



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 350 865**

(51) Int. Cl.:  
**C07K 7/62** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07748761 .9**

(96) Fecha de presentación : **11.05.2007**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2021355**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2009**

(54) Título: **Método de recuperación de la polimixina B a partir de un caldo de fermentación.**

(30) Prioridad: **02.06.2006 SK 832006**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.01.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.01.2011**

(73) Titular/es: **BIOTIKA A.S.**  
**Patent And Trademark Agency Radlinskeho 9**  
**811 07 Bratislava, SK**

(72) Inventor/es: **Varga, Ivan;**  
**Jakubcova, Maria;**  
**Bobalova, Maria y**  
**Michalkova, Eva**

(74) Agente: **No consta**

ES 2 350 865 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).

## MÉTODO DE RECUPERACIÓN DE LA POLIMIXINA B A PARTIR DE UN CALDO DE FERMENTACIÓN

### Descripción

5

#### Sector técnico al que pertenece la invención

La presente invención se refiere a un método de recuperación de la polimixina B a partir de un caldo de fermentación.

10 

#### Técnica previa

La polimixina es un complejo de antibióticos polipeptídicos muy similares aislados a partir de diferentes tipos de cepas de *Bacillus polymixa* y especies relacionadas. Es un polipéptido cíclico con grupos aminoácido libres que contiene constituyentes característicos tales como al ácido  $\alpha,\gamma$ -aminobutánico, la L-treonina y  
15 ácidos grasos (ácido 6-metiloctanoilo, ácido 3-hidroxi-6-metiloctanoilo, ácido 6-metilheptanoilo, ácido heptanoilo, ácido octanoilo, ácido nonanoilo). Este complejo se ha dividido mediante PLRP-S semi-preparativa con fase inversa en 7 componentes (Orwa J.A, Govaert C., Busson R. y otros, 2001, J. Chromatography A, 912, 369-373). La estructura se ha caracterizado mediante métodos de RNM  $H^1$  y  $C^{13}$  y el peso  
20 molecular se ha determinado mediante el método de espectroscopía de masas. La estructura de la polimixina fue B<sub>1</sub>, Ile-B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, y B<sub>4</sub>. En este estudio se aislaron y caracterizaron por primera vez dos compuestos adicionales, la polimixina B<sub>5</sub> y B<sub>6</sub>.

Las polimixinas B y E poseen una toxicidad menor que otras polimixinas y son las preferentes para el uso médico, principalmente la polimixina B que es más  
25 efectiva como antibacteriano.

El proceso de recuperación de la polimixina a partir de un caldo de fermentación se basa fundamentalmente en la aplicación de carbón activado y el intercambio iónico. La patente US 2 565 057 describe un tipo de base antibiótica

polipeptídica como producto metabólico de *Bacillus aerosporus* y *Bacillus polymyxa*, también se proporciona un listado de métodos para su recuperación a partir del medio de cultivo utilizando la capacidad de absorción del carbón activado. La primera parte de las impurezas se separa del filtrado del caldo de cultivo mediante carbón activado en medio ácido (pH 2,5). La solución decolorada de antibiótico se ajusta a pH neutro y a continuación es adsorbida sobre carbón activado. El antibiótico adsorbido es eluido mediante una solución acuosa de ácido acetona. El eluato es purificado mediante ajuste del pH, separación de la acetona y readsorción sobre carbón activado y neutralización del eluato con  $\text{CaCO}_3$  y se finaliza con la liofilización de la solución de antibiótico. Otra alternativa para la purificación del antibiótico a partir del eluato es una preparación de sus sales insolubles, tal como por ejemplo mediante coagulación con ácido pícrico, y reconversión de esta sal en sales solubles en agua habitualmente en forma de sulfatos (M. Harold y otros: Antibiótica ĆsAV Praha, 1957, página 285-288).

