

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.08.01	(73) Titular(es): OLON S.P.A.	
(30) Prioridade(s):	STRADA RIVOLTANA KM. 6/7 20090 RODANO	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.02.03	(MI)	IT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.03.23 073/2011	(72) Inventor(es): GIANLUCA BERTETTI ANTONELLA MALCANGI ROBERTO MURACA GUIDO TRIONE ALESSIA ROSSI	IT IT IT IT IT
	(74) Mandatário: JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES AV. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 131, 7º - C 1700-173 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO MELHORADO PARA A PRODUÇÃO DE DAPTOMICINA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO MELHORADO PARA A PRODUÇÃO DE DAPTOMICINA MEDIANTE FERMENTAÇÃO COM STREPTOMYCES ROSEOSPORUS, NA PRESENÇA DE N-DECANAL OU ÓLEO DE CUPHEA COMO FONTES DA CADEIA LATERAL DE N-DECANOÍLO. ESTES REAGENTES PERMITEM REDUZIR OS EFEITOS DE TOXICIDADE SOBRE AS BACTÉRIAS E EVITAR A UTILIZAÇÃO DE SOLVENTES NA SOLUÇÃO DE ALIMENTAÇÃO.

DESCRIÇÃO

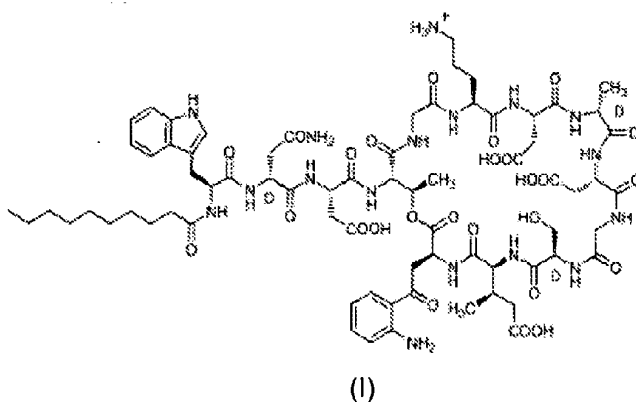
PROCESSO MELHORADO PARA A PRODUÇÃO DE DAPTOMICINA

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a um processo melhorado para a produção de daptomicina mediante fermentação com *Streptomyces roseosporus*, utilizando fontes alternativas da cadeia lateral de n-decanoílo.

Antecedentes da invenção

A-21978C₁₀, conhecido como daptomicina, é um antibiótico peptídico cíclico de 13 aminoácidos de fórmula (I)



que contém uma cadeia lateral de n-decanoílo unida ao triptófano N-terminal.

A daptomicina produz-se mediante fermentação submergida de *Streptomyces roseosporus*, em particular estirpes NRRL 11379 (ATCC 31568) e NRRL 15998, assim como qualquer mutante, variante e recombinante das mesmas.

A produção de daptomicina em cultura submersa revelou-se por primeira vez nos documentos US 4.331.594 e US 4.800.157.

O documento US 4.885.243 revela a preparação de daptomicina mediante fermentação descontínua alimentada, em que alimenta-se o ácido decanóico, utilizado como fonte da cadeia lateral de n-decanoílo, como uma solução num solvente orgânico, concretamente oleato de metilo. A presença do solvente na solução de alimentação é necessária, porque o ácido decanóico é um sólido ceroso à temperatura de fermentação e somente soluções que contêm pelo menos 50% de solvente são suficientemente fluidas para se alimentar. Não obstante, inclusive na presença de um solvente, a temperaturas inferiores a 25°C é difícil manter uma alimentação constante e homogénea, porque o ácido decanóico se pode separar da solução ou formar flocos e flóculos. O ácido decanóico exerce um efeito tóxico sobre a bactéria e por este motivo, a velocidade de alimentação deve manter-se sob controlo estrito.

Descrição da invenção

Verificou-se agora que os inconvenientes mencionados anteriormente podem superar-se utilizando fontes alternativas da cadeia lateral de n-decanoílo, concretamente decanal (n-decaldeído, caprinaldeído, aldeído cáprico) ou óleo de *Cuphea*. Por conseguinte, numa primeira forma de realização, a presente invenção refere-se a um processo para a preparação de daptomicina mediante fermentação de *Streptomyces roseosporus* na presença de n-decanal; numa segunda forma de realização a invenção

refere-se a um processo para a preparação de daptomicina mediante fermentação de *Streptomyces roseosporus* na presença de óleo de *Cuphea*. Estirpes de *Streptomyces roseosporus* particularmente adequadas para levar a cabo o processo são NRRL 11379 (ATTC 31568), NRRL 15998 e mutante B8.

