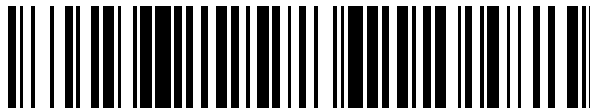


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 616**

51 Int. Cl.:

C07J 71/00 (2006.01)

C07H 15/256 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2010 PCT/US2010/047104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11028654**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2010 E 10814329 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2473169**

54 Título: **Procedimientos para el aislamiento y purificación de enfumafungina**

30 Prioridad:

03.09.2009 US 239517 P

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

17.10.2019

73 Titular/es:

**SCYNEXIS, INC. (100.0%)
1 Evertrust Plaza, 13th Floor
Jersey City, NJ 07302, US**

72 Inventor/es:

**POLLARD, JENNIFER, M.;
CHMIELOWSKI, REBECCA, A.;
DEITRICH, LISA, M.;
GAILLIOT, FRANCIS, P. y
GOKLEN, KENT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 727 616 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

Procedimientos para el aislamiento y purificación de enfumafungina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos útiles en el aislamiento y purificación de enfumafungina, que está clasificada como un compuesto antifúngico de glicósido de triterpeno y actúa como inhibidor de la glucano sintasa. La enfumafungina es útil en el tratamiento de afecciones causadas por infección fúngica, y también es útil como compuesto intermedio en la preparación de otros compuestos útiles como agentes antifúngicos y/o inhibidores de la síntesis de (1,3)- β -D-glucano.

Antecedentes de la invención

10 La infección fúngica es un problema sanitario muy importante, y la incidencia de enfermedades fúngicas adquiridas en hospitales continúa aumentando. La infección fúngica sistémica grave en hospitales (tal como candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis, blastomicosis y coccidioidomicosis) Se ve habitualmente en pacientes neutropénicos después de quimioterapia y en otros pacientes de oncología con supresión inmunitaria, en pacientes que están inmunocomprometidos debido al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) causado por infección por HIV, y
15 en pacientes en cuidados intensivos. Las infecciones fúngicas sistémicas causan aproximadamente el 25% de las muertes relacionadas con infección en los leucémicos. Las infecciones debidas a la especie *Candida* son la cuarta causa más importante de infección nosocomial de la corriente sanguínea. Las infecciones fúngicas graves pueden causar el 5 a 10% de las muertes en pacientes que se someten a trasplante de pulmón, páncreas o hígado. Los fallos de los tratamientos son aún muy comunes con todas las micosis sistémicas. También surge resistencia secundaria.
20 Por tanto, sigue habiendo una creciente necesidad de una nueva terapia contra las infecciones micóticas y de procedimientos para aislar y purificar compuestos útiles en tal terapia.

La enfumafungina es un glicósido de triterpeno hemiacetal que se produce en fermentaciones de una *Hormonema spp.* asociada con hojas vivas de *Juniperus communis*. Véase la patente de EE.UU. 5.756.472; Fernando Peláez et al., The Discovery of Enfumafungin, a Novel Antifungal Compound Produced by an Endophytic *Hormonema* Species
25 Biological Activity and Taxonomy of the Producing Organisms, 23 SYSTEM. APPL. MICROBIOL. 333 (2000); Robert E. Schwartz et al., Isolation and Structural Determination of Enfumafungin, a Triterpene Glycoside Antifungal Agent That Is a Specific Inhibitor of Glucan Synthesis, 122 J. AM. CHEM. SOC. 4882 (2000); Robert E. Schwartz, Cell wall active antifungal agents, 11(11) EXPERT OPIN. THER. PATENTS 1761 (2001). La enfumafungina es uno de los diversos glicósidos de triterpeno que tienen actividades antifúngicas in vitro. Se determinó que el modo de la acción antifúngica de la enfumafungina y otros glicósidos triterpenoides antifúngicos es la inhibición de la síntesis de glucano de la pared celular fúngica por su acción específica sobre la (1,3)- β -D-glucano sintasa. Véase J. Onishi et al., Discovery of Novel Antifungal (1,3)- β -D-Glucan Synthase Inhibitors, 44(2) ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 368 (2000); Pelaez et al., Systematic and Applied Microbiology, 23:333-343, 2000). La (1,3)- β -D-glucano sintasa sigue siendo una diana atractiva para la acción de los fármacos antifúngicos, porque está presente en muchos hongos patógenos, lo que proporciona un amplio espectro antifúngico, y porque no hay homólogos en los mamíferos. Por
30 tanto, estos compuestos tienen poca o ninguna toxicidad basada en mecanismos.

Debido a la conveniencia de los inhibidores de glicano sintasa como agentes antifúngicos, hay una necesidad de procedimientos económicos para aislar y purificar enfumafungina y otros productos naturales, tanto para uso como
40 agentes antifúngicos y/o inhibidores de la glicano sintasa como para uso como compuestos intermedios para la preparación de otros compuestos que puedan usarse como agentes antifúngicos y/o inhibidores de la glicano sintasa.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento que es útil en el aislamiento y purificación de enfumafungina, que es útil como agente antifúngico y/o inhibidor de la glicano sintasa. También se describen procedimientos que proporcionan compuestos intermedios útiles en la producción de agentes antifúngicos y/o inhibidores de la glicano sintasa. Los procedimientos descritos proporcionan ventajas sobre procedimientos conocidos previamente, porque los
45 procedimientos reivindicados producen enfumafungina de alta pureza (fórmula I más adelante).

