo de filtración de cerámica (Membralox 1P19-60™) con tamaño de poro de 0.1 µm. Se recogió la solución permeada y se analizó mediante HPLC.

EJEMPLO 2

Cinética de adsorción de teicoplanina sobre Amberlite XAD16™, Amberlite XAD1600™ y Amberlite XAD1180™

- 15 Se pesaron cantidades iguales (4 g) de los adsorbentes Amberlite XAD16™, Amberlite XAD1600™ y Amberlite XAD1180™ (marca registrada de Rohm & Haas) en matraces de 25 mL, 15 paralelos para cada resina respectivamente. 20 mL de sobrenadante de caldo de teicoplanina, preparado tal como se describió en el ejemplo 1, se adicionaron a cada matraz. Los matraces se agitaron vigorosamente a temperatura ambiente sobre un agitador de laboratorio. Los matraces se retiraron del agitador a intervalos de tiempo predefinidos (cada hora en las primeras 20 horas, seguido por cada 2 horas en las siguientes 4 horas y 4 horas hasta 24 horas). La lechada se filtró y se analizaron muestras del líquido filtrado mediante HPLC. La porción de teicoplanina adsorbida se muestra como una proporción de la concentración en un momento de tiempo dado a la concentración inicial en el diagrama (Figura 4).

EJEMPLO 3

- 25 Desorción de teicoplanina y de impurezas relacionadas de la resina adsorbente Amberlite XAD16™ con mezclas neutras de agua-metanol

26,01 g de resina Amberlite XAD16™ (marca comercial de Rohm & Haas) se pesaron en un matraz de 1000 mL y se adicionaron 420 mL de filtrado de caldo de teicoplanina. El matraz se agitó vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas se filtró la resina y se enjuagó con 600 mL de agua desmineralizada. La resina que contenía teicoplanina obtenida se dividió en 10 matraces de 25 mL (1 g para cada uno) seguido de la adición de una mezcla de metanol/agua con proporción de v/v de 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, cada una en un matraz particular. Todos los matraces se agitaron vigorosamente en el agitador de laboratorio a temperatura ambiente después de 24 horas se tomaron soluciones de muestra y se analizaron mediante HPLC en vista de teicoplanina y las impurezas oxidadas, coloreadas correspondientes. La dependencia de la concentración de la teicoplanina (círculos) y de la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol se muestra en el diagrama como resultado de dos conjuntos de experimentos (Figura 5).

EJEMPLO 4

Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD1600™ con mezclas neutras de agua-metanol

- 40 26,02 g de resina Amberlite XAD1600™ (marca comercial de Rohm & Haas) se pesaron en un matraz de 1000 mL y se adicionaron 420 mL de filtrado de caldo de teicoplanina. El matraz se agitó vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se filtró la resina y se enjuagó con 600 mL de agua desmineralizada. La resina obtenida que contenía teicoplanina se dividió en 10 matraces de 25 mL (1 g en cada uno) seguido de la adición de una mezcla de metanol/agua con proporción de v/v de 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, cada una en un matraz particular. Todos los matraces se agitaron vigorosamente sobre el agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se tomaron soluciones de muestra y se analizaron mediante HPLC en vista de teicoplanina y las impurezas oxidadas, coloreadas correspondientes. La dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol se muestra en el diagrama como resultado de dos conjuntos de experimentos (Figura 6).

EJEMPLO 5

Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD1180™ con mezclas neutrales de agua-metanol

25 g de resina Amberlite XAD1180™ (marca comercial de Rohm & Haas) se pesaron en un matraz de 1000 mL y se adicionaron 400 mL de filtrado de caldo de teicoplanina. El matraz se agitó vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se filtró la resina y se enjuagó con 150 mL de agua desmineralizada. La resina obtenida que contenía teicoplanina se dividió en 11 matraces de 25 mL (1 g en cada uno) seguido de la adición de una mezcla de metanol/agua con proporción de v/v de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, cada uno en un matraz particular. Todos los matraces se agitaron vigorosamente sobre el agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se tomaron muestras de las soluciones y se analizaron mediante HPLC en vista de teicoplanina y las impurezas oxidadas, coloreadas correspondientemente. La dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol se muestra en el diagrama (Figura 7).

EJEMPLO 6

Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD16™ con mezclas ácidas de agua-metanol

26 g de resina Amberlite XAD16™ (marca comercial de Rohm & Haas) se pesaron en un matraz de 1000 mL y se adicionaron 440 mL de filtrado de caldo de teicoplanina. El matraz se agitó vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se filtró la resina y se enjuagó con 600 mL de agua desmineralizada. La resina obtenida que contenía teicoplanina se dividió en tres conjuntos de matraces de 25 mL, cada conjunto con 7 matraces (1 g de la resina en cada uno), seguido por la adición de una mezcla de metanol/agua con proporción de v/v de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 %, cada una en un matraz particular de cada conjunto. El valor de pH del conjunto particular de matraces se ajustó a pH 2, 3 y 4 respectivamente. Todos los matraces se agitaron vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se tomaron soluciones de muestra y se analizaron mediante HPLC en vista de teicoplanina y las impurezas oxidadas, coloreadas correspondientes. La dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol a pH diferente del eluyente (pH = 2 - línea llena, pH = 3 - línea sombreada, pH = 4 - línea punteada) se muestra en el diagrama (Figura 8).

