(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 558 603**

(51) Int. CI.:

C07K 9/00 (2006.01)
C07K 1/18 (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 12784250 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2776453**

(54) Título: **Proceso de purificación de teicoplanina**

(30) Prioridad:

11.11.2011 EP 11188776

(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;
GRAHEK, ROK y
MARKO, TOMAZ

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

Proceso de purificación de teicoplanina

Campo de la invención

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

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 teicomicina A_1, A_2 y A_3. El factor A_2, llamado más tarde teicoplanina A_2, fue identificado como el componente principal, el cual se aisló mediante cromatografía de columna sobre Sephadex LH-20™. Teicoplanina A_2 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 acilo-alifática (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 C_{10}-C_{11}). Estos cinco compuestos A_2 constituyen la teicoplanina conjuntamente con otro compuesto principal (A_3) y algunos otros compuestos secundarios (por ejemplo R_S-1 a R_S-4). 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.

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.

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.

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.

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.

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 hidrófuga 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 epimerisación 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.

La patente coreana 321304 (KR100321304) 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 (KR20030017067), 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 (KR20030092504) 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. La 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 patente 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 C_1-C_4 o de acetonas de C_3-C_4 de pH 6.5 a 7.5, seguida por elución con alcoholes de C_1-C_4 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 C_1-C_4 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.

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

La WO 2006/045627 divulga un método para la purificación de un antibiótico glicopéptido, incluyendo la vancomicina, avopracin, ristocetina y teicoplanina, usando una mayor concentración de sal y material de intercambio iónico.

La EP1612216 divulga un método de purificación de un vancomicina a partir de un caldo de fermentación de un microorganismo que contiene vancomicina, incluyendo pasar el caldo de fermentación de un microorganismo que contiene vancomicina a través de una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte, una resina de intercambio aniónico de base débil, alúmina y secuencialmente una resina absorbente hidrófuga.

Resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ilustra una representación de compuesto ejemplificado y típico de teicoplanina;

Figura 2: Muestra esquemáticamente una reacción de desaminación oxidativa de la teicoplanina

Figura 3: Muestra esquemáticamente una visión general de todo un proceso para la producción de teicoplanina

Descripción detallada de la invención

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.

la presente invención provee un proceso económico para aislar teicoplanina a partir de un cultivo de fermentación de un microorganismo fúngico adecuado que produce teicoplanina tal como, por ejemplo, *Actinoplanes teichomyceticus* en un grado para aplicación farmacéutica con remoción sustancial de colores. Aplicando combinación óptima de las técnicas de intercambio catiónico y aniónico junto con purificación adicional mejorada produce un material de teicoplanina decolorada único.

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 (A_2-1, A_2-2, A_2-3, A_2-4, A_2-5), un núcleo de glicopéptido A_3-1 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.

El cultivo de fermentación de por ejemplo *Actinoplanes teichomyceticus* usado para la producción de teicoplanina típicamente es 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.

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.

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.

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).

Así, la invención provee un proceso para la preparación de teicoplanina purificada, en donde de acuerdo con una solución técnica el proceso comprende someter teicoplanina a etapas de purificación combinadas que involucran

tanto, una técnica de intercambio catiónico como una técnica de intercambio de aniones, en donde el catión y/o la resina de intercambio aniónico, a la que se une la teicoplanina, se eluye con un eluyente que tiene un pH de 5 hasta por debajo de 9, que está regulado preferiblemente mediante, por ejemplo, una solución de regulador orgánico o al menos un compuesto iónico.

Se provee 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 cultivo de *Actinoplanes teichomyceticus,* que comprende opcionalmente etapas de purificación adicionales tales como adsorción de teicoplanina sobre resinas adsorbentes hidrófobas comerciales o ligeramente polares de medio predominantemente acuoso y remoción adicional del producto desde la resina por medio de un eluyente menos polar, principalmente un eluyente con contenido reducido de agua.

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 de la invención, se combinan las etapas de remover sustancialmente material coloreado de teicoplanina cruda, el enlazamiento a una resina de intercambio catiónico y la adsorción a una resina de intercambio aniónico. En esta realización preferida, la teicoplanina se prepara mediante:

a) proveer teicoplanina cruda en solución;

b) enlazar la teicoplanina a partir de la solución a una resina de intercambio catiónico y eluyendo el producto con un regulador o una solución salina de ácido débil;

c) tratar la solución obtenida por métodos de rutina de concentración y desalinización opcional, y el enlazamiento de teicoplanina a partir de la solución a una resina de intercambio aniónico y eluyendo el producto con una solución reguladora o una solución salina de ácido débil;

d) someter la solución obtenida a un tratamiento con métodos de rutina de aislamiento para remover las impurezas, sales y pirógenos;

e) aislar el producto final con cantidades reducidas de material coloreado.

En otra opción de esta parte de la invención la teicoplanina se prepara, de acuerdo con una realización preferida, mediante:

a') proveer teicoplanina cruda en solución;

b') enlazar la teicoplanina a partir de la solución a una resina de intercambio aniónico y eluyendo el producto con un regulador o una solución salina de ácido débil;

c') tratar la solución obtenida por métodos de rutina de concentración y desalinización opcional, y el enlazamiento de teicoplanina a partir de la solución a un resina de intercambio catiónico y eluyendo el producto con una solución reguladora o una solución salina de ácido débil;

d') someter la solución obtenida a un tratamiento con métodos de rutina de aislamiento para remover las impurezas, sales y pirógenos;

e') aislar el producto final con cantidades reducidas de material coloreado.

Proveer solución de teicoplanina cruda de ítems a) y a') puede incluir al menos una de las siguientes operaciones:

a1) incubar un cultivo de fermentación de una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* para obtener una concentración óptima de compuestos de teicoplanina de seguido por la eliminación de todo el material no disuelto por filtración, ultrafiltración o centrifugación;

a2) adsorber teicoplanina a una resina de adsorción hidrófuga seguido de lavado de la resina y elución del producto de la resina con una mezcla de agua y un solvente miscible con agua, preferiblemente metanol;

a3) tratar la solución de teicoplanina con carbón;

a4) concentrar y desalinizar la solución por ultrafiltración en membranas con un corte de al menos 1000 Da;

a5) aislar un producto crudo sólido de la solución de cualquiera de los ítems a1) a a4) por evaporación y/o precipitación con un antisolvente, seguido por redisolución del producto crudo en un medio apropiado con el fin de continuar con las etapas de ítems b) o b');

a6) tomar teicoplanina de color de cualquier fuente, incluyendo una fuente comercial, y disolviéndola en un solvente apropiado con el fin de continuar con los pasos de ítems b) o b').