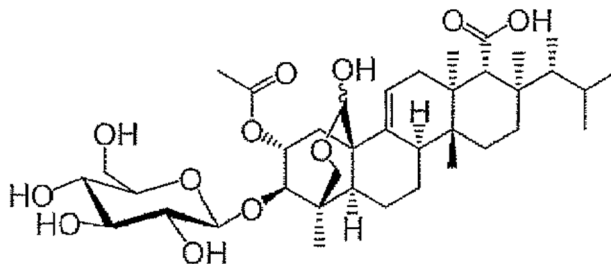
Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento según aspectos de la primera realización de la invención.

50 La Figura 2 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento según aspectos de la segunda realización de la invención.

Descripción detallada de la invención

Una primera realización de la invención se refiere a un procedimiento para aislar un compuesto de fórmula I:



procedimiento que comprende:

- a) realizar una extracción con disolvente sobre un caldo de fermentación que comprende células que contienen un compuesto de fórmula I para producir un líquido orgánico que contiene el compuesto de fórmula I;
 - 5 b) concentrar el líquido orgánico que contiene el compuesto de fórmula I;
 - c) realizar una extracción con disolvente sobre el líquido concentrado para producir una capa acuosa A¹ que contiene el compuesto de fórmula I;
 - d) ajustar el pH de la capa acuosa A¹ a un intervalo de 2 a 4 por adición de ácido;
 - e) añadir heptano a la capa acuosa A¹ y retirar la capa de heptano;
 - 10 f) realizar una extracción con disolvente sobre la capa acuosa A¹ para producir una capa orgánica O² que contiene el compuesto de fórmula I y una capa acuosa A²;
 - g) concentrar la capa orgánica O² para producir una capa concentrada que contiene el compuesto de fórmula I;
 - h) precipitar el compuesto de fórmula I de la capa concentrada; y
 - i) cristalizar el compuesto de fórmula I precipitado.
- 15 en donde en la etapa c) la extracción con disolvente se realiza añadiendo una disolución de bicarbonato, metanol y heptano; en donde dicha disolución de bicarbonato comprende 5 por ciento en peso o más de bicarbonato, y en donde:
- (1) dicha disolución de bicarbonato se añade en una relación de volumen de 0,5 a 2 veces el volumen de dicho líquido,
 - (2) dicho metanol se añade como 10 a 50 por ciento en volumen del volumen de dicho líquido, y
 - (3) dicho heptano se añade como 5 a 85 por ciento en volumen del volumen de dicho líquido.
- 20 En un primer aspecto de la primera realización, la etapa a) se realiza usando un disolvente en combinación que consiste en 100 a 75 por ciento en volumen de un disolvente principal y 0 a 25 por ciento en volumen de un co-disolvente; dicho disolvente principal elegido del grupo que consiste en metiletilcetona, isobutanol, acetato de etilo y acetato de isopropilo, y dicho co-disolvente elegido del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, acetona y acetonitrilo. En aspectos particulares de esta realización, dicha etapa a) se realiza a un pH en un intervalo de 3 a 8 y
- 25 una temperatura en un intervalo de 10°C a 40°C. En este aspecto de la primera realización, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general de la realización.
- En un segundo aspecto de la primera realización, la etapa b) comprende concentrar el extracto hasta una concentración que es de 5 a 25 veces una concentración inicial, pero dando como resultado una concentración de producto no mayor que aproximadamente 10 g/l. En este aspecto de la primera realización, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general de la realización o en el primer aspecto de esta realización.
- 30 En un tercer aspecto de la primera realización, la etapa e) se realiza añadiendo heptano y se realiza a una temperatura de 15°C a 25°C. En casos particulares de este aspecto, el heptano se añade en una relación de volumen de 0,5 a 1 veces el volumen de la capa acuosa A¹. Esto es, el volumen de heptano añadido es de aproximadamente una mitad a aproximadamente el mismo volumen de la capa acuosa A¹ antes de la adición de heptano. En este aspecto de la primera realización, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general de la realización o en uno cualquiera o más del primer al segundo aspectos de esta realización.
- 35 En un cuarto aspecto de la primera realización, la etapa f) se realiza por adición de un disolvente de extracción seleccionado del grupo que consiste en metiletilcetona, acetato de etilo y acetato de isopropilo. En casos particulares de este aspecto, el disolvente de extracción se añade en una relación de volumen de aproximadamente 0,25 a 1 veces el volumen de la capa acuosa A¹. Esto es, el volumen del disolvente de extracción añadido es de un cuarto al mismo volumen de la capa acuosa A¹ antes de la adición del disolvente de extracción. En este aspecto de la primera realización, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general de la realización o en uno
- 40

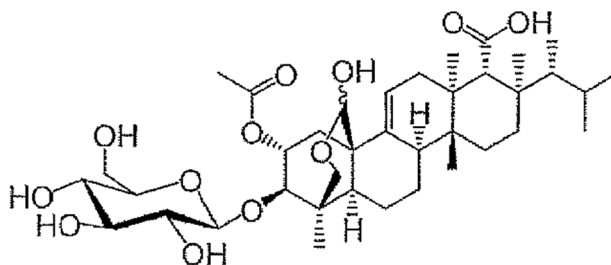
cualquiera o más del primer al tercer aspecto de esta realización.