EJEMPLO 7

Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD1600™ con mezclas ácidas de agua-metanol

26.4 g de resina Amberlite XAD1600™ (marca comercial de Rohm & Haas) se pesaron en un matraz de 1000 mL y se adicionaron 440 mL de filtrado de caldo de teicoplanina. El matraz se agitó vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se filtró la resina y se enjuagó con 500 mL de agua desmineralizada. La resina obtenida que contenía teicoplanina se dividió en tres conjuntos de matraces de 25 mL, cada conjunto con 7 matraces (1 g de la resina en cada uno), seguido de la adición de una mezcla de metanol/agua con una proporción de v/v de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 %, cada una en un matraz particular de cada conjunto. El valor de pH del conjunto particular de matraces se ajustó a pH 2, 3 y 4 respectivamente. Todos los matraces se agitaron vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se tomaron soluciones de muestra y se analizaron mediante HPLC en vista de teicoplanina y las impurezas oxidadas, coloreadas correspondientes. La dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados) de la concentración de metanol a pH diferente del eluyente (pH = 2 - línea llena, pH = 3 - línea sombreada, pH = 4 - línea punteada) se muestra en el diagrama (Figura 9).

EJEMPLO 8

Desorción de teicoplanina y de sus impurezas de la resina adsorbente Amberlite XAD1180™ con mezclas ácidas de agua-metanol

26.4 g de resina Amberlite XAD1180™ (marca comercial de Rohm & Haas) se pesaron en un matraz de 1000 mL y se adicionaron 440 mL de filtrado de caldo de teicoplanina. El matraz se agitó vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se filtró la resina y se enjuagó con 500 mL de agua desmineralizada. La resina obtenida que contenía teicoplanina se dividió en tres conjuntos de matraces de 25 mL, cada conjunto con 7 matraces (1 g de la resina en cada uno), seguido de la adición de una mezcla de metanol/agua con una proporción de v/v de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 %, cada una en un matraz particular de cada conjunto. El valor de pH del conjunto particular de matraces se ajustó a pH 2, 3 y 4 respectivamente. Todos los matraces se agitaron vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se tomaron

5 soluciones de muestra y se analizaron mediante HPLC en vista de teicoplanina y las impurezas oxidadas, coloreadas correspondientes. La dependencia de la concentración de teicoplanina desorbida (círculos) y la parte de impurezas coloreadas relacionadas, expresada como un porcentaje en área en comparación con teicoplanina (cuadrados), de la concentración de metanol a pH diferente del eluyente (pH = 2 - línea llena, pH = 3 - línea sombreada, pH = 4 - línea punteada) se muestra en el diagrama (Figura 10).

EJEMPLO 9

Descoloración de solución de teicoplanina con carbón activado en mezclas de agua-metanol

10 Carbón activado Norit CA1 fue pesado (approx. 0.57 g de carbón activado por g de teicoplanina) en 10 matraces de 50 mL. Se adicionaron 20 mL de solución de teicoplanina (4.5 g de teicoplanina por litro en una mezcla de metanol-agua al 0, 20, 40, 60 y 80 % en vol.) a cada matraz. Los matraces se agitaron vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de una hora, se filtró la lechada y se tomaron muestras y se analizaron mediante HPLC. Los espectros de UV de las muestras se registraron por el espectrofotómetro. En el diagrama (figura 11) se muestra el rendimiento (círculos) y la reducción de absorbancia relativa (cuadrados) en dependencia de la concentración de metanol.

15 **EJEMPLO 10**

Descoloración de solución de teicoplanina con carbón activado en diversas cargas

20 Se pesaron diversas cargas de carbón activado Norit CA1™ en seis matraces de 25 mL. Se adicionaron 15 mL de solución de teicoplanina (5 g de teicoplanina por litro en mezcla de metanol-agua al 80 % en vol.) a cada matraz. Los matraces se agitaron vigorosamente sobre un agitador de laboratorio a temperatura ambiente. Después de una hora se filtró la lechada y se tomaron muestras y se analizaron mediante HPLC. Los espectros de UV de las muestras se registraron por el espectrofotómetro. En el diagrama (figura 12) se muestra el rendimiento (círculos) y la reducción de absorbancia relativa (cuadrados), en dependencia de diversas cargas de carbón, expresados como una relación p/p con teicoplanina.

EJEMPLO 11

25 Preparación de teicoplanina cruda mediante adsorción en columna sobre resina de adsorción

30 Una columna a escala de laboratorio de 4.9 cm de diámetro se llenó con Amberlite XAD-1180™. La altura del lecho adsorbente era de 84 cm. La capacidad de carga dinámica de XAD-1180 se estimó en al menos 65-70 g de teicoplanina por litro de adsorbente a 0.5 hasta 1 BV/h. 0.76 BV/h. 57.5 L de solución permeada de caldo de teicoplanina, preparada tal como se describe en el ejemplo 1 y que contiene 1.9 g/L de teicoplanina fueron bombeados a través de la columna a 0.76 BV/h. Después de que terminó la adsorción, se enjuagó el adsorbente con 27 BV de agua desmineralizada (1.14 BV/h), 25 BV de 15 % en volumen de metanol (1.14 BV/h), 6.4 BV de agua desmineralizada (1.9 BV/h), 0.56 BV de agua desmineralizada pH=2 (1.9 BV/h) y se eluyó con 50 % en volumen de metanol /pH=2 (0.38 BV/h). Se recogieron dos fracciones, 1700 mL con 14.8 g/L de teicoplanina y 100 % de área de pureza cromatográfica y 5560 mL con 11 g/L teicoplanina y 98.29 % de área de pureza cromatográfica (Tabla 2).