Na primeira forma de realização, pode alimentar-se n-decanal ou como uma solução orgânica num solvente orgânico adequado, tal como oleato de metilo, etanol, acetato de etilo, preferivelmente oleato de metilo, ou sem solventes, devido a que o n-decanal é líquido a temperatura ambiente e não se produz a separação de flocos ou a formação de flóculos.

De facto, *S. roseosporus* pode converter enzimaticamente o aldeído em ácido, que então se une ao N-triptófano terminal; indica-se que esta conversão não se produz com fontes de C10 diferentes, por exemplo, decanol. A utilização de n-decanal permite aumentar a produtividade de 10% a 30% com respeito a 50% de ácido decanóico + 50% de oleato de metilo, provavelmente devido ao facto de que este aldeído é líquido, de modo que se dispersa no caldo de fermentação e está mais biodisponível. Além disso, n-decanal é menos tóxico que o ácido n-decanóico: de facto, no microscópio, os micélios aparecem menos fragmentados ou vacuolizados e esta toxicidade reduzida permite manter uma velocidade de produção satisfatória durante um período maior.

Na segunda forma de realização, utiliza-se óleo de *Cuphea*, como tal ou dissolvido num solvente orgânico ou

misturado com outro óleo vegetal. O óleo de *Cuphea* adequado para levar a cabo a invenção pode derivar-se das sementes de várias espécies de *Cuphea*, tais como *C. lanceolata*, *C. viscosissima* e *C. koehneana* ou espécies híbridas obtidas das mesmas. Os solventes orgânicos adequados são, por exemplo, oleato de metilo, etanol, acetato de etilo, preferivelmente oleato de metilo; óleos vegetais adequados são, por exemplo, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de palma; entretanto, já que o óleo de *Cuphea* é fluido a temperatura ambiente, alimenta-se preferivelmente como tal. O óleo de *Cuphea* contém triglicéridos com ácidos gordos de diferentes comprimentos que se hidrolisam pelo microorganismo e se utilizam para a síntese de daptomicina. Encontrou-se surpreendentemente que o óleo de *Cuphea* tem uma toxicidade tão baixa sobre o microorganismo que se tolera a sua acumulação na fermentação; portanto, a diferença de ácido decanóico/oleato de metilo, não é necessário o controlo estrito da velocidade de alimentação e o processo pode levar-se a cabo de maneira descontínua, isto é introduzindo todo o substrato no começo da fermentação; isto significa que não se requer um tanque de alimentação, um dispositivo de alimentação e controlos durante a adição.

No processo da invenção, também se pode alimentar uma fonte de carbono necessária para o metabolismo primário do microorganismo, como glicerol, junto com n-decanal ou óleo de *Cuphea*, alcançando assim um melhor equilíbrio entre o crescimento do microorganismo e a produção de daptomicina.

A partir do anterior parece que o processo da invenção é vantajoso a escala industrial, já que é mais conveniente

de levar a cabo e más barato, principalmente devido ao facto de que se pode evitar a utilização de solventes e que as fontes de carbono têm uma toxicidade limitada sobre o microorganismo. A utilização de n-decanal puro é particularmente vantajosa porque o microorganismo se alimenta com 100% de fonte de C10.

A invenção será ilustrada em maior detalhe por meio dos seguintes exemplos.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 - Decanal + oleato de metilo

1A: NRRL11379 de *Streptomyces roseosporus* num fermentador de 20 l

Armazenou-se uma cultura mãe de *Streptomyces roseosporus* sob nitrogénio, utilizou-se então para inocular uma primeira fase de fermentação vegetativa. Incubou-se o meio semeado, cuja composição notifica-se nas tabelas 1 e 2, num balão de fundo redondo de 2 l, que continha 450 ml de caldo, a 30°C durante 40 h sobre um agitador giratório com uma velocidade de agitação de 150 rpm.

Tabela 1: Meio

COMPONENTE	1 l
Dextrose	20 g
Farinha de soja	20 g
Extracto de levedura	1 g
KH_2PO_4	0,22 g
CaCO_3	2 g
Solução salina	2 ml
Sem ajuste de pH	
Esterilização 121°C x 20 min.	