5 En un quinto aspecto de la primera realización, la etapa g) comprende concentrar el extracto hasta una concentración que es de aproximadamente 25 a aproximadamente 65 veces una concentración inicial del extracto; esto es, concentrar el extracto hasta una concentración de producto en un intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 g/l. En casos particulares de este aspecto, la concentración se continúa hasta que el nivel de agua es menos que aproximadamente 1%. En todos los casos de este aspecto, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general de la realización o en uno cualquiera o más del primer al cuarto aspectos de esta realización.

10 En un sexto aspecto de la primera realización, la etapa h) comprende (1) añadir acetato de isopropilo a la capa concentrada, (2) añadir heptano para precipitar el compuesto de fórmula I de la capa concentrada, (3) filtrar el compuesto de fórmula I precipitado, (4) lavar el compuesto de fórmula I precipitado con heptano, y (5) secar el compuesto de fórmula I precipitado a vacío. En casos particulares de este aspecto, añadir acetato de isopropilo da como resultado una concentración de acetato de isopropilo que es menos que aproximadamente 60%. En este aspecto de la primera realización, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general de la realización o en uno cualquiera o más del primer al quinto aspectos de esta realización.

15 En un séptimo aspecto de la primera realización, la etapa i) comprende cristalizar en metanol. En este aspecto de la primera realización, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general de la realización o en uno cualquiera o más del primer al sexto aspectos de esta realización.

También se describe un procedimiento para aislar un compuesto de fórmula I:



- 20 procedimiento que comprende:
- a) realizar una extracción con disolvente sobre un caldo de fermentación que comprende células que contienen un compuesto de fórmula I para producir un líquido que contiene el compuesto de fórmula I;
 - b) retirar los sólidos del líquido;
 - 25 c) disminuir la concentración del disolvente del líquido;
 - d) hacer pasar el líquido a través de una columna de pretratamiento de extracción en fase sólida;
 - e) disminuir la concentración del disolvente del líquido;
 - f) ajustar el pH del líquido a un intervalo de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5;
 - 30 g) hacer pasar el líquido a través de una columna de extracción en fase sólida para capturar fracciones de producto que contienen el compuesto de fórmula I;
 - h) combinar las fracciones de producto para producir una fracción de producto combinada que contiene el compuesto de fórmula I;
 - i) realizar una extracción con disolvente para producir una capa orgánica y una capa acuosa básica que contiene el compuesto de fórmula I;
 - 35 j) ajustar el pH de la capa orgánica de la etapa i) para que esté en un intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5;
 - k) realizar una extracción con disolvente para producir una capa orgánica que contiene el compuesto de fórmula I y una capa acuosa ácida;
 - 40 l) concentrar la capa orgánica de la etapa k) para producir una capa concentrada que contiene el compuesto de fórmula I;
 - m) añadir heptano a la capa concentrada para precipitar el compuesto de fórmula I; y

n) recristalizar el precipitado del compuesto de fórmula I desde metanol para producir cristales del compuesto de fórmula I.

5 En un primer aspecto del segundo procedimiento descrito la etapa a) se realiza por (1) a un pH en un intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, (2) a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 10°C a aproximadamente 50°C, y (3) usar un único disolvente seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, acetona y acetonitrilo. En este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general.

10 En un segundo aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa a) comprende además ajustar una relación de composición de agua a disolvente del líquido a aproximadamente 30 a aproximadamente 70 por ciento en volumen de disolvente. En este aspecto del segundo procedimiento descrito todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en el primer aspecto del mismo.

En un tercer aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa b) comprende retirar los sólidos por centrifugación. En este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en cualquiera o ambos del primer o segundo aspectos del mismo.

15 En un cuarto aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa c) comprende disminuir la concentración de disolvente por adición de agua o por concentración a vacío. En casos particulares del cuarto aspecto, la relación de composición de agua a disolvente se aumenta en aproximadamente 5 a aproximadamente 20% en volumen de disolvente. Esto es, la cantidad de agua presente se aumenta con respecto a la cantidad de disolvente presente, bien por adición de agua o bien por retirada de disolvente por un método apropiado tal como destilación. En todos los casos de este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en uno cualquiera o más del primer al tercer aspecto del mismo.

20 En un quinto aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa d) se realiza a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C. En casos particulares del quinto aspecto, se usa un disolvente de extracción seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, acetona y acetonitrilo. En casos particulares del quinto aspecto, el disolvente de extracción es acetona. En todos los casos de este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o uno cualquiera o más del primero al cuarto aspectos del mismo.

30 En un sexto aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa e) comprende disminuir la concentración de disolvente por adición de agua o por concentración a vacío. En casos particulares del sexto aspecto, la relación de composición de agua a disolvente se aumenta en aproximadamente 5 a aproximadamente 20% en volumen de disolvente. Esto es, la cantidad de agua presente se aumenta con respecto a la cantidad de disolvente presente, bien por adición de agua o bien por retirada de disolvente por un método apropiado tal como destilación. En todos los casos de este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o uno cualquiera o más del primer al quinto aspectos del mismo.

35 En un séptimo aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa f) se realiza a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C. En este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en uno cualquiera o más del primer al sexto aspectos del mismo.

40 En un octavo aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa g) se realiza por (1) lavar la columna de extracción en fase sólida con un disolvente que comprende aproximadamente 30 por ciento en volumen de acetona; (2) lavar la columna de extracción en fase sólida con un disolvente que comprende aproximadamente 40 por ciento en volumen de acetona; y (3) eluir el compuesto de fórmula I de la columna de extracción en fase sólida con una disolución que comprende aproximadamente 60 por ciento en volumen de acetona en disolución de bicarbonato de sodio. En este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en uno cualquiera o más del primer al séptimo aspectos del mismo.