35 Se adicionaron 50 g de carbón activado Norit CA1™ a 7260 mL de las fracciones combinadas. La suspensión se revolvió vigorosamente durante dos horas y luego se filtró el carbón activado. El filtrado remanente fue neutralizado con solución de hidróxido de sodio de pH 2.8 hasta pH 6.6 y se concentró a 1000 mL por medio de evaporación al vacío (T<40°C). Para precipitar teicoplanina, se adicionó continuamente acetona al concentrado mientras se revolvió hasta que la proporción de acetona: concentrado fue de aproximadamente 11:1. La suspensión resultante se filtró sobre un filtro cerámico (porosidad B4) para recuperar un precipitado que fue lavado dos veces con 100 mL de acetona y luego secado en un secador al vacío a 40 °C por 20 horas para producir 60.3 g de polvo de teicoplanina con color semejante al marrón, con una pureza cromatográfica de 98.07 % de área.

40

Tabla 2

		Fracción 1	Fracción 2	Precipitado
TA3-1	% en área	17.04	1.27	7.82
TA2 componente principal	% en área	55.63	89.08	75.89
TA2 otros componentes	% en área	27.33	7.93	14.36
TA2 total	% en área	82.96	97.02	90.25
TA2 + TA3-1	% en área	100	98.29	98.07
Impurezas > Rt TA2-5	% en área	0	1.71	1.93

45 La tabla muestra que una persona versada en la materia puede recoger fracciones tomando en consideración un balance entre la economía del proceso y la simpleza técnica, por un lado y los requisitos regulatorios que incluyen

seguridad para pacientes, por el otro lado. Se pueden recoger cosechas de pureza extrema cercana al 100% sin impurezas relacionadas detectables. Es posible además reducir porciones de fracciones insuficientes usando una columna más larga o se pueden usar fracciones insuficientes para un ciclo adicional de tratamiento de columna en el siguiente lote.

5 EJEMPLO 12

Permeabilidad de teicoplanina a través de membranas de ultrafiltración en diferentes mezclas de metanol/agua

Se ensayó la remoción de impurezas coloreadas desde una solución de cristales de teicoplanina cruda, preparados de acuerdo con el ejemplo 11 (5 g/L) en una mezcla de agua/metanol, en una celda agitada de ultrafiltración Amicon 8050 (marca comercial de Millipore) sobre diversas membranas con un corte de 5, 10, 20, 50 y 100 kDa, seleccionadas de membranas comerciales de la marca comercial Alfa Laval. En diferentes experimentos se ensayaron mezclas de metanol/agua de proporción de v/v de 0, 20, 40, 60, 80 % para la permeabilidad. Se adicionaron 50 mL de solución a la celda agitada, se inició la filtración mediante presurización de la celda con nitrógeno y se ajustó un agitador magnético a alta velocidad para reducir efectos de polarización de la concentración. La solución permeada se recogió en un cilindro de medición. La filtración se detuvo cuando se alcanzó un factor de concentración volumétrico (VCF) de aproximadamente 5.

Se tomaron muestras de la solución permeada y de la concentrada y se analizaron mediante HPLC. Los resultados de los experimentos se compilan en la tabla 3.

Tabla 3

Tipo de membrana	MWCO	C MeOH	C0	dP	T	VCF	R	Color de permeado
-	kDa	vol. %	g/L	bar	°C	-	-	-
UF X5 pHt	5	20	5.3	3.0	20	5.6	0.92	incoloro
		50	5.5	3.0	21	5.3	0.50	incoloro
		80	5.4	3.0	20	5.1	0.31	incoloro
GR 81 PP	10	20	5.7	3.0	21	5.0	0.94	incoloro
		50	5.5	3.0	20	5.0	0.75	incoloro
		80	5.8	2.0	29	5.3	0.63	ligeramente amarillento
GR 61 PP	20	80	6.0	2.0	21	5.0	0.16	ligeramente amarillento
GR 51 PP	50	0	5.4	2.0	20	5.4	0.89	incoloro
		80	5.7	3.0	20	5.6	0.02	Amarillo claro
GR 40 PP	100	0	5.5	3.0	20	6.1	0.88	incoloro

20 EJEMPLO 13

Purificación de teicoplanina mediante ultrafiltración

50 mL de solución de teicoplanina (mezcla de agua-metanol, 2.8 g de teicoplanina/L, pH 7.3), preparada mediante recolección de fracciones de cromatografía después de la desorción de teicoplanina de Amberlite XAD1180™ tal como se describe en el primer párrafo del ejemplo 11, fueron adicionados a una celda UF agitada Amicon 8050™ (Millipore, MA) con una membrana de ultrafiltración de corte de peso molecular de 5 kDa (marca comercial de Alfa Laval®) y se inició la filtración mediante presurización de la celda con nitrógeno. Se ajustó un agitador magnético a alta velocidad (200 rpm) para reducir los efectos de polarización de concentración. La solución permeada se recogió en un cilindro de medición. La filtración de lote por cinco veces fue seguida por cinco diafiltraciones, cada una con 40 mL de 80 % en volumen de MeOH. Se tomaron muestras de la solución permeada y de la concentrada y se analizaron mediante HPLC. El rendimiento total de la concentración del lote y de la diafiltración fue conjuntamente >95% (Figura 13).