En dos patentes adicionales (GB 742 589 y GB 783 926) los filtrados del caldo de fermentación se purifican en intercambiadores iónicos de ácidos débiles en diferentes sistemas de columna. La polimixina adsorbida se eluye con una solución de ácido inorgánico o solución tampón con un pH entre 3 y 5. El eluato obtenido se purifica en un intercambiador aniónico o en un intercambiador catiónico de ácido fuerte. Este eluato repurificado se concentra y la polimixina se coagula mediante la adición de una solución alcalina. La coagulación se produce a una temperatura entre 60°C y 90°C.

La patente US 3132994 (1964) describe un método para incrementar la purificación de los N-metilsulfonatos y los sulfatos crudos de polimixina B y E. La base de este método es la oxidación de estas soluciones de sales en pH neutro o ácido (pH entre 3,5 y 7,5) con una solución acuosa de  $\text{KMnO}_4$  al 1%. En la etapa siguiente se separan los productos de bajo peso molecular, incluyendo los cationes de  $\text{Mn}^{2+}$  en un intercambiador catiónico de ácido fuerte en ciclo  $\text{H}^+$  en el que la polimixina no es adsorbida.

En la patente GB 979 887 (1964) se describe el procedimiento para la recuperación y purificación de antibióticos del grupo anfotem y alcalinos, incluyendo la polimixina B, utilizando la extracción reactiva en solventes orgánicos limitada con una mezcla acuosa y la extracción en presencia de los soportes éster di-(2-etilhexilo) o éster dinonilo del ácido fosfórico. La polimixina B se extrae a partir del caldo de cultivo en una solución de éster di-(2-etilhexilo) del ácido fosfórico al 1% en acetato de butilo a pH 7. En las patentes GB 1089765 (1967) y US 3413398 se describe la purificación de las polimixinas B y E a partir de las soluciones ácidas mediante reactivos alcalinos en presencia de agentes quelantes para formar complejos de cationes Ca, Mg, Mn, y Fe. El antibiótico es un precipitado en un forma de solución básica utilizando agentes alcalinos tales como hidróxidos y carbonatos de metales alcalinos e hidróxido de amonio a un pH entre 8,5 y 11 y la adición de agentes quelantes para evitar la precipitación concomitante de impurezas. Se describe el listado completo de agentes quelantes, que se utilizan para ser añadidos en una proporción equivalente a los iones inorgánicos polivalentes presentes. La precipitación de la base de antibiótico puede realizarse en una solución acuosa de acetona al 10%. Los ejemplos de estas patentes describen métodos para la purificación de la polimixina B, en los que la solución ácida de polimixina B cruda se oxida con  $\text{KMnO}_4$ , de acuerdo con la patente GB 991602. El  $\text{KMnO}_4$  sobrante se elimina con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El procedimiento continúa con la precipitación de la base en presencia de la sal tetra sódica del ácido etilendiamina-N-N-N-N' tetraacético. La base es filtrada, lavada y secada al vacío. La base se convierte en sulfato de polimixina B mediante el equivalente molar de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

En los procedimientos descritos de recuperación de la polimixina B en forma de sustancia sólida a partir de caldo de cultivo, el caldo de cultivo es purificado mediante métodos complicados obteniéndose el antibiótico crudo. El antibiótico crudo debe purificarse en varias etapas para obtener la sustancia pura.

Descripción de la invención

Las desventajas mencionadas son eliminadas mediante el método de recuperación de la polimixina B a partir del caldo de fermentación de acuerdo con la presente invención tal como se define en las reivindicaciones 1 a 5, de acuerdo con las  
5 reivindicaciones 1 a 5, el filtrado del caldo de fermentación se purifica en adsorbentes sintéticos no ionógenos del tipo poliestireno, la polimixina B es eluída a partir del adsorbente mediante una solución acuosa de solvente orgánico, la base de polimixina B es precipitada a partir del eluato, a continuación es convertida con un ácido inorgánico en una sal inorgánica de polimixina B, a partir de la cual se obtiene una sustancia  
10 cristalina mediante secado.