Enlazar teicoplanina a partir de la solución de acuerdo con los ítems b) y c') puede incluir el uso de la solución de la etapa anterior a) o b'), ajustando la solución a condiciones adecuadas para la adsorción por evaporación parcial opcional, la adición de un solvente de corrección o ajustar pH y tratar la solución obtenida mezclándola con una resina de intercambio catiónico mediante agitación, eliminando el medio de la resina por filtración seguido de lavado y desorción con un medio de elución o mediante la adición de la solución a una columna de una resina de intercambio catiónico seguido de lavado y elución del producto por un medio de elución, en donde la resina de intercambio catiónico se selecciona preferiblemente de resinas de intercambio catiónico de ácido débil macrorreticulares, seleccionadas de, pero no limitadas a, grupos de marcas comerciales de Amberlite © IRC, Amberlite® FPC, Diaion® WK, Purolite® C, más preferiblemente de Amberlite IRC50™, Amberlite FPC 3500T™, Diaion WK 100™ (lo más preferiblemente de Amberlite IRC50™) en una forma protónica, y en donde el eluyente comprende preferiblemente una solución al 10-40% en agua de solvente miscible con agua, más preferiblemente solución metanólica, lo más preferiblemente 20% de metanol y un regulador agregado de pH en el rango desde 5 hasta por debajo de 9, o una solución de una sal de un ácido débil, preferiblemente sal alcalina de ácido alifático inferior, más preferiblemente de acetato de sodio en un rango de concentración desde 0.01 hasta 0.5 mol/L, por ejemplo acetato de sodio 0.1 M.

Enlazar teicoplanina a partir de la solución de acuerdo con los ítems c) y b') puede incluir el uso de la solución de la etapa anterior b) o a'), ajustando la solución para adaptarse a las condiciones óptimas adecuadas para la adsorción por evaporación parcial opcional, la adición de una solvente de corrección o la corrección de pH y el tratamiento de la solución obtenida mezclándola con una resina de intercambio aniónico por agitación, eliminando el medio de la resina por filtración seguido de lavado y desorción con un medio de elución o mediante el vertido de la adición de la solución a una columna de una resina de intercambio aniónico seguido de lavado y eluyendo el producto mediante un medio de elución en donde una resina de intercambio aniónico se selecciona preferiblemente de, pero no limitada a, marcas comerciales Amberlite® FPA, Dowex® Marathon, Dowex® Upcore, Diaion® WA, Purolite® A, preferiblemente Amberlite FPA51™, Amberlite FPA55™, Dowex Marathon WBA™, Purolite A830™, lo más preferiblemente de Purolite A830™, y en donde el eluyente comprende preferiblemente solución al 10-50% en agua de un solvente miscible con agua, más preferiblemente solución metanólica, lo más preferiblemente 40% de metanol y agregado un regulador de pH en el rango de 5 hasta por debajo de 9, o una solución de una sal de un ácido débil, preferiblemente sal alcalina de ácido alifático inferior, más preferiblemente de acetato de sodio en un rango de concentración de 0.01-0.5 mol/L, más preferiblemente acetato de sodio 0.1M.

Los eluyentes de las etapas b/b' y c/c' pueden ser idénticos o diferentes, preferiblemente son idénticos y contienen al menos un compuesto iónico, seleccionado preferiblemente de sales de ácidos débiles. Durante la elución utilizando dicho eluyente, la teicoplanina, que está enlazada a la resina de intercambio catiónico, se sustituye por una parte catiónica del eluyente, seleccionado a partir de cationes de metales alcalinos, cationes de metales alcalinotérreos, amonio, amonio mono-, di-, tri- o tetra sustituido, en el que los sustituyentes son iguales o diferentes y se seleccionan de C_1-C_{16}- alquilo, C_1-C_4-alquilo sustituido por arilo, preferiblemente la parte de catión del compuesto se selecciona entre cationes de metales alcalinos, más preferiblemente Na+, y teicoplanina, enlazado a la resina de intercambio aniónico, se sustituye por la parte aniónica del eluyente, seleccionado entre aniones de ácidos débiles, en particular seleccionados de fosfato, hidrógeno fosfato, dihidrógeno fosfato, carbonato, hidrógeno carbonato, borato, alquil carboxilatos, dicarboxilatos, tricarboxilatos o tetracarboxilatos lineales o ramificados que contienen C_1-C_{16} orgánico, en donde el alquilo está opcionalmente sustituido con 1-3 grupos hidroxilo, 1-2 grupos amino, un grupo mercapto o metilmercapto o un grupo fenilo, más preferiblemente la parte aniónica del eluyente es acvetato y la solución de una o más sustancias iónicas, que contienen dichos cationes y aniones, presentan un pH en el rango de 5 hasta por debajo de 9 ("por debajo de 9" significa por ejemplo, un pH de 8.8), más preferiblemente en el rango de 5.5 hasta 8.5, incluso más preferiblemente de 6 hasta 8.5. Tal eluyente mantiene la teicoplanina en el rango de pH, en el que sea más estable.

Se ha encontrado inesperadamente que la combinación de ambas, una técnica de intercambio catiónico y aniónico, lleva a una pureza incrementada de la teicoplanina obtenida, especialmente con respecto a las impurezas coloreadas.

Se ha encontrado además, sorprendentemente por los inventores que las condiciones de elución específicas de la resina de intercambio catiónico y aniónico de acuerdo con la invención es particularmente efectiva en proveer teicoplanina que se caracteriza por una cantidad reducida de impurezas coloreadas.

La aplicación de métodos adicionales de aislamiento con el fin de eliminar las impurezas, sales y pirógenos de acuerdo con el ítem d) o d') puede incluir al menos uno de los siguientes métodos

d1) tratar la solución de teicoplanina con carbón;

d2) eliminar las últimas trazas de biomacromoléculas incluyendo pirógenos por ultrafiltración en membranas con un punto de corte de al menos 5000 Da;

d3) concentrar y desalinizar la solución por ultrafiltración en membranas con un corte de al menos 1000 Da;

d4) eliminar las sales y últimas trazas de biomacromoléculas por un proceso de adsorción/desorción en resinas hidrófobas

d5) extracción de impurezas por un solvente orgánico inmiscible en agua

d6) concentración de la solución, opcionalmente con intercambio parcial de los solventes.

El aislamiento del producto final de acuerdo con los ítems e) o e') puede incluir uno de los siguientes métodos:

e1) secar por aspersión la solución;

e2) liofilización de la solución;

e3) la evaporación del solvente, preferiblemente a presión reducida

e4) precipitación con un antisolvente y/o con ajuste de pH,

en donde el método más preferido incluye la opción e4), precipitación con un antisolvente, seleccionado a partir de solventes miscibles en agua tales como C_3-C_4-alcoholes, C_3-C_4-cetonas o C_2-C_4 nitrilos, preferiblemente acetona en 5-15 veces mayor volumen, preferiblemente en 10 veces mayor volumen que el volumen de la solución de teicoplanina. El producto precipitado se aísla por filtración o centrifugación y se seca in vacuo para producir un polvo blanco.