EJEMPLO 14

Preparación de polvo de teicoplanina

50L de solución permeada de caldo de teicoplanina a partir del cultivo de fermentación de *Actinoplanes teichomyceticus*, que contenía 2.1 g de teicoplanina fueron bombeados a través de una columna de 4.9 cm de diámetro, cargada con Amberlite XAD-1180™ de 90 cm de altura del hecho. Después de la adsorción, se enjuagó la resina con 30BV, 25 BV de metanol al 15% en volumen, 10 BV de agua desmineralizada y 1 BV de HCl diluido con pH de 2. Teicoplanina fue eluida desde el adsorbente con 50 % en volumen de metanol y pH ajustado a 2 con 10 %

5 (p/p) de HCl. Se recogieron cuatro fracciones (en total 7.6 BV) y se determinó la pureza de teicoplanina mediante HPLC. Se descartó la primera fracción (0.5 BV), se siguió purificando la segunda fracción rica en teicoplanina (4.1 BV, 11.8 g/L de teicoplanina) con un contenido total de impurezas oxidadas, coloreadas de 2.36 % en área, se mantuvo para repurificación opcional la tercera fracción (1.5 BV, 5.2 g/L de teicoplanina) con un contenido total de impurezas oxidadas, coloreadas de 6.72 % en área. Se descartó la cuarta fracción con un contenido total de impurezas oxidadas, coloreadas > 8.5 % en área 1.5 BV).

10 La fracción principal se transfirió a un vaso con un agitador mecánico y se adicionaron 0.6 g de carbón activado Norit CA1™ por g de teicoplanina. La mezcla se revolvió vigorosamente durante 2 horas y se filtró el carbón vegetal. La solución filtrada resultante (6.2 L) fue neutralizada a pH 6.5 con hidróxido de sodio acuoso al 1 % (p/p). El filtrado neutralizado se purificó aún más mediante ultrafiltración de flujo cruzado (SEPA CF II, GE Osmonics, MN™) utilizando membranas de ultrafiltración de lámina plana UF X5 pHt (Alfa Laval) con un corte de peso molecular de 5 kDa, con área de filtración de 155 cm². La solución de alimentación se concentró primero seis veces de manera discontinua, seguido de seis diafiltraciones con 1.5 L de MeOH al 80 % (p/p) cada una. La caída de presión de transmembrana se mantuvo en 2.5-5 bares y la temperatura del concentrado en 23-25°C. La solución permeada
15 (14.2 L, 4.3 g/L de teicoplanina) se concentró mediante evaporación al vacío en un evaporador giratorio para obtener el concentrado con aproximadamente 80 g/L de teicoplanina. El concentrado (0.76 L) se transfirió además a un contenedor de 10 L y se adicionaron gota a gota 7 L de acetona mientras se revolvió vigorosamente la mezcla resultante. La suspensión obtenida se revolvió por otras 2 horas y luego se filtró el precipitado y se secó en un secador al vacío a 40 °C para producir 55.8 g de polvo ligeramente amarillento con pureza de 98.13 % en área.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar teicoplanina purificada; el proceso comprende los pasos de
 - a) adsorber teicoplanina en una resina hidrófoba de adsorción;
 - 5 b) desorber teicoplanina de dicha resina usando un medio que contiene agua y un solvente orgánico miscible con agua;
 - c) tratar una solución que comprende teicoplanina con carbón vegetal, seguido de la remoción del carbón vegetal;
 - d) someter una solución que comprende teicoplanina a un proceso de ultrafiltración sobre membranas con un corte de 3-100 kDa, en cuyo caso la solución contiene más de 20 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua y no más de 90 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua;
 - 10 e) opcionalmente concentrar y/o desalinizar una solución que contiene teicoplanina después de la ultrafiltración definida en el paso d) mediante ultrafiltración sobre membranas con un corte de 1000 Da;
 - f) obtener teicoplanina purificada.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los pasos a) hasta f) se realizan en el orden tal como se indica en la reivindicación 1.
- 15 3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además por adelantado un paso de adicionar un solvente orgánico a un cultivo de *Actinoplanes teichomyceticus*, y retirar micelio y otro material insoluble mediante filtración y/o centrifugación.
4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en el cual la resina hidrófoba de adsorción es una resina macroreticular, no iónica, reticulada de poliestireno o poliacrilato, que tiene un tamaño de poro de 20 a 500 Å.
- 20 5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el paso de desorber teicoplanina de la resina hidrófoba de adsorción se realiza usando un medio acuoso que comprende al menos 40 % (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua.
- 25 6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el solvente orgánico miscible con agua se selecciona de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄.
7. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el paso de desorber teicoplanina de la resina hidrófoba de adsorción se realiza usando un medio acuoso que tiene un valor de pH por debajo de 4.
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual el valor de pH del medio acuoso se ajusta mediante adición de una solución acuosa de un ácido mineral, un ácido orgánico o de un regulador ácido.
- 30 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual el medio de la solución que se somete a tratamiento con carbón vegetal se origina del paso b) y comprende al menos 40% (v/v) de un solvente orgánico seleccionado del grupo de alcoholes de C₁-C₄, cetonas de C₃-C₄ o nitrilos de C₂-C₄.
10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual la solución obtenida en el paso b) comprende 60 a 80 % (v/v) de metanol o se corrige mediante adición de solvente fresco a fin de tener una concentración de metanol de 60 a 80 % (v/v).
- 35 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el cual la ultrafiltración del paso d) se realiza sobre una solución obtenida en el paso c), la cual comprende más de 20% (v/v) y hasta 90 % (v/v) de un alcohol de C₁-C₄, o sobre una solución obtenida en el paso c), la cual ha sido corregida mediante adición de solvente fresco a fin de que comprenda más de 20 % (v/v) y hasta 90 % (v/v) de un alcohol de C₁-C₄.
- 40 12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el cual la ultrafiltración del paso d) se lleva a cabo usando una membrana con un corte de 3 - 100 kDa, preferiblemente de 5 - 100 kDa, más preferiblemente de 5 - 10 kDa, y/o en el cual la ultrafiltración del paso e) se realiza usando membranas con un corte de 1000 Da.
- 45 13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el cual la obtención de teicoplanina purificada en el paso f) se realiza mediante aislamiento de teicoplanina lo cual incluye la remoción del solvente usando evaporación, evaporación al vacío, liofilización, secado por aspersion o precipitación mediante adición de antisolvente.