Tabela 2: Solução salina

COMPONENTE	100 ml
FeSO_4	0,2 g
HCl (37%)	2 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
KCl	10 g
Esterilização 121°C x 20 min.	

No final da incubação, utilizou-se a fase crescida para semear um fermentador de produção (capacidade de 20 l, volume de trabalho de 15 l) que continha um meio que tinha a seguinte composição (tabela 3).

Tabela 3: Meio de produção

COMPONENTE	g/l
Farinha de soja	22
Fe (NH ₄) ₂ SO ₄	0,66
pH ajustado a 7,0	
KH ₂ PO ₄ (opcional)	0,22
Dextrose	8,25
Dextrina de batata	33
Melaços	2,75
Voranol	0,8
Esterilização 121°C x 45 min.	

Levou-se a cabo a incubação da fase de produção sob as seguintes condições: 30°C, 1 vvm, agitação de 150+350 rpm e contrapressão de 0,5 bar. Manteve-se o pH a 6,5 mediante adição de uma solução de hidróxido de amónio.

Após 18 h, quando a concentração em glucose do meio diminuiu abaixo de 3-4 g/l, alimentou-se o fermentador com uma solução que continha 50% de decanal e 50% de oleato de metilo (v/v) a uma velocidade de fluxo que oscilava desde 3 até 7 ml/h.

A produção de daptomicina começou após 40 h e alcançou uma produtividade de 0,6 g/l em 186 h.

1B: NRRL11379 de *Streptomyces roseosporus* num fermentador de 1000 l

Armazenou-se *Streptomyces roseosporus* sob nitrogénio. Utilizou-se então a cultura mãe para inocular a primeira fase de fermentação vegetativa. Incubou-se o meio semeado

previamente, cuja composição notifica-se na tabela 4, num balão de fundo redondo de dois (2 l), que continha 450 ml de caldo, a 30°C durante 40 h num agitador giratório com uma velocidade de agitação de 150 rpm.

Tabela 4: Meio semeado previamente

COMPONENTE	1 l
Bactotripton	17 g
Peptona	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Dextrose	2,75 g
Amido de batata	25 g
Sem ajuste de pH	
Esterilização 121°C x 20 min.	

Ao final da incubação, utilizou-se o inóculo para semear uma segunda fase vegetativa num fermentador de 100 l (volume de trabalho de 60 l) que continha um meio que tinha a seguinte composição (tabela 5).

Tabela 5: Meio semeado

COMPONENTE	1 l
Dextrose	22 g
Farinha de soja	20 g
Extracto de levedura	1 g
CaCO ₃	2 g
Voranol	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg

KCI	200 mg
Sem ajuste de pH	
Esterilização 121°C x 30 min.	

Levou-se a cabo a incubação da fase semeada sob as seguintes condições: 30°C, 0,8 vvm, agitação de 160 rpm e contrapressão de 0,8 bar e durante um tempo que oscilava desde 22 até 28 h.

Ao final da incubação, utilizou-se a fase semeada para o inóculo da fase de produção num fermentador de 1000 l (volume de trabalho de 600 l) que continha um meio que tinha a seguinte composição (tabela 6).

Tabela 6: Meio de produção

COMPONENTE	g/l
Farinha de soja	22
Fe (NH ₄) ₂ SO ₄ • 6H ₂ O	0,7
Voranol	1
pH ajustado a 7,0	
Dextrose	9,1
Dextrina de batata	33
Melaços	2,8
Esterilização 121°C x 45 min.	

Levou-se a cabo a incubação da fase de produção sob as seguintes condições: 30°C, 0,5 vvm, agitação de 120÷160 rpm e contrapressão de 0,7 bar.

Manteve-se o pH a 6,5 mediante adição de uma solução de hidróxido de amónio.

Após 24 h, quando a concentração em glucose do meio diminuiu abaixo de 3-4 g/l, alimentou-se o fermentador com uma solução de alimentação que continha 50% de decanal e 50% de oleato de metilo (v/v) a uma velocidade de fluxo que oscilava desde 180 até 210 ml/h.

A produção de daptomicina começou após 40 h e alcançou uma produtividade de 460 mcg/ml em 180 h (+15% frente a fermentação com ácido decanóico).