Se separan la biomasa y los componentes insolubles del medio de cultivo. El filtrado obtenido se ajusta a un valor de pH entre 2 y 6 y eventualmente se decolora con carbón activado en una cantidad entre 1 y 5 g por  $\text{dm}^3$  de filtrado previamente al tratamiento siguiente. El filtrado decolorado o no decolorado a un pH entre 2 y 6,  
15 preferentemente entre 2,5 y 3,5, se purifica en adsorbentes de poliestireno sintético no ionógenos con una superficie específica entre 500 y 1000  $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$  y un radio de poro entre 3 y 30 nm.

La polimixina B adsorbida es eluída con una solución acuosa ácida o no ácida de un solvente orgánico a una concentración entre el 20 y 60% a un pH entre 2 y 4,  
20 particularmente con cetona o alcohol inferior, preferentemente con metanol, etanol, propanol, propanol secundario y acetona.

A partir del eluato agua-orgánico obtenido, o a partir del eluato tras la separación parcial o total del solvente orgánico, se coagula la base de polimixina B mediante la adición de una solución acuosa de un agente alcalino inorgánico,  
25 preferentemente NaOH, KOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$  a un pH entre 8 y 12, preferentemente a un pH entre 9 y 11. La base se coagula a una temperatura entre 20 y 60°C. Se filtra la base de polimixina B coagulada y se lava con agua desionizada a una temperatura entre 30 y 80°C. Se añade a la base de polimixina B lavada, o eventualmente a la suspensión

acuosa de la base, una solución de ácido inorgánico, tal como HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, hasta alcanzar un valor de pH entre 5 y 7,5. La solución obtenida de polimixina B se decolora eventualmente mediante carbón activado en una cantidad entre 0,1 y 0,5 g por gramo de polimixina B y se seca la solución pura de sustancia.

5 La presente invención se suplementa con ejemplos.

### Ejemplos de realizaciones

#### Ejemplo 1

Se separó la biomasa mediante centrifugación a partir de 2,1 dm<sup>3</sup> de caldo de fermentación con 3,1 g de polimixina B. Se acidificó el sobrenadante con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% hasta alcanzar un pH de 3, se añadieron 4 g de carbón activado y tras 30 minutos se filtró la solución. El filtrado transparente decolorado se pasó a través de una columna cargada con 500 mL de adsorbente no ionógeno Diaion HP 21, a una velocidad de flujo de 2 dm<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>. Tras la adsorción, la columna se lavó con 500 mL de agua desionizada. La polimixina B adsorbida se eluyó con una solución acuosa de acetona al 40% a una velocidad de flujo de 0,5 dm<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>. Se obtuvieron 0,84 dm<sup>3</sup> de eluato con una cantidad de polimixina B de 2,2 g. Se añadió al eluato bajo agitación muy lenta y a temperatura de laboratorio una solución acuosa de NaOH al 20% hasta alcanzar un valor de pH de 11. Tras 2 horas de cristalización, se filtró la base de polimixina B y se lavó con 2 dm<sup>3</sup> de agua desionizada caliente a una temperatura de 70°C. Se obtuvieron 20 g de base de polimixina B en forma de producto húmedo, que se mezclaron conjuntamente con 5 mL de agua desionizada y se añadió lentamente una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% hasta que se produjo sulfato de polimixina B. Se añadieron 0,5 g de carbón activado a 50 mL de solución de sulfato de polimixina a un pH de 6, y tras 45 minutos se filtró la suspensión. A continuación se filtró la solución decolorada a través de una membrana con unos tamaños de fibra de 0,45 µm y 0,22 µm. El producto se recuperó mediante liofilización. Se obtuvieron 1,7 g de sulfato de polimixina B con una pureza de 7.900 U.I./mg.

## Ejemplo 2

Del eluato preparado de acuerdo con el ejemplo 1, se separó la acetona mediante destilación al vacío. Se obtuvieron 0,5 dm<sup>3</sup> de concentrado, que se ajustaron a un pH de 7,5 con NH<sub>4</sub>OH concentrado a una temperatura de 60°C, añadiéndose a  
5 continuación una solución de NaOH al 20% hasta alcanzar un pH final de 12. Tras 2 horas de cristalización a una temperatura de 40°C se obtuvo la base de polimixina, que se filtró y lavó 5 veces con 0,3 dm<sup>3</sup> de agua desionizada a una temperatura de 30°C. Se obtuvieron 15 g de coagulado húmedo, que se recuperó de acuerdo con el ejemplo 1. Se obtuvieron 1,3 g de sulfato de polimixina B con una pureza de 8.100 U.I./mg.