Después de cualquier etapa, seleccionada de a) a d), a') a d'), a1) a a4) y d1) a d6), el pH de la solución es opcionalmente ajustarse al valor en el que la teicoplanina es más estable, preferiblemente de 6.5 a 7.5, más preferiblemente de 6.7 a 7.1, preferiblemente mediante NaOH o HCl.

La aplicación de la técnica de intercambio de cationes o la técnica de intercambio de aniones, en combinación con los métodos seleccionados de a1) a a4), d1) a d6) y e4) reduce el nivel de impurezas en un polvo final al nivel farmacéuticamente aceptable y colores a un nivel, definido por transmitancia de una solución acuosa de 40 g/l en longitud de onda de 405 nm de al menos 40%, mientras que la combinación de técnicas tanto de intercambio de iones reduce los colores a un nivel definido por una transmitancia de más de 80% en las mismas condiciones de medición. De acuerdo con la presente invención, por la combinación de ambos, cromatografía de intercambio catiónico y aniónico la pureza del producto de teicoplanina es por lo tanto ventajosamente e inesperadamente mejorado. El uso combinado de técnicas de intercambio aniónico y catiónico, incluso sin un tratamiento de purificación refinado adicional, tal como tratamiento con carbón (véase, por ejemplo, el Ejemplo 5) sorprendentemente permite obtener teicoplanina que tiene una transmitancia notablemente mayor que, por ejemplo, teicoplanina obtenida mediante el empleo de solamente ya sea técnica de intercambio catiónico o aniónico en combinación con tal tratamiento de purificación adicional (por ejemplo, tratamiento con carbón; véase, por ejemplo, los Ejemplos 3 y 4).

Usando el proceso de la invención, se puede proveer así la teicoplanina que tiene una transmitancia de más de 80% a una longitud de onda de 405 nm tras la disolución en agua a una concentración de 40 g/l.

Con el fin de alcanzar beneficios óptimos del proceso de la invención algunas operaciones de pre-preparación se pueden aplicar dependiendo de la pureza de la fuente de teicoplanina. En la operación de acuerdo con el ítem a) resinas adsorbentes hidrófobas o ligeramente polares adecuadas y disponibles comercialmente, pueden seleccionarse de resinas de poliestireno o poliacrilato reticuladas, no iónicas, macroreticulares que tienen un radio de poro de 20 to 500 Å, seleccionadas del grupo de las marcas comerciales, pero no limitadas a, Hypersol-Macronet®, Amberlite® XAD, Diaion® HP y Sepabeads SP, o Dowex® Optipore, preferiblemente seleccionadas de la resinas que tienen un radio de poro de 100 a 500 Å seleccionadas de las marcas comeciales Amberlite® XAD16, Amberlite® XAD 1600, Amberlite® XAD 1180, Diaion® HP20, 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. Las moléculas menos polares se adsorben desde una solución acuosa que contiene no más de 30 % (v/v) de solventes miscibles con agua, preferiblemente no más de 20 % de C_1-C_4 alcoholes, acetonas o acetonitrilos, preferiblemente de metanol.

Desde la solución, el adsorbente se enlaza y por lo tanto 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 12 horas y de la manera más preferida 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 se eluye a través de una columna de dicho adsorbente, hasta la saturación del adsorbente con productos de fermentación.

Las especies adsorbidas se liberan de las resinas mediante elución con soluciones acuosas ricas en solvente orgánico, que contiene preferiblemente al menos 40% (v/v) de un solvente orgánico miscible con agua, seleccionado de C_1-C_4-alcoholes, acetona o acetonitrilo, preferiblemente de metanol. La separación de las impurezas de la teicoplanina se puede mejorar mediante elución continua a partir de una columna empacada con una resina cargada de teicoplanina, cuando el proceso se lleva de manera similar a un proceso cromatográfico, en el que la teicoplanina se eluye preferiblemente en diferentes fracciones. La separación de teicoplanina se puede mejorar mediante columnas más largas pero debe haber un compromiso entre la eficiencia de la separación y el volumen de solvente de elución, lo que puede mejorar los costes y aplicabilidad técnica. Sin embargo, una eliminación completa de las sustancias relacionadas y de una variedad de impurezas coloreadas no se puede lograr solamente mediante esta etapa.

En una realización de la invención, la solución eludida de la teicoplanina el pH está opcionalmente ajustado a 6-7 y luego concentrado a 2 - 20% (p/v), preferiblemente a 5 - 15% (p/v), lo más preferiblemente a 10% (p/v) de contenido de teicoplanina, seguido por la adición de un antisolvente, seleccionado de solventes miscibles con agua tales como C_3-C_4-alcoholes, C_3-C_4-cetonas o C_2-C_4-nitrilos, preferiblemente a partir de acetona en 5- 15 veces el volumen más grande, preferiblemente en 10 veces el volumen mayor que el volumen de una solución de teicoplanina. El precipitado se separa por filtración o centrifugación para dar el producto crudo amarillo o marrón.

En una realización preferida adicional, la solución eludida de teicoplanina el pH está ajustado a 6-7, opcionalmente diluido con agua o un solvente miscible con agua y se trató adicionalmente por carbón activo. La cantidad de carbón se agrega en 5 - 300% (p/p), `referiblemente en 50 - 100% (p/p) de una cantidad esperada de teicoplanina en la solución, y la mezcla se trata durante 5 minutos a 12 horas, preferiblemente a 0.5 - 2 horas a 0-60ºC, preferiblemente a temperatura ambiente. El carbón activo se separa entonces por filtración y la solución de teicoplanina se concentra a 2 - 20% (p/v), preferiblemente a 5 - 15% (p/v), lo más preferiblemente al 10% (p/v) de contenido de teicoplanina , seguido por la adición de un antisolvente, seleccionado de solventes miscibles con agua tales como C_3-C_4-alcoholes, C_3-C_4-cetonas o C_2-C_4-nitrilos, preferiblemente a partir de acetona en 5-15 veces mayor volumen, preferiblemente en 10 veces mayor volumen que el volumen de la solución de teicoplanina. El precipitado se separa por filtración o centrifugación para dar el producto crudo de color amarillo.

Tal proceso de adsorción/desorción en resinas hidrófobas elimina la mayor parte de los residuos de fermentación, una variedad de impurezas macromoleculares y los residuos de bajo peso molecular polares, pero no las impurezas más relacionadas y residuos no polares, en especial un poco de material de color. Aún más, sorprendentemente el tratamiento con carbón no es tan eficiente como se esperaba en la eliminación de colores, creando así una necesidad de un mayor volumen de adsorbente.