Prolongando a fermentação a partir de 180 h (pico de produtividade no processo com ácido decanóico) até 230 h, obteve-se uma concentração de 545 mcg/ml (+36% frente a fermentação com ácido decanóico).

A observação microscópica do micélio não mostrou nenhuma fragmentação ou vacuolização, que são os danos típicos provocados pelo ácido decanóico.

1C: Mutante B8 de *Streptomyces roseosporus* num fermentador de 1000 l

Manteve-se uma cultura mãe de mutante B8 de *Streptomyces roseosporus* sob nitrogénio líquido e utilizou-se então a cultura mãe para inocular a primeira fase de fermentação vegetativa. Incubou-se o meio semeado previamente, cuja composição notifica-se na tabela 7, em dois balões de fundo redondo (2 l), que continham 450 ml de caldo; a 30°C durante 48 h sobre um agitador giratório com uma velocidade de agitação de 150 rpm.

Tabela 7: Meio

COMPONENTE	1 l
Dextrose	20 g
Extracto de levedura	1 g
Bactotripton	17 g
Peptona	3 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
KCl	200 mg
CaCO ₃	2 g
Voranol	1,1 g
Sem ajuste de pH	
Esterilização 121°C x 20 min.	

Ao final da incubação, utilizou-se o inóculo para semear uma segunda fase vegetativa num fermentador de 100 l (volume de trabalho de 60 l) que continha um meio que tinha a seguinte composição (tabela 8).

Tabela 8: Meio semeado

COMPONENTE	1 l
Dextrose	2,5 g
Dextrina de batata	25 g
Peptona de soja	20 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
NaCl	5 g
Antiespumante	1 g
Sem ajuste de pH	
Esterilização 120°C x 30 min.	

Levou-se a cabo a incubação da fase semeada sob as seguintes condições: 30°C, 0,8 vvm, agitação de 160 rpm e contrapressão de 0,8 bar e um tempo que oscilava de desde 30 até 36 h.

Ao final da incubação, utilizou-se a fase semeada para o inóculo da fase de produção num fermentador de 1000 l (volume de trabalho de 600 l) que continha um meio que tem a composição descrita na tabela 6.

Levou-se a cabo a incubação da fase de produção sob as seguintes condições: 30°C, 0,5 vvm, agitação de 120+160 rpm e contrapressão de 0,7 bar.

Manteve-se o pH a 6,5 mediante adição de uma solução de hidróxido de amónio.

Após 24 h, quando a concentração em glucose do meio diminuiu abaixo de 3-4 g/l, alimentou-se o fermentador com uma solução que continha 50% de decanal e 50% de oleato de metilo (v/v) com uma velocidade de fluxo que oscilava de desde 140 até 160 ml/h.

A utilização do mutante B8 permitiu obter uma produtividade de 1,3 g/l em 180 h e alcançar uma potência de 1,5 g/l em 230 h, com uma velocidade de produção constante.

EXEMPLO 2 - Decanal + glicerol

Levou-se a cabo o inóculo tal como descreveu-se no exemplo 1A.

Ao final da incubação, utilizou-se o inóculo para semear um fermentador de produção com capacidade de 20 l (volume de trabalho de 15 l), que continha um meio que tem a composição descrita na tabela 3.

Levou-se a cabo a incubação da fase de produção sob as seguintes condições: 30°C, 1 vvm, agitação de 150-350 rpm e contrapressão de 0,5 bar. Manteve-se o pH a 6,5 mediante adição de uma solução de hidróxido de amônio. Após 20 h, quando a concentração em glucose do meio diminuiu abaixo de 3-4 g/l, alimentou-se o fermentador com 100% de decanal a uma velocidade de fluxo que oscilava de desde 2 até 7 ml/h.

Alimentou-se uma segunda solução de alimentação que continha glicerol ao mesmo tempo com uma velocidade de fluxo de 10 ml/h.

A produção de daptomicina começou após 40 h e alcançou uma produtividade de 0,2 g/l em 160 h.

EXEMPLO 3 - Óleo de *Cuphea* + oleato de metilo

Levou-se a cabo o inóculo tal como descreveu-se no exemplo 1A.