10

## Ejemplo 3

Procedimiento de acuerdo con el ejemplo 1 con la diferencia de que se utilizó etanol al 60% para la elución. Se obtuvieron 0,58 dm<sup>3</sup> de eluato, que se recuperó de acuerdo con el ejemplo 1 con la diferencia de que la base de polimixina se precipitó con  
15 NH<sub>4</sub>OH hasta alcanzar un valor de pH de 8. Se obtuvieron 1,2 g de sulfato de polimixina B con una pureza de 7.200 U.I./mg.

## Ejemplo 4

A partir de 4 dm<sup>3</sup> de caldo de fermentación con una cantidad de 4,4 g de  
20 polimixina B a un pH de 6 se obtuvieron mediante microfiltración 4,2 dm<sup>3</sup> de filtrado transparente, que se acidificó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta alcanzar un pH de 3. Se añadieron a la solución 21 g de carbón activado y tras 1 hora de mezclado se filtró la solución. El filtrado decolorado se pasó a través de una columna cargada con 1,2 dm<sup>3</sup> de adsorbente no ionógeno Amberlite XAD-4. Tras lavar la columna con agua desionizada se eluyó la  
25 polimixina B con una solución acuosa de propanol secundario al 60%. Se obtuvieron 1,2 dm<sup>3</sup> de eluato, que se ajustó a un pH de 10,8 con una solución de NaOH. La base obtenida se separó mediante centrifugación y se lavó con agua desionizada caliente, siendo el pH del agua lavada de 7,8. Se obtuvieron 25 g. de base húmeda que se mezcló

conjuntamente con 10 mL de agua desionizada. Se añadió lentamente una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10% hasta obtener una solución de sulfato de polimixina B al alcanzar un pH de 7. Se decoloró la solución de sulfato de polimixina B (70 mL) con 0,3 g de carbón activado, se filtró a través de la membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  y se liofilizó. Se obtuvieron 2,4 g de sulfato de polimixina B con una pureza de 7.700 U.I./mL.

#### Aplicabilidad industrial

El método de recuperación de la polimixina B según la presente invención puede utilizarse para la recuperación del antibiótico puro a partir de un caldo de fermentación.

### REIVINDICACIONES

1. Método para la recuperación de polimixina B a partir de un caldo de fermentación caracterizado porque el filtrado, que se obtiene del caldo de fermentación, es purificado en adsorbentes sintéticos no ionógenos del tipo poliestireno con una superficie específica entre 500 y 1000 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> y un radio de poro entre 3 y 30 nm, la polimixina B es eluída a partir de dicho adsorbente mediante una solución acuosa de un solvente orgánico, la polimixina B es coagulada a partir del eluato y convertida mediante un ácido inorgánico en una solución de polimixina B, a partir de la cual se seca la polimixina B hasta que ésta cristaliza.
2. Método, según la reivindicación 1, caracterizado porque el filtrado, que se obtiene del caldo de fermentación, se ajusta a un valor de pH entre 2 y 6 y, eventualmente, se decolora con carbón activado en una cantidad entre 1 y 5 g, por 1 dm<sup>3</sup> de filtrado.
3. Método, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la solución acuosa de solvente orgánico que se utiliza para la elución de la polimixina B a partir del adsorbente es una cetona o alcohol inferior tal como metanol, etanol, propanol, propanol secundario, acetona a una concentración entre el 20 y el 60% en peso.
4. Método, según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la base de polimixina B se coagula a partir del eluato acuoso-orgánico o a partir del eluato tras la separación parcial o total del solvente orgánico mediante el ajuste del pH de la solución a un valor entre 8 y 12, a una temperatura entre 20 y 60 °C.
5. Método, según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la base de polimixina B se convierte en polimixina B mediante la adición de un ácido inorgánico hasta que el pH de la solución alcanza un valor entre 5 y 7,5.