En una realización de esta invención, la teicoplanina cruda que es preparada por purificación sobre resinas hidrófobas y/o sobre carbón activo o cualquier otro método conocido para el aislamiento de productos de fermentación, pero que todavía contiene cantidades considerables de material de color, se purifica mediante el enlazamiento a una resina de intercambio catiónico con elución adicional con una solución de elución. En otra realización, la teicoplanina se enlaza a la resina mediante la adición de la resina a la solución agitada o sacudida, seguida por filtración de la resina, lavándola y liberando el producto mediante el tratamiento con una solución de elución. Preferiblemente, el tratamiento de resina de intercambio catiónico se lleva a cabo en una columna tal como se aplica en una cromatografía. La resina de intercambio catiónico se selecciona preferiblemente de una resina de intercambio catiónico de ácido, preferiblemente resinas de intercambio catiónico de ácido débil, más preferiblemente de resinas de intercambio catiónico de ácido débil macroreticular seleccionadas de, pero no limitadas a, grupos de marcas comerciales de Amberlite ® IRC, Amberlite ® FPC, Diaion® WK, Purolite® C, más preferiblemente de Amberlite IRC50, Amberlite FPC 3500™, Diaion WK 100™, más preferiblemente de Amberlite IRC50 ™ en una forma protónica.

En otra realización de esta invención, la teicoplanina cruda que es preparada por purificación sobre resinas hidrófobas y/o sobre carbón activo o cualquier otro método conocido para el aislamiento de productos de fermentación, pero que todavía contiene cantidades considerables de material de color, se purifica mediante el enlazamiento a una resina de intercambio catiónico con elución adicional con una solución de elución. En una realización de la invención, la teicoplanina se enlaza a la resina mediante la adición de la resina a la solución agitada o sacudida, seguida por filtración de la resina, lavándola y liberando el producto mediante el tratamiento con una solución de elución. Preferiblemente, el tratamiento de resina de intercambio catiónico se lleva a cabo en una columna tal como se aplica en cromatografía. La resina de intercambio catiónico se selecciona preferiblemente de una resina de intercambio aniónico básico, preferiblemente resinas de intercambio aniónico de base débil, más preferiblemente de resinas de intercambio aniónico de base débil macrorreticular seleccionadas de, pero no limitadas a, marcas comerciales de Amberlite® FPA, Dowex® Marathon, Dowex® Upcore, Diaion® WA, Purolite® A, preferinlemente Amberlite FPA51™, Amberlite FPA55™, Dowex Marathon WBA™, Purolite A830™, lo más preferiblemente de Purolite A830™.

El eluyente comprende preferiblemente 10-50%, en el caso de la técnica de intercambio catiónico 10-40%, de un solvente en agua miscible con agua, preferiblemente solución metanólica, lo más preferiblemente 20% de metanol.

En una realización preferida, el eluyente comprende un regulador de pH, lo que provee un valor de pH en el rango desde 5 hasta por debajo de 9, más preferiblemente en el rango de 5.5 a 8.5, incluso más preferiblemente de 6 a 8.5. En particular, el eluyente puede comprender además un regulador orgánico tal como, por ejemplo, Tris/HCl, Bicina, Tricina o HEPES, o similares, asegurando así un valor de pH adecuado del eluyente. En una realización preferida, el eluyente comprende un compuesto iónico, en donde el compuesto iónico es un catión seleccionado de cationes de metales alcalinos; cationes de metales alcalinotérreos; amonio; amonio mono-, di-, tri- o tetra-sustituido, en el que los sustituyentes son idénticos o diferentes y se seleccionan de C_1-C_{16}- alquilo, arilo, C_1-C_4 alquilo sustituido. En una realización particular, el catión es un catión de metal alcalino.

El compuesto iónico puede ser, además, un anión de un ácido débil seleccionado del grupo que consiste de fosfato; hidrógeno fosfato; dihidrógeno fosfato; carbonato; hidrógeno carbonato; borato; alquil carboxilatos, dicarboxilatos, tricarboxilatos o tetracarboxilatos lineales o ramificados que contienen C_1-C_{16} orgánico, en donde alquilo está opcionalmente sustituido con 1-3 grupos hidroxi, 1-2 grupos amino, un grupo mercapto o metilmercapto o un grupo fenilo. En una realización preferida, el anión es acetato.

Así, en una realización particular de la invención, una solución de una sal de un ácido débil se utiliza con el fin de estabilizar el valor de pH como se ha mencionado anteriormente, preferiblemente una sal alcalina de un ácido alifático inferior, más preferiblemente de acetato de sodio en un rango de concentración desde 0.01 hasta 0.5 mol / L, por ejemplo de acetato de sodio 0.1M.

El regulador o solución adicionado es relevante para facilitar la elución y la protección continua de moléculas sensibles de teicoplanina de los valores potenciales de pH extremos causados por elución de protones de sitios activos desocupados de intercambio iónico en una técnica de intercambio catiónico. Por otro lado, en el caso de una técnica de intercambio aniónico, se provee así que la teicoplanina sensible al pH esté protegido de sobrealcalinización de la solución eludida, lo que causaría considerable epimerización de la molécula. Por lo tanto, el regulador o solución adicionados contribuye significativamente a la obtención de una combinación única de los rendimientos mejorados de teicoplanina y las impurezas sustancialmente reducidas, en particular, impurezas coloreadas.

Las fracciones incoloras o ligeramente amarillentas, que contienen teicoplanina, se combinan, tratadas opcionalmente para eliminar las últimas trazas de macromoléculas y pirógenos y, finalmente, desalinizadas por métodos conocidos para una persona experta, tales como proceso de adsorción/desorción en resinas de adsorción (por ejemplo como se ha descrito anteriormente con respecto a la operación de pre-preparación a2)), la filtración a través de membranas, o ultrafiltración. La solución obtenida se puede concentrar a 2 - 20% (p/v), preferiblemente de 5 - 15% (p/v), lo más preferiblemente al 10% (p/v) de contenido de teicoplanina, opcionalmente ajustando la relación de solvente para tener 0-20% (v/v) de un solvente acuoso orgánico miscible en agua, preferiblemente metanol, seguido de adición de un antisolvente, seleccionados de solventes miscibles con agua tales como C_3-C_4-alcoholes, C_3-C_4-cetonas o C_2 nitrilos-C_4, preferiblemente de acetona en 5-15 veces volumen mayor, preferiblemente en 10 veces volumen mayor que el volumen de la solución de teicoplanina. Un precipitado formado puede separarse, por ejemplo, por filtración o centrifugación, para producir polvo casi blanco o ligeramente amarillento.

En una realización preferida, la solución de teicoplanina cruda se preparó previamente mediante la disolución de cualquier teicoplanina cruda sólida, incluyendo el material insuficientemente puro a partir de una fuente comercial, en una mezcla de un solvente en agua miscible con agua, preferiblemente en una solución metanólica, más preferiblemente en 20% (v/v) de metanol, seguido de dicho tratamiento por adsorción sobre una resina de intercambio catiónico. En otra realización una solución de teicoplanina se puede transferir directamente a partir de una etapa de proceso anterior, obtenida después de separar por filtración micelio y otro material insoluble a partir de un caldo de fermentación y/o después del tratamiento por adsorción sobre resina hidrófoba como se describe anteriormente y/o después del tratamiento por adsorción sobre carbón activo. La solución a partir de dichas etapas pueden ser opcionalmente concentrado y ajustado para obtener 10-40% (v/v) de solución en agua de un solvente miscible con agua, preferiblemente para obtener 10-40% (v/v) de solución metanólica, lo más preferiblemente 20% (v/v) de metanol, seguido de dicho tratamiento por adsorción sobre una resina de intercambio catiónico.