45 En un noveno aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa i) comprende además (1) lavar la fracción de producto combinada con una primera disolución de heptano y acetato de isopropilo para producir una capa acuosa y una capa orgánica; (2) retirar la capa acuosa de la capa orgánica; (3) ajustar el pH de la capa acuosa de (2) a un intervalo de aproximadamente 8,25 a aproximadamente 9,25; (4) lavar la capa acuosa de (2) con una segunda disolución de heptano y acetato de isopropilo para producir una capa acuosa y una capa orgánica; y (5) retirar la capa acuosa de (5) de la capa orgánica de (5). En este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en uno cualquiera o más del primer al octavo aspectos de esta realización.

55 En un décimo aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa j) comprende ajustar el pH de la capa acuosa de la etapa i) a un intervalo de aproximadamente 2,75 a aproximadamente 3,25. En este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en uno cualquiera o más del primer al noveno aspectos del mismo.

En un undécimo aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa j) se realiza a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C. En este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en uno cualquiera o más del primer al décimo aspectos del mismo.

5 En un duodécimo aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa k) comprende añadir acetato de isopropilo a la capa acuosa de la etapa j) para extraer el compuesto de fórmula I en la capa orgánica. En casos particulares de este aspecto, la etapa k) se realiza a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C. En todos los casos de este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en uno cualquiera o más del primer al décimo aspectos del mismo.

10 En un decimotercer aspecto del segundo procedimiento descrito, la etapa l) comprende concentrar el extracto orgánico hasta aproximadamente 40 g/l. En este aspecto del segundo procedimiento descrito, todas las demás etapas son como se describieron en el procedimiento general o en uno cualquiera o más del primer al undécimo aspectos del mismo.

También se describen compuestos preparados usando los procedimientos del método reivindicado y su uso como agentes antifúngicos. Véase Fernando Peláez et al., The Discovery of Enfumafungin, a Novel Antifungal Compound Produced by an Endophytic Hormonema Species Biological Activity and Taxonomy of the Producing Organisms, 23 SYSTEM. APPL. MICROBIOL. 333 (2000); las solicitudes de patente internacionales WO2007/127012; WO2007/126900; WO2009/045311. En estos usos, tales compuestos pueden emplearse opcionalmente en combinación, bien secuencialmente o bien al mismo tiempo, con uno o más agentes terapéuticos eficaces contra infecciones fúngicas/bacterianas.

20

Aislamiento y purificación de enfumafungina

La enfumafungina es un producto natural producido a partir de una cepa de *Hormonema carpetanum*, MF 6176 en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., que ha sido depositada bajo el Tratado de Budapest en la colección de cultivos del American Type Culture Collection el 23 de enero de 1996, en 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 y número de accesión asignado ATCC 74360. Aunque la invención se discute principalmente con respecto a la cepa específica, es bien sabido en la técnica que las propiedades de los microorganismos pueden variarse naturalmente y artificialmente. Por tanto, todas las cepas derivadas de *Hormonema carpetanum* MF 6176, ATCC 74360, incluyendo variedades, mutantes y otros microorganismos que producen enfumafungina, ya sean obtenidos por selección natural, producidos por la acción de agentes de mutación, tales como radiación ionizante o irradiación ultravioleta, o por la acción de mutágenos químicos, tales como nitrosoguanidina, pueden usarse como fuente para producir enfumafungina, que se purifica como se describe en la presente memoria.

30

Procedimientos generales

Procedimiento 1

Cultivo de *Hormonema sp.*

35 *Hormonema sp.* MF 6176, ATCC 74360, puede cultivarse en un medio nutriente adecuado, que incluye los descritos en la patente de EE.UU. N° 5.756.472. Las Tablas que presentan medios sólidos y líquidos adecuados representativos, incluyendo un medio de siembra representativo, se reproducen en la presente memoria como Tablas 1-3.

TABLA 1

MEDIO DE SIEMBRA KF		Mezcla de elementos traza	
	por litro		por litro
Licor de maceración de maíz	5 g	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 g
Pasta de tomate	40 g	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	1 g
Harina de avena	10 g	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	25 mg
Glucosa	10 g	CaCl ₂	100 mg
Mezcla de elementos traza	10 ml	H ₃ BO ₃	56 mg
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	19 mg
pH = 6,8		ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	200 mg

TABLA 2

MEDIO DE PRODUCCIÓN SÓLIDO

Componente	por matraz de 250 ml
Arroz integral	10 g
Extracto de levadura	20 mg
Tartrato de sodio	10 mg
KH ₂ PO ₄	10 mg
Agua destilada	20 ml

El pH no se ajustó antes del tratamiento en autoclave durante 20 minutos.

- 5 Inmediatamente antes del uso, el medio se humedeció con 15 ml de agua destilada y se trató en autoclave de nuevo durante 20 minutos.

TABLA 3

MEDIO DE PRODUCCIÓN LÍQUIDO

Componente	por litro
Glucosa	50 g
Triptófano	1 g
Extracto de levadura Fidco	10 g
NZ-Amina (tipo E)	33 g
Sulfato de amonio	5 g
KH ₂ PO ₄	9 g

El pH se ajustó a 6,2 con NaOH antes del tratamiento en autoclave.