14. Un proceso para fabricar una composición farmacéutica que comprende el proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y en el cual la teicoplanina purificada se mezcla con al menos un excipiente o vehículo farmacéutico.

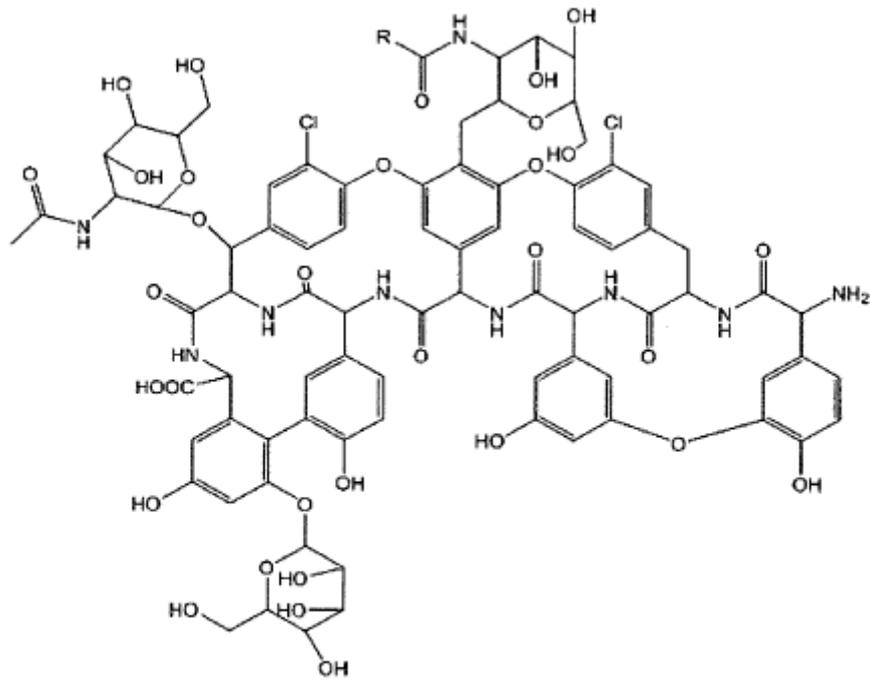


Figura 1

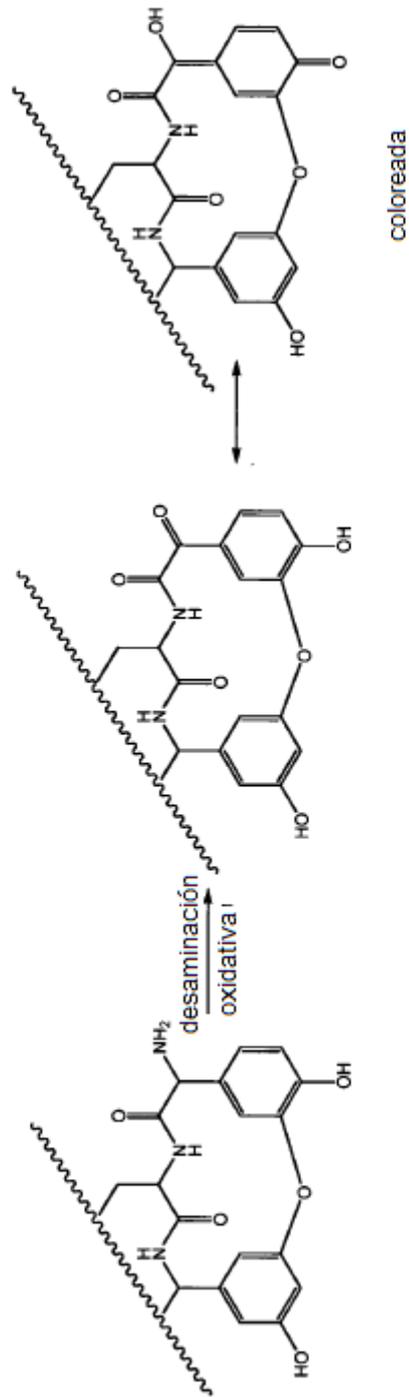


Figura 2

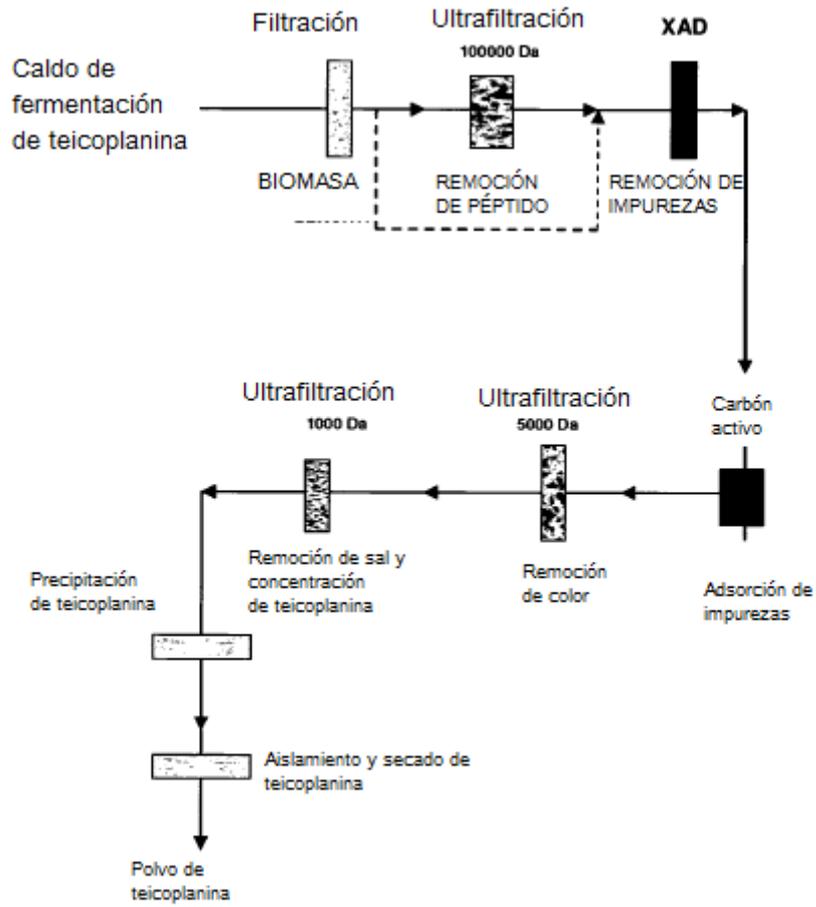


Figura 3

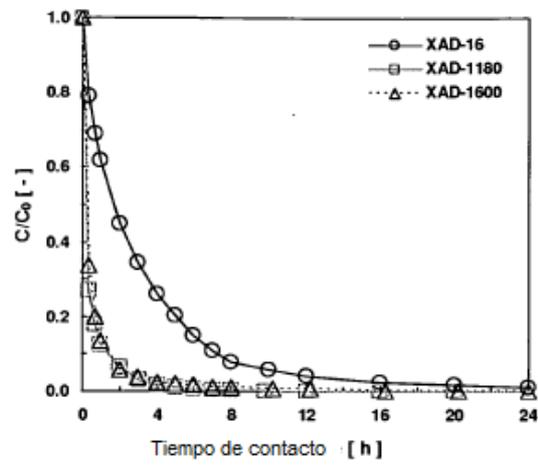


Figura 4