Dicho tratamiento elimina sustancialmente impurezas coloreadas con una débil o ninguna afinidad a una resina de intercambio catiónico y/o tiene al menos esencialmente diferente afinidad en comparación con teicoplanina. Tal tratamiento elimina preferiblemente impurezas no básicas, preferiblemente impurezas coloreadas oxidadas, que están estrechamente relacionados con la teicoplanina, pero que no contiene el grupo amino básico, importante para un fuerte enlazamiento a la resina de intercambio catiónico.

Impurezas coloreadas que tienen débil o ninguna afinidad a una resina de intercambio aniónico se pueden separar de la teicoplanina de una manera análoga a la anterior mediante el uso (adicional) de una técnica de intercambio aniónico.

Una realización particularmente preferida de un proceso global de la invención se muestra esquemáticamente en la Figura 3. Las líneas sombreadas en la misma representan operaciones opcionales.

La preparación de una composición farmacéutica que contiene teicoplanina de alta pureza y excipientes farmacéuticamente aceptables es un aspecto adicional de la presente invención. Una composición farmacéutica de acuerdo con 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 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 modalidad 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 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.

Ejemplos

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

Las cantidades 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 45ºC 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:

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 muestras de teicoplanina de 40 g/l en agua.

EJEMPLO 1

Aislamiento de caldo de fermentación crudo

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 el método de HPLC. 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 el método de HPLC.

EJEMPLO 2

Preparación de teicoplanina cruda

70 L de caldo de cultivo de *Actinoplanes teichomyceticus* se diluyeron con 70 L de agua desmineralizada y se filtraron usando el filtro de vacío para eliminar el micelio obteniendo 140 L de filtrado. El caldo se analizó mediante una columna de HPLC RP-C18 (4.6x250 mm). Con respecto a esto, el contenido y la cantidad total de teicoplanina en el caldo fueron de 2-3 g/L. Se agregaron 35 L de metanol a 140 L de filtrado, y la mezcla resultante se aplicó sobre una columna empacada con 11 L de Amberlite XAD 16 a una rata de flujo de 0.3 BV (volumen de lecho)/hora. Subsecuentemente, 8 BV (90 L) de agua desmineralizada se cargaron a una rata de flujo de 2 BV/hora en la columna para lavar la resina empacada en la columna.

Posteriormente 9 BV (100 L) de 30% (v/v) de metanol se cargaron a una rata de flujo de 0.5 BV/hora en la columna para lavar la resina empacada en la columna. Además 4.5 BV (50 L) de 85% (v/v) de metanol se cargó en la columna a una rata de flujo máximo de 0.5 BV/hora para eluir teicoplanina. Con respecto a esto, el contenido de la cantidad total de teicoplanina en la solución de elución fue 2.2 g/L.

Además se agregaron 70 g de Norit CA1 como un carbón activado a 35 L de la solución de teicoplanina anterior y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se filtró para eliminar el carbón activado de la mezcla resultante. El pH del filtrado resultante, con el contenido de teicoplanina 1.59 g/L, se ajustó a 7.0 usando NaOH. El filtrado se concentró usando una evaporación al vacío hasta que se alcanzó 0.7 L de concentrado. También, se agregaron lentamente 7 L de acetona al concentrado mientras que el concentrado se agitó para precipitar teicoplanina durante 3 horas. Una porción (6.7 L) de la suspensión resultante se filtró por filtro Nuch B4 para recuperar un precipitado. El precipitado se secó en un secador de vacío a 40 ºC durante 21 horas para recuperar 46.3 g de polvo de teicoplanina cruda (83% de pureza). El polvo de teicoplanina se disolvió en agua destilada para proveer una concentración de teicoplanina de 40 mg/ml. Transmitancia a 405 nm de una solución de teicoplanina fue evaluada para la eliminación de componentes coloreados. En consecuencia, el polvo de teicoplanina de la presente invención tenía una transmitancia por debajo del 17%.

EJEMPLO 3

Decoloración utilizando resina de intercambio catiónico

Se agregaron 7,3 g de Norit CA1 como un carbón activado a 3,3 L de solución de elución de teicoplanina con 2,2 g/L de teicoplanina, preparada de acuerdo con el primer párrafo de la descripción en el Ejemplo 2. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se filtró para eliminar el carbón activado de la mezcla resultante. El pH del filtrado resultante, con el contenido de 1,7 g/L de teicoplanina, se ajustó a pH 6,7 utilizando NaOH. Después el filtrado se disolvió con 10,6 L de agua desmineralizada y la solución así preparada se aplicó a una columna empacada con 0,54 L de Amberlite IRC50 (resina de intercambio catiónico) a una rata de flujo de 0,65 BV/hora. Subsecuentemente, 3 BV (1,5 L) de 20% (v/v) de metanol se cargaron a una rata de flujo de 2 BV/hora en la columna para lavar la resina empacada en la columna. Además 7,6 BV (4,1 L) de 20% (v/v) de solución de metanol que contenía 1 mol de Na-acetato se cargaron en la columna a una rata de flujo máxima de 2 BV/hora para eluir teicoplanina. El pH de la teicoplanina eludida se ajustó a 6,9 usando NaOH y la cantidad total (4,1 L) de la solución de teicoplanina eludida solución se desalinizó adicionalmente mediante la adsorción del producto a 0,1 L de Amberlite XAD16 y eluyéndolo con 85% (v/v) de metanol. Después de 0,475 L de desalinizado se obtuvieron 85% (v/v) de solución de metanol de teicoplanina (más de 98% de área de pureza por HPLC). Con respecto a esto, el contenido y la cantidad total de teicoplanina en el eluato eran 2.6 g/L y 1,05 g, respectivamente. Además se agregaron 2 g de Norit CA1 como un carbón activado a 0.4 L de la solución de teicoplanina anterior y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se filtró para eliminar el carbón activado de la mezcla resultante. El pH del filtrado resultante, con el contenido de teicoplanina se ajustó a 7.3 usando NaOH. El filtrado se concentró usando una evaporación al vacío hasta que se alcanzaron 10 ml de concentrado. El pH del concentrado resultante se ajustó a 6,9 usando NaOH. Después de 120 mL de acetona se agregaron lentamente a la mezcla agitada para precipitar teicoplanina. La suspensión se agitó durante 3 horas adicionales y la suspensión resultante se filtró a través de un filtro de B4 Nuch para recuperar un precipitado. El precipitado se secó en un secador de vacío a 40ºC durante 20 horas para recuperar 0.8 g de polvo de teicoplanina (más del 98% de área de pureza por HPLC).