- 10 De manera general, el cultivo se cultiva primero en un medio de siembra y el crecimiento del cultivo se usa después para inocular un medio de producción. El medio de producción puede ser un medio sólido o un medio líquido. En un cultivo representativo, se preparan micelios vegetativos del cultivo inoculando 54 ml de medio de siembra (Tabla 1) en un matraz Erlenmeyer sin deflectores de 250 ml con 2 ml de micelios en glicerol al 10% que habían sido almacenados a -80°C. Los cultivos de siembra se incuban durante 3 días a 25°C y 85% de humedad relativa en un agitador rotatorio con un recorrido de 5 cm a 220 rpm en una sala con luz fluorescente constante. Se usan porciones del cultivo de 2 ml para inocular un cultivo de siembra de segunda fase y se incuba adicionalmente durante 3 días con las condiciones apuntadas anteriormente. Se usan porciones de 2 ml de este cultivo de 3 días para inocular porciones de 50 ml del medio de producción líquido (Tabla 3) o medio de producción sólido a base de arroz (Tabla 2) en matraces Erlenmeyer sin deflectores de 250 ml.
- 15
- 20 El cultivo bruto de células (caldo entero) se usa en los métodos de purificación descritos a continuación.

Procedimiento 2: Aislamiento de enfumafungina, primera realización

Extracción de enfumafungina del caldo de fermentación.

- 25 El aislamiento de enfumafungina comienza con una extracción con disolvente para retirar el producto del caldo de fermentación. Esta extracción se lleva a cabo usando una combinación de disolventes. Una extracción con disolventes en combinación usa un disolvente principal acompañado de un co-disolvente, que representa de aproximadamente 0 a aproximadamente 25 por ciento en volumen (porcentaje en volumen o % vol) del volumen de disolvente total. Los disolventes principales que pueden usarse en una extracción con disolventes en combinación son metiletilcetona (MEK), isobutanol, acetato de etilo (EtAc), acetato de isopropilo (IPAc o IPAC), mientras que los co-disolventes incluyen metanol (MeOH), etanol (EtOH), isopropanol, acetona y acetonitrilo. El pH de la extracción varía de

aproximadamente 3 a aproximadamente 8, mientras que la temperatura varía de 10 a 40°C. La relación de disolvente a caldo entero varía de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2.

Aislamiento del producto bruto

5 Los sólidos celulares gastados de la extracción con disolventes se separan usando centrifugación. Si se usa un disolvente inmiscible con el agua para la extracción (bien en solitario o bien en combinación con otro disolvente), entonces la capa acuosa se descarta con los sólidos celulares gastados durante la centrifugación. El extracto se concentra hasta un volumen que se reduce de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 veces el volumen original usando destilación a vacío para retirar el agua y permitir volúmenes de procesamiento más pequeños. La concentración de producto no debe exceder de aproximadamente 10 g/l.

10 El producto se extrae en una fase acuosa por la adición de aproximadamente 5 por ciento en peso (% p) o más de disolución de bicarbonato (relación en volumen aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 al líquido extraído), metanol (aproximadamente 10 a aproximadamente 50 por ciento en volumen del volumen de la disolución de bicarbonato), y heptano (aproximadamente 5 a aproximadamente 85 por ciento en volumen del volumen del líquido extraído) y se mezcla durante al menos 30 minutos. El heptano puede ser sustituido por cualquier combinación de heptanos para cualquier etapa de extracción o precipitación en este aislamiento. La capa acuosa, que contiene el producto, se separa de la capa orgánica, y el pH se ajusta entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 usando una disolución ácida. La capa orgánica que contiene impurezas se descarta.

20 Se añade heptano (aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 volumen) a la capa de producto ácida a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C y se mezcla durante al menos 30 minutos. La capa de heptano se separa de la capa acuosa del producto. El producto se extrae posteriormente en una fase orgánica a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C añadiendo un disolvente (aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 volumen) de uno de los siguientes disolventes: acetato de etilo, acetato de isopropilo y MEK. La fase acuosa gastada resultante que contiene impurezas polares se descarta después.

25 El extracto orgánico resultante se concentra usando destilación a vacío hasta un intervalo de concentraciones de producto de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 g/l. Se añade acetato de isopropilo (de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 por ciento en volumen) al concentrado a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 55°C para impedir que el producto forme un aceite y salga de la disolución durante la adición de heptano. Se añade heptano (de aproximadamente 5 a aproximadamente 85 por ciento en volumen) para precipitar el producto, y actúa como antidisolvente. Los sólidos del producto se filtran, se lavan con heptano y se secan a vacío. La pureza del sólido varía de aproximadamente 30 a aproximadamente 70% en peso.

Cristalización

El procedimiento de cristalización implica disolver los sólidos del protocolo de aislamiento del producto bruto en metanol hasta una concentración de aproximadamente 120 a aproximadamente 160 g/l a aproximadamente 50°C. Puede emplearse la adición de semilla (de aproximadamente 0 a aproximadamente 1% en peso), pero es opcional. 35 La disolución se enfría hasta aproximadamente 20°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas y se mantiene a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 1 hora. La suspensión se calienta de nuevo hasta aproximadamente 50°C durante aproximadamente 15 a aproximadamente 60 minutos y se mantiene a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 30 minutos. Este aumento de temperatura se repite al menos dos veces más. Cuando el aumento de temperatura se termina, la suspensión se enfría hasta una temperatura entre 40 aproximadamente -5 y aproximadamente -15°C durante aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas y se mantiene a esta temperatura durante al menos 1 hora. Los cristales del producto se filtran, se lavan con metanol y se secan a vacío. La pureza y el rendimiento del sólido varían de aproximadamente 90 a aproximadamente 99% en peso y de aproximadamente 65 a aproximadamente 80% respectivamente. El nivel de impureza de análogos se reduce en esta cristalización a menos que aproximadamente 2 A% por análisis HPLC.