Ao final da incubação, utilizou-se o inóculo para semear um fermentador de produção com capacidade de 20 l (volume de trabalho de 15 l) que continha um meio que tinha a composição descrita na tabela 3. Levou-se a cabo a incubação da fase de produção sob as seguintes condições: 30°C, 1 vvm, agitação de 150-350 rpm e contrapressão de 0,5 bar. Manteve-se o pH a 6,5 mediante adição de uma solução

de hidróxido de amónio. Após 18 h, quando a concentração em glucose do meio estava abaixo de 3-4 g/l, alimentou-se o fermentador com uma solução de alimentação que continha 70% de óleo de *Cuphea* e 30% de oleato de metilo a uma velocidade de fluxo de 3+6 ml/h.

Levou-se a cabo a fermentação durante 210 h quando se alcançou uma produtividade de 0,6 g/l de daptomicina.

EXEMPLO 4 - Óleo de *Cuphea* + glicerol

Levou-se a cabo o inóculo tal como descreveu-se no exemplo 1A.

Ao final da incubação, utilizou-se o inóculo para semear um fermentador produtivo com capacidade de 20 l (volume de trabalho de 15 l) que continha um meio que tinha a composição descrita na tabela 3. Levou-se a cabo a incubação da fase de produção sob as seguintes condições: 30°C, 1 vvm, agitação de 150+350 rpm e contrapressão de 0,5 bar. Manteve-se o pH a 6,5 mediante adição de uma solução de hidróxido de amónio.

Após 20 h, quando a concentração em glucose do meio estava abaixo de 3-4 g/l, alimentou-se o fermentador com 100% de óleo de *Cuphea* a uma velocidade de fluxo de 2+5 ml/h. Alimentou-se uma segunda fonte de carbono, glicerol, durante a fermentação.

Continuou-se o processo durante 210 h e alcançou-se uma produtividade de 0,6 g/l de daptomicina.

EXEMPLO 5 - Óleo de *Cuphea* de maneira descontínua

Levou-se a cabo o inóculo tal como descreveu-se no exemplo 1A.

Ao final da incubação, utilizou-se o inóculo para semear um fermentador produtivo com capacidade de 20 l (volume de trabalho de 15 l) que continha um meio que tinha a seguinte composição (tabela 9).

Tabela 9: Meio de produção

COMPONENTE	g/l
Farinha de soja	22
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,66
pH ajustado a 7,0	
Óleo de <i>Cuphea</i>	42
Dextrose	8,25
Dextrina de batata	33
Melaços	2,75
Voranol	0,8
Esterilização 121°C x 45 min.	

Na fase de produção, levou-se a cabo a incubação sob as seguintes condições: 30°C, 1 vvm, agitação de 150-350 rpm e contrapressão de 0,5 bar. Manteve-se o pH a 6,5 mediante adição de uma solução de hidróxido de amónio.

Ajustou-se a temperatura de fermentação de maneira a manter uma taxa de captação de oxigénio constante desde 20 h até o fim do processo.

Os materiais de partida presentes no meio descontinuo foram suficientes para suportar o crescimento de microorganismo e a produção de daptomicina.

Lisboa, 7 de Abril de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de daptomicina **caracterizado por** a fermentação de *Streptomyces roseosporus* ser na presença de n-decanal ou óleo de *Cuphea* como fontes da cadeia lateral de n-decanoílo.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a fonte da cadeia lateral de n-decanoílo ser n-decanal.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** alimentar-se n-decanal como uma solução num solvente orgânico seleccionado de oleato de metilo, etanol e acetato de etilo.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** o solvente ser oleato de metilo.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** alimentar-se n-decanal sem solventes.
6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a fonte da cadeia lateral de n-decanoílo ser óleo de *Cuphea*.
7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** alimentar-se óleo de *Cuphea* como uma solução num solvente orgânico seleccionado de oleato de metilo, etanol ou misturar-se com óleo de soja, óleo de palma ou óleo de girassol.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** o solvente orgânico ser oleato de metilo.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** alimentar-se óleo de *Cuphea* sem solventes.

10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 - 9, **caracterizado por** levar-se a cabo como fermentação descontínua com óleo de *Cuphea* puro.

Lisboa, 7 de Abril de 2011

RESUMO

PROCESSO MELHORADO PARA A PRODUÇÃO DE DAPTOMICINA

A presente invenção refere-se a um processo melhorado para a produção de daptomicina mediante fermentação com *Streptomyces roseosporus*, na presença de n-decanal ou óleo de *Cuphea* como fontes da cadeia lateral de n-decanoílo. Estes reagentes permitem reduzir os efeitos de toxicidade sobre as bactérias e evitar a utilização de solventes na solução de alimentação.