El polvo de teicoplanina se disolvió en agua destilada para proveer una concentración de teicoplanina de 40 mg/ml. La transmitancia a 405 nm de una solución de teicoplanina fue evaluada para la eliminación de componentes coloreados. En consecuencia, el polvo de teicoplanina de la presente invención tenía una transmitancia del 44%.

EJEMPLO 4

Decoloración utilizando resina de intercambio aniónico

Se agregaron 1,3 g de Norit CA1 como un carbón activado a 0,6 L de teicoplanina eluyendo la solución con 2,17 g / L de teicoplanina, preparada de acuerdo con el primer párrafo de la descripción en el Ejemplo 2. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se filtró para eliminar el carbón activado de la mezcla resultante. El pH del filtrado resultante, con el contenido de 1,7 g/L de teicoplanina, se ajustó a pH 6,7 utilizando NaOH. Después el filtrado se disolvió con 0,7 L de agua desmineralizada y la solución así preparada se aplicó a una columna rellena con 0,1 L de Purolite A830 (resina de intercambio aniónico) a una rata de flujo de 0,25 BV/hora. Subsecuentemente, 3 BV (0,3 L) de 40% (v/v) de metanol se cargaron a una rata de flujo de 2,5 BV/hora en la columna para lavar la resina empacada en la columna. Además 3 BV (0,3 L) de 40% (v/v) de solución de metanol que contenía 1 mol de Na-acetato se cargaron en la columna a una rata de flujo máxima de 2 BV/hora para eluir teicoplanina. El pH de la teicoplanina eludida se ajustó a 6,9 usando NaOH y la cantidad total (0,3 L) de solución de teicoplanina eludida se diluyó además con 0,3 L de agua desmineralizada y desalinizada mediante la adsorción del producto a 0,02 L de Amberlite XAD16 y eluyendo con 85% (v/v) de metanol. Después de 0,116 L desalinizados se obtuvieron 85% (v/v) de solución de metanol de teicoplanina (con más de 90% de área de pureza por HPLC). Con respecto a esto, el contenido y la cantidad total de teicoplanina en el eluato fueron 4,31 g/L y 0,5 g, respectivamente. Adicionalmente se agregó 1 g de Norit CA1 como un carbón activado a 0,116 L de la solución de teicoplanina anterior y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se filtró para eliminar el carbón activado de la mezcla resultante. El pH del filtrado resultante, con el contenido de teicoplanina se ajustó a pH 7,0 utilizando NaOH. El filtrado se concentró usando una evaporación al vacío hasta que se alcanzaron 4 ml de concentrado. El pH del concentrado resultante se ajustó a 6,9 usando NaOH. Después se agregaron lentamente 50 ml de acetona a la mezcla agitada para precipitar teicoplanina. La suspensión se agitó durante 3 horas adicionales y la suspensión resultante se filtró a través de un filtro de B4 Nuch para recuperar un precipitado. El precipitado se secó en un secador de vacío a 40ºC durante 20 horas para recuperar 0,38 g de polvo de teicoplanina (más del 90% de área de pureza por HPLC).

El polvo de teicoplanina se disolvió en agua destilada para proveer una concentración de teicoplanina de 40 mg/ml. La transmitancia a 405 nm de una solución de teicoplanina fue evaluada para la eliminación de componentes coloreados. En consecuencia, el polvo de teicoplanina de la presente invención tenía una transmitancia del 42%.

EJEMPLO 5

Preparación de teicoplanina pura

Se disolvieron 45 g de teicoplanina cruda en polvo de acuerdo con el Ejemplo 2 en 30 L de 20% (v/v) de metanol y la solución así preparada se aplicó en una columna empacada con 3 L de Amberlite IRC50 (resina de intercambio catiónico) a una rata de flujo de 0,65 BV/hora. Subsecuentemente, 4 BV (12 L) de 20% (v/v) de metanol se cargaron a una rata de flujo de 2 BV/hora en la columna para lavar la resina empaacada en la columna. Además 10 BV (30 L) de 20% (v/v) de solución de metanol que contenía 1 mol de acetato de sodio se cargó en la columna a una rata de flujo máximo de 2 BV/hora para eluir teicoplanina. El pH de la teicoplanina eluida se ajustó a 6,7 usando NaOH y la cantidad total (30L) de la solución de teicoplanina eluida se desalinizó adicionalmente mediante la adsorción del producto a 0,7 L de Amberlite XAD16 y eluyendolo con 85% (v/v) de metanol. Después de 5,4 L desalinizados se obtuvieron 85% (v/v) de solución de metanol de teicoplanina (más de 98% de área de pureza por HPLC) y el pH de la teicoplanina eluida se ajustó a 7,1 usando NaOH. Con respecto a esto, el contenido y la cantidad total de teicoplanina en el eluato eran 4,3 g/L y 23.22 g, respectivamente.

1 L de 85% (v/v) de solución de metanol de teicoplanina desalinizada, preparada como se ha descrito anteriormente se diluyó con 1 L de agua desmineralizada y la solución así preparada se aplicó en una columna empacada con 0,5 L de Purolite A830 (resina de intercambio aniónico) a una rata de flujo de 0,25 BV/hoa. Subsecuentemente, 4 BV (2 L) de 40% (v/v) de metanol se cargaron en la rata de flujo de 2,5 BV/hora en la columna para lavar la resina empacada en la columna. Además, 4 BV (2 L) de 40% (v/v) de solución de metanol que contenía 1 mol de acetato de sodio se cargaron en la columna a una rata de flujo máximo de 2 BV/hora para eluir teicoplanina. El pH de la teicoplanina eluida se ajustó a 6,8 usando NaOH y la cantidad total (2 L) de solución de teicoplanina eluida se diluyó adicionalmente con 2L de agua desmineralizada y desalinizada mediante la adsorción del producto a 0,1 L de Amberlite XAD16 y eluyendo con 85% (v/v) de metanol. Después de 0,45 L desalinizados se obtuvieron 85% (v/v) de solución de metanol de teicoplanina (con más de 98% de área de pureza por HPLC). Con respecto a esto, el contenido y la cantidad total de teicoplanina en el eluato era de 4,58 g/L y 2,0 g, respectivamente. 0,15 L de solución de teicoplanina desalinizada fue entonces concentrada utilizando una evaporación al vacío hasta que se alcanzaron 10 ml de concentrado. El pH del concentrado se ajustó a 7,0 y se agregaron lentamente 120 mL de acetona a la mezcla agitada para precipitar teicoplanina. La suspensión se agitó durante 3 horas adicionales y la suspensión resultante se filtró por filtro B4 Nuch para recuperar un precipitado. El precipitado se secó en un secador de vacío a 40ºC durante 20 horas para recuperar 0.52 g de polvo de teicoplanina (con más de 98% de área de pureza por HPLC).