45 Procedimiento 3: Aislamiento de enfumafungina, segunda realización – no según la invención

Extracción de enfumafungina.

El aislamiento de enfumafungina comienza con una extracción con disolvente para producir un líquido que contiene el compuesto de fórmula I. Esta extracción se lleva a cabo usando un único disolvente. Se usan los siguientes disolventes para extraer el producto: metanol, etanol, isopropanol, acetona y acetonitrilo. La composición de disolvente a agua es dependiente del disolvente seleccionado. Un disolvente típico usado para la extracción es acetona, con una 50 composición de disolvente a agua de aproximadamente 45 por ciento en volumen, es decir, aproximadamente 45% de agua y aproximadamente 55% de acetona. El pH de la extracción varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, mientras que la temperatura varía de aproximadamente 10°C a aproximadamente 50°C. Los sólidos insolubles se retiran después por centrifugación.

55 Aislamiento del producto bruto

Después de la retirada de los sólidos, la composición de agua a disolvente se ajusta después de aproximadamente

45 a aproximadamente 50 por ciento en volumen de disolvente (por ejemplo, de aproximadamente 48 a aproximadamente 52 por ciento en volumen) y se hace pasar a través de una columna de pretratamiento de extracción en fase sólida a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C. Esta columna de pretratamiento se usa para retirar impurezas que son más no polares que el compuesto de fórmula I del extracto. El extracto pretratado se concentra usando una destilación a vacío hasta un intervalo de composición de agua a disolvente de aproximadamente 65 a aproximadamente 75 por ciento en volumen. Alternativamente, puede añadirse agua para conseguir la misma composición. El pH del concentrado se ajusta entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5 con ácido y se hace pasar a través de una columna de extracción en fase sólida en modo de captura a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C (de aproximadamente 139 a aproximadamente 554 cm/h, de aproximadamente 3 a aproximadamente 13 g/l de carga). Después de la carga, la columna se lava con de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 volúmenes de columna (CVs) de aproximadamente 30 por ciento en volumen de acetona y de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 CVs de aproximadamente 45 por ciento en volumen de acetona. El producto se eluye con de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 CVs de aproximadamente 60 por ciento en volumen de acetona en disolución de bicarbonato de sodio. La columna se regenera con de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 CVs de 80 por ciento en volumen o 100 por ciento en volumen de acetona.

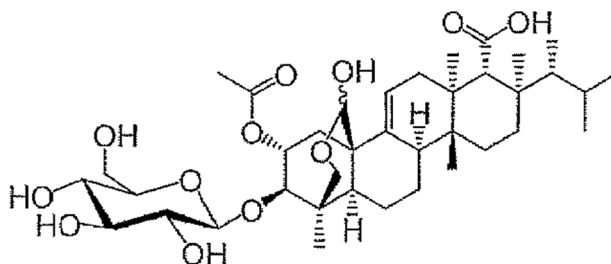
Las fracciones de producto de la columna de captura se reúnen. Si están presentes impurezas no polares en las fracciones de producto reunidas, estas fracciones se ajustan en pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7 con ácido y se lavan con aproximadamente 90 por ciento en volumen de heptano / aproximadamente 10 por ciento en volumen de acetato de isopropilo (de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 volumen de lavado) a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C. La capa acuosa del producto se separa de la capa orgánica y se ajusta a un intervalo de pH de aproximadamente 8,25 a aproximadamente 9,25 usando base. La capa del producto se lava con aproximadamente 75 por ciento en volumen de acetato de isopropilo / aproximadamente 25 por ciento en volumen de heptano (de 0,5 a 1 volumen de lavado) a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C. La capa acuosa del producto se separa de la capa orgánica y se ajusta a un intervalo de pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5 usando ácido. El producto se extrae de la capa acuosa por la adición de acetato de isopropilo (de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 volumen) a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C. El extracto orgánico se concentra hasta aproximadamente 40 g/l y se añade de aproximadamente 0 a aproximadamente 30 por ciento en volumen de heptano para completar la precipitación del producto. Los sólidos del producto se filtran, se lavan con heptano y se secan a vacío. La pureza del sólido varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 85% en peso.

Cristalización

El método de cristalización implica disolver los sólidos del segundo aislamiento del producto bruto en metanol hasta una concentración de aproximadamente 70 a aproximadamente 100 g/l a aproximadamente 55°C. Se añade semilla (de aproximadamente 0 a aproximadamente 3% en peso) a la disolución. La suspensión se enfría hasta aproximadamente 25°C durante al menos 1 hora. La suspensión se concentra a vacío hasta una concentración de aproximadamente 140 a aproximadamente 160 g/l. Después de la concentración, la suspensión se enfría hasta una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C y se envejece durante al menos 12 horas. Los cristales del producto se filtran, se lavan con metanol y se secan a vacío. La pureza del sólido varía de aproximadamente 90 a aproximadamente 99% en peso.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar un compuesto de fórmula I:



procedimiento que comprende:

- 5 a) realizar una extracción con disolvente sobre un caldo de fermentación que comprende células que contienen un compuesto de fórmula I para producir un líquido orgánico que contiene el compuesto de fórmula I;
- b) concentrar el líquido orgánico que contiene el compuesto de fórmula I;
- c) realizar una extracción con disolvente sobre el líquido concentrado para producir una capa acuosa A¹ que contiene el compuesto de fórmula I, en donde dicha extracción con disolvente se realiza añadiendo disolución de bicarbonato, metanol y heptano; en donde dicha disolución de bicarbonato comprende 5 por ciento en peso o más de bicarbonato, y en donde:
- 10 (1) dicha disolución de bicarbonato se añade en una relación de volumen de 0,5 a 2 veces el volumen de dicho líquido,
- (2) dicho metanol se añade como 10 a 50 por ciento en volumen del volumen de dicho líquido, y
- 15 (3) dicho heptano se añade como 5 a 85 por ciento en volumen del volumen de dicho líquido;
- d) ajustar el pH de la capa acuosa A¹ a un intervalo de 2 a 4 por adición de ácido;
- e) añadir heptano a la capa acuosa A¹ y retirar la capa de heptano;
- f) realizar una extracción con disolvente sobre la capa acuosa A¹ para producir una capa orgánica O² que contiene el compuesto de fórmula I y una capa acuosa A²;
- 20 g) concentrar la capa orgánica O² para producir una capa concentrada que contiene el compuesto de fórmula I;
- h) precipitar el compuesto de fórmula I de la capa concentrada; y
- i) cristalizar el compuesto de fórmula I precipitado.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicha etapa a) se realiza usando un disolvente en combinación que consiste en 100 a 75 por ciento en volumen de un disolvente principal y 0 a 25 por ciento en volumen de un co-disolvente; dicho disolvente principal elegido del grupo que consiste en metiletilcetona, isobutanol, acetato de etilo y acetato de isopropilo, y dicho co-disolvente elegido del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, acetona y acetonitrilo.
- 25 3. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicha etapa a) se realiza a un pH en un intervalo de 3 a 8 y una temperatura en un intervalo de 10°C a 40°C.
- 30 4. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde la etapa e) se realiza a una temperatura de 15°C a 25°C, en donde dicho heptano se añade en una relación de volumen de 0,5 a 1 veces el volumen de la capa acuosa A¹.
5. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicha etapa f) se realiza por adición de un disolvente de extracción seleccionado del grupo que consiste en metiletilcetona, acetato de etilo y acetato de isopropilo.
- 35 6. El procedimiento según la reivindicación 5, en donde dicho disolvente de extracción se añade en una relación de volumen de 0,25 a 1 veces el volumen de la capa acuosa A¹.
7. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicha etapa h) comprende:
- (1) añadir acetato de isopropilo a la capa concentrada,
- (2) añadir heptano para precipitar el compuesto de fórmula I de la capa concentrada,

- (3) filtrar el compuesto de fórmula I precipitado,
 - (4) lavar el compuesto de fórmula I precipitado con heptano, y
 - (5) secar el compuesto de fórmula I precipitado a vacío.
8. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicha etapa i) comprende cristalizar en metanol.