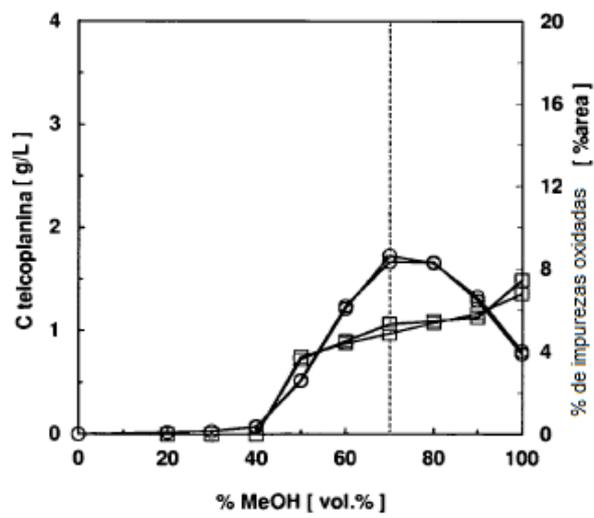


Figura 5

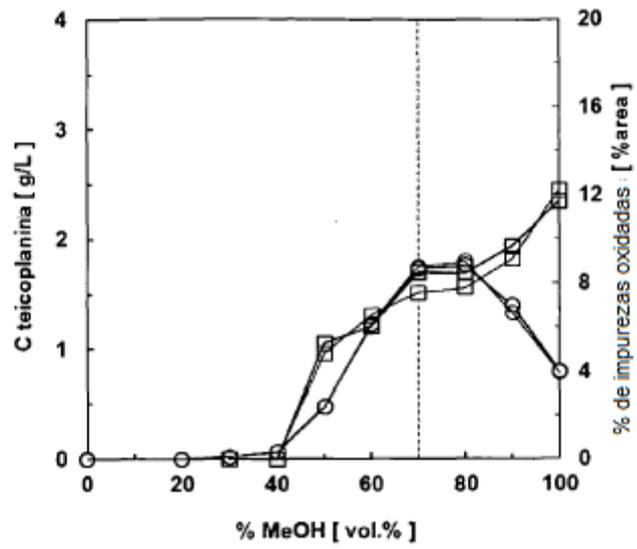


Figura 6

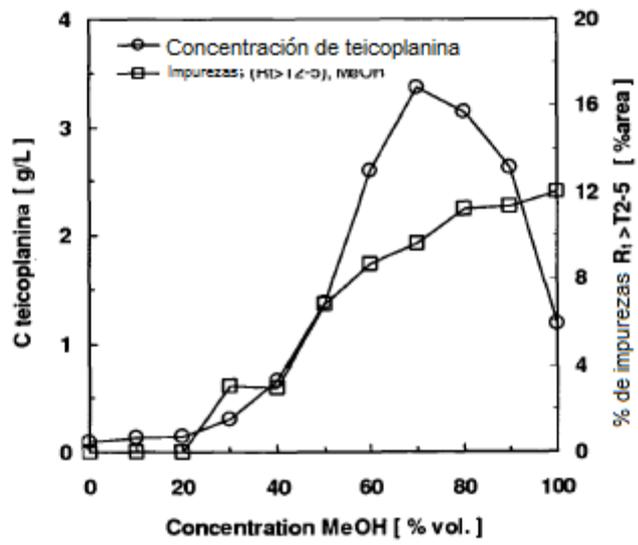


Figura 7

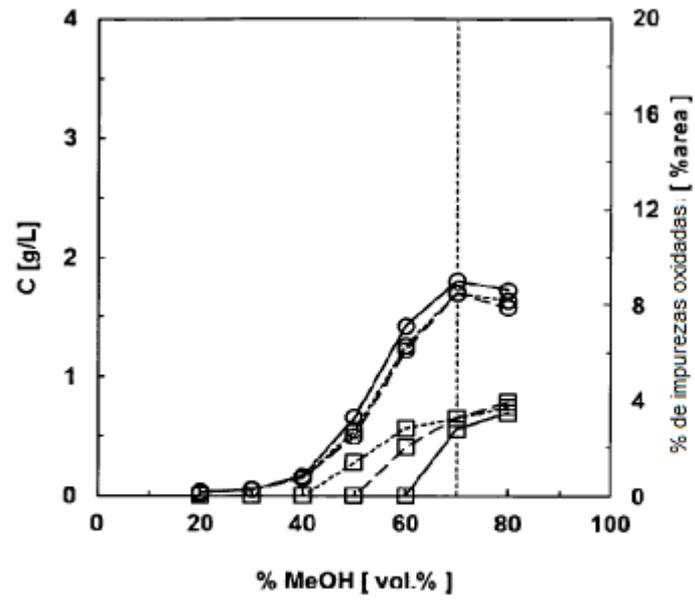


Figura 8

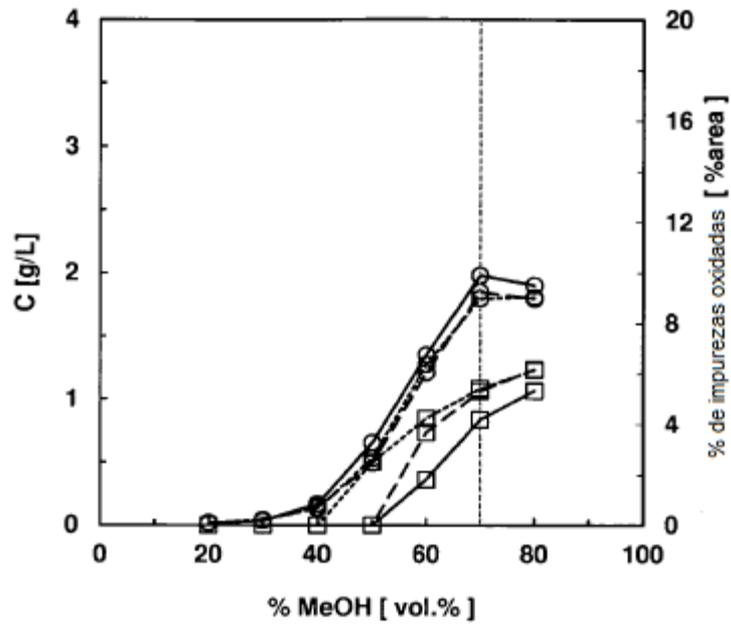