El polvo de teicoplanina se disolvió en agua destilada para proveer una concentración de la teicoplanina de 40 mg/ml. La transmitancia a 405 nm de una solución de teicoplanina fue evaluada para la eliminación de componentes coloreados. En consecuencia, el polvo de teicoplanina de la presente invención tenía, según se midió en la solución de referencia indicada, una transmitancia del 81%.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de teicoplanina purificada, comprendiendo el proceso someter la teicoplanina a una técnica de intercambio catiónico y aniónico, en donde una resina de intercambio catiónico y aniónico que tiene teicoplanina enlazada a la misma, es respectivamente tratada con un eluyente que tiene un valor de pH en el rango de 5 hasta por debajo de 9.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el eluyente tiene un valor de pH en el rango de 5.5 hasta 8.5, más preferiblemente de 6 hasta 8.5.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende las etapas, en el siguiente orden indicado, de bien sea

a) proveer teicoplanina en solución;

b) enlazar teicoplanina de la solución a una resina de intercambio catiónico, seguido por elución con dicho eluyente;

c) enlazar teicoplanina a una resina de intercambio aniónico, seguido por elución con dicho eluyente, y

d) obtener teicoplanina purificada;

o

a') proveer teicoplanina cruda en solución;

b') enlazar teicoplanina de la solución a una resina de intercambio aniónico, seguido por elución con dicho eluyente;

c') enlazar teicoplanina a una resina de intercambio catiónico, seguido por elución con dicho eluyente, y

d') obtener teicoplanina purificada.

4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la teicoplanina se provee previamente por un proceso, que incluye al menos uno de las siguientes etapas, preferiblemente una combinación de las etapas indicadas, de

a1) incubar un cultivo de fermentación de una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* que produce compuestos de teicoplanina, seguido por eliminación del material no disuelto por filtración, ultrafiltración o centrifugación;

a2) adsorber teicoplanina a una resina de adsorción hidrófoba, opcionalmente seguido por lavado de la resina, y elución de la resina mediante una mezcla de agua y solvente miscible en agua, en donde preferiblemente el solvente miscible con agua es metanol;

a3) tratar una muestra de teicoplanina con carbón vegetal;

a4) concentrar y desalinizar una solución de teicoplanina por ultrafiltración en una membrana con un corte de al menos 1000 Da.

5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra que contiene teicoplanina es tratada por al menos un método adicional de purificación antes de proceder con la, respectivamente, otra técnica de intercambio iónico, en donde preferiblemente el al menos un método adicional de purificación comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste de un tratamiento de la solución con carbón vegetal; la eliminación de biomacromoléculas mediante ultrafiltración utilizando una membrana con un corte de al menos 5000 Da; concentrar y desalinizar la solución por ultrafiltración en una membrana con un corte de al menos 1000 Da; la eliminación de sales y biomacromoléculas por un proceso de absorción/desorción en un resinas de adsorción hidrófobas; extracción de impurezas por un solvente orgánico inmiscible en agua; concentrar la solución, opcionalmente con intercambio parcial de solventes.

6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la teicoplanina purificada se aísla por cualquier método seleccionado de secado por aspersión; liofilización; evaporación del solvente, preferiblemente a presión reducida; o precipitación usando un antisolvente y/o con ajuste de pH.

7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde,

en la técnica de intercambio catiónico, dicho eluyente comprende 10-40% de un solvente en agua miscible con agua, y

en la técnica de intercambio aniónico dicho eluyente comprende 10-50% de un solvente en agua miscible con agua.

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la técnica de intercambio catiónico y/o aniónico, dicho eluyente comprende un regulador orgánico o una solución de una sal de un ácido débil.

9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, en la técnica de intercambio catiónico y/o aniónico, dicho eluyente comprende al menos un compuesto iónico, preferiblemente el compuesto iónico es un catión seleccionado de cationes de metales alcalinos; cationes de metales alcalinotérreos; amonio; amonio mono-, di-, tri- o tetra-sustituidos, en el que los sustituyentes son idénticos o diferentes y se seleccionan de C_1-C_{16}- alquilo, arilo, C_1-C_4-alquilo sustituido, y/o el compuesto iónico es un anión de un ácido débil seleccionado del grupo que consiste de fosfato; hidrógeno fosfato; dihidrógeno fosfato; carbonato; hidrógeno carbonato; borato; alquil carboxilatos, dicarboxilatos, tricarboxilatos o tetracarboxilatos lineales o ramificados que contienen C_1-C_6 orgánico, en donde alquilo es opcionalmente sustituido con 1-3 grupos hidroxi, 1-2 grupos amino, un grupo mercapto o metilmercapto o un grupo fenilo.

10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde, en la técnica de intercambio catiónico y/o aniónico, el eluyente comprende una solución de una sal alcalina de un ácido alifático inferior.

11. Teicoplanina caracteriza por tener una transmitancia de más de 80%, en longitud de onda de 405 nm tras la disolución en agua a una concentración de 40 g/l, obtenida por un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Una composición farmacéutica que comprende la teicoplanina de la reivindicación 11.

13. Un proceso para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende proveer teicoplanina como se define en la reivindicación 11 y mezclar la teicoplanina provista con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