Diagrama de flujo del aislamiento de enfumafungina, primera realización

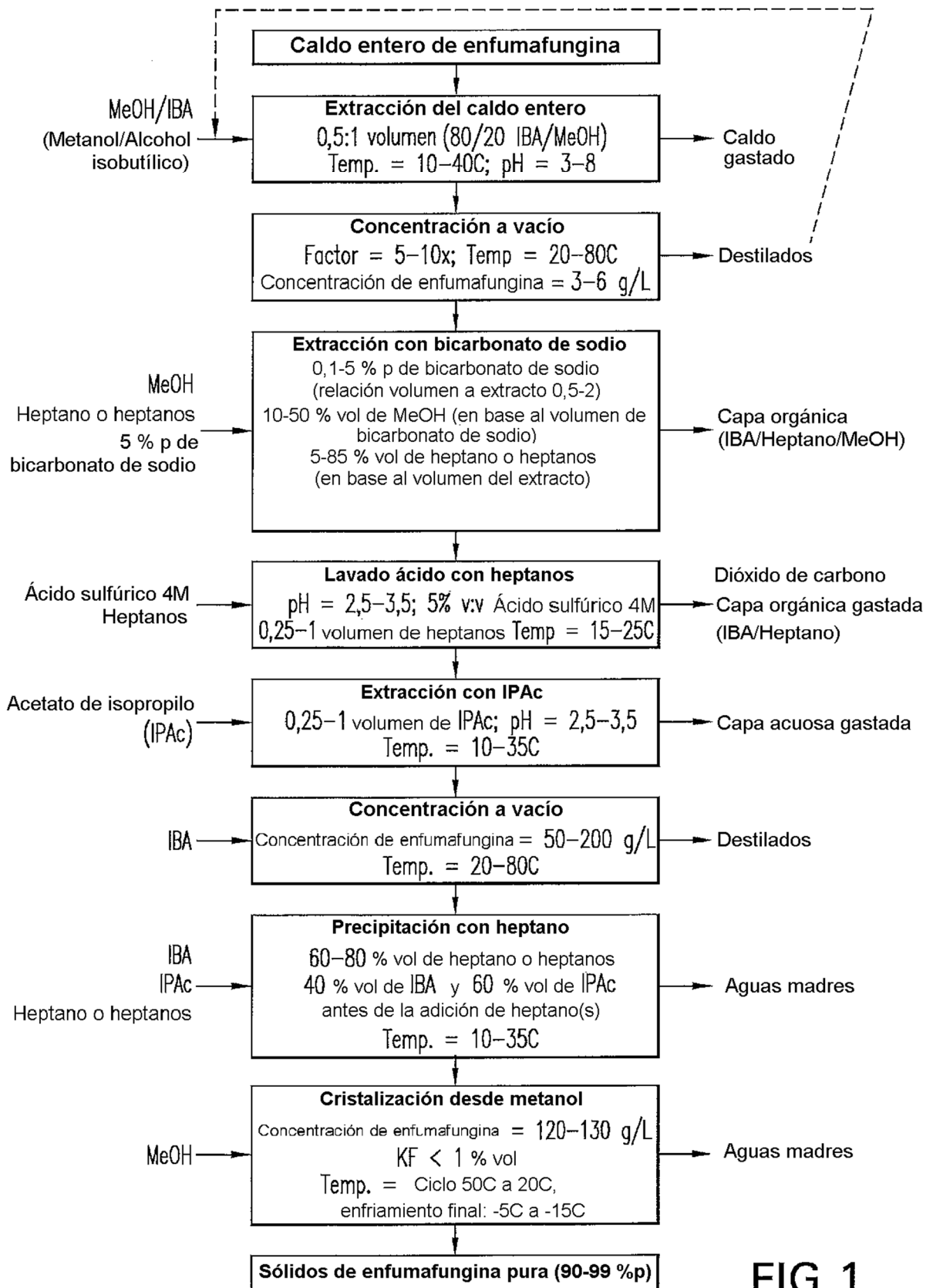


FIG. 1

Diagrama de flujo del aislamiento de enfumafungina, segunda realización

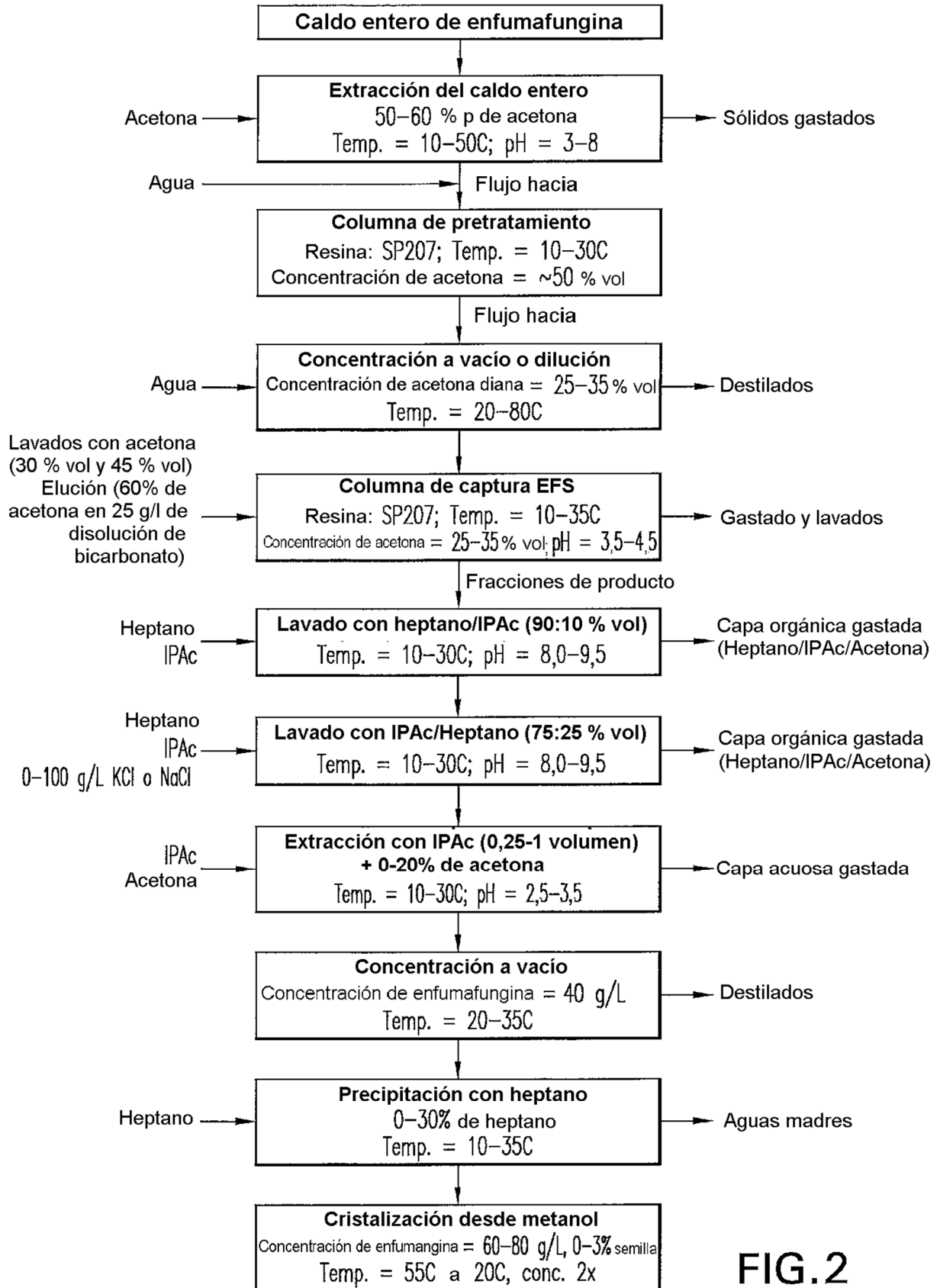


FIG.2