Figura 9

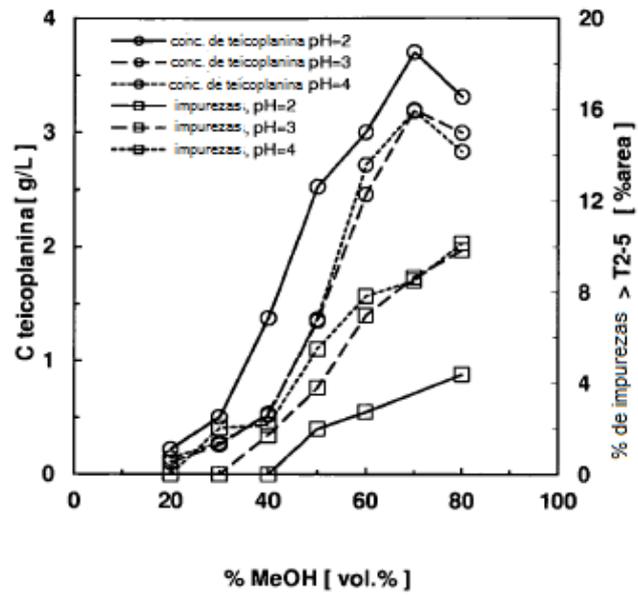


Figura 10

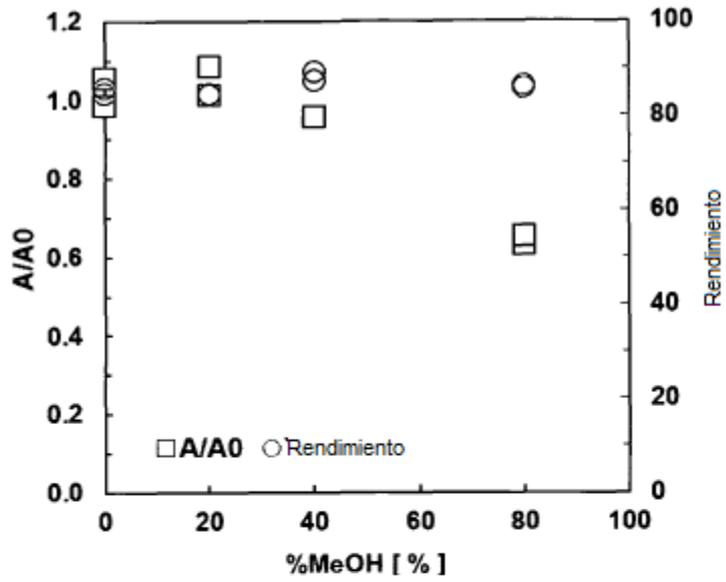


Figura 11

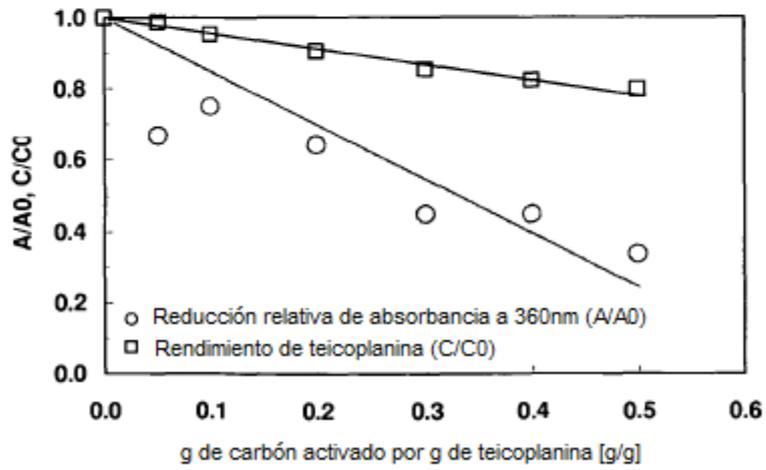


Figura 12

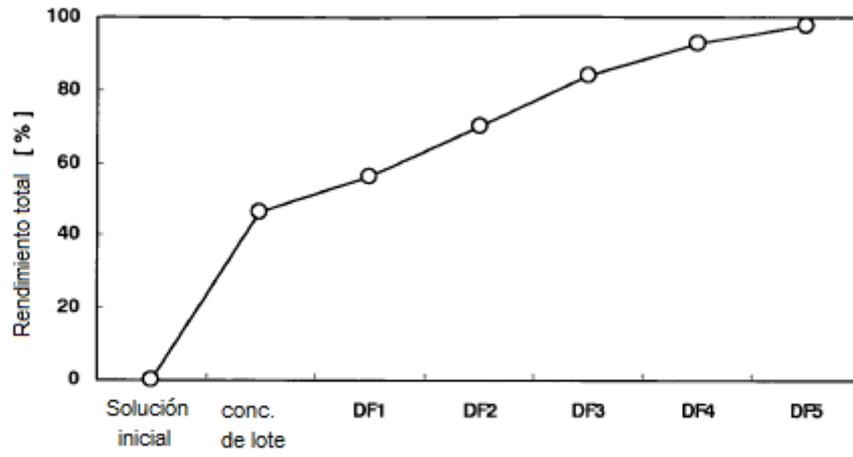


Figura 13