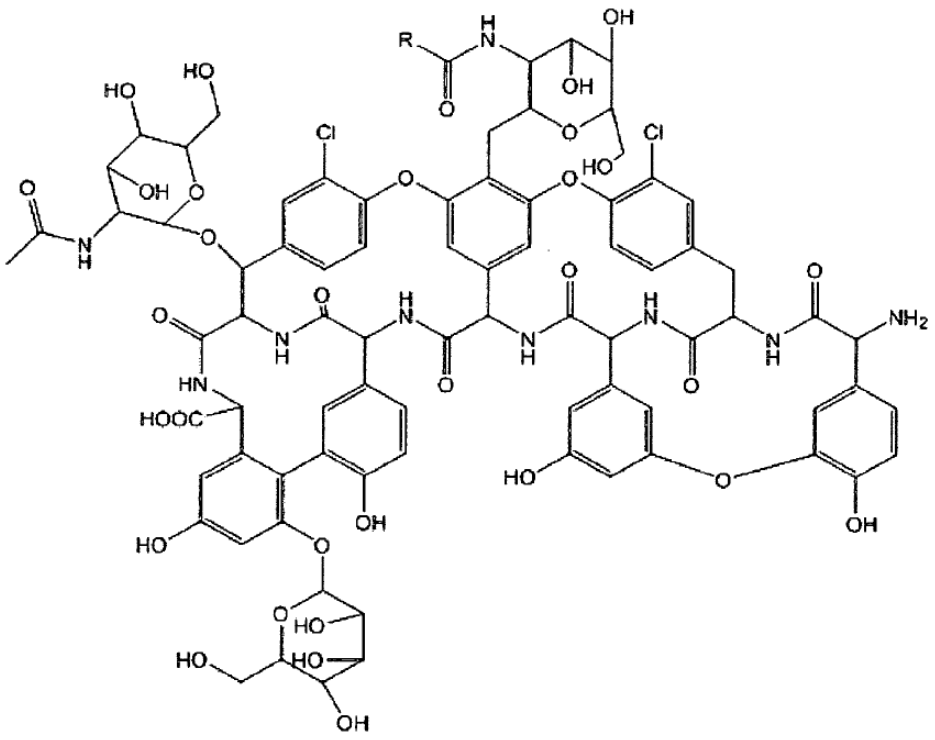

Figura 1

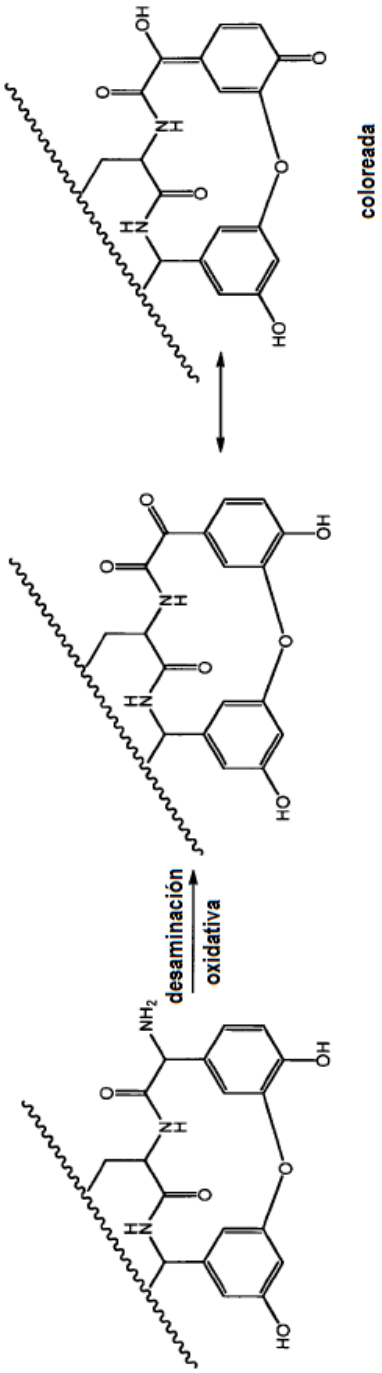

Figura 2

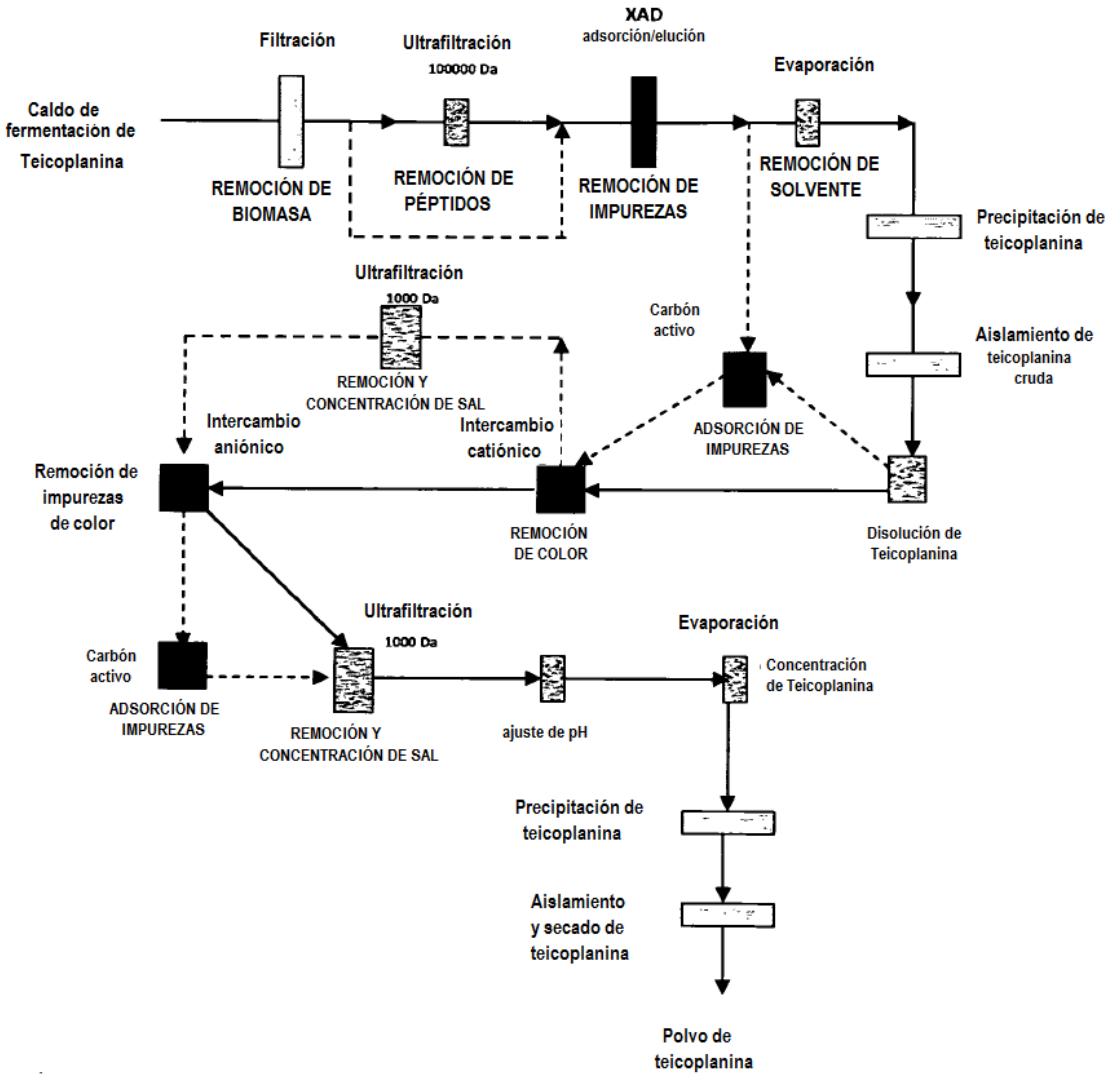
Caldo de fermentación de Teicoplanina
Filtración
REMOCIÓN DE BIOMASA
Ultrafiltración
100000 Da
REMOCIÓN DE PÉPTIDOS
XAD
adsorción/elución
REMOCIÓN DE IMPUREZAS
Evaporación
REMOCIÓN DE SOLVENTE
Precipitación de teicoplanina
Aislamiento de teicoplanina cruda
Ultrafiltración
1000 Da
REMOCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE SAL
Carbón activo
ADSORCIÓN DE IMPUREZAS
Intercambio aniónico
Intercambio catiónico
Remoción de impurezas de color
REMOCIÓN DE COLOR
Disolución de Teicoplanina
Carbón activo
ADSORCIÓN DE IMPUREZAS
Ultrafiltración
1000 Da
REMOCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE SAL
ajuste de pH
Evaporación
Concentración de Teicoplanina
Precipitación de teicoplanina
Aislamiento y secado de teicoplanina
Polvo de teicoplanina

Figura 3