



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0702901-2 A2**

(22) Data de Depósito: 29/06/2007
(43) Data da Publicação: 15/03/2011
(RPI 2097)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 17/04

(54) Título: **PROCESSOS PARA REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO METABÓLICO E VARIANTES DO *PENICILLIUM SP***

(30) Prioridade Unionista: 29/06/2006 US 60/818,145,
25/09/2006 US 60/847,344, 25/09/2006 US 60/847,344, 29/06/2006
US 60/818,145

(73) Titular(es): Ivax Pharmaceuticals S.R.O.

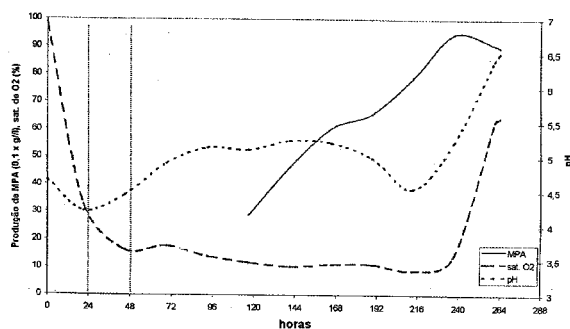
(72) Inventor(es): Josef Satke, Josef Valik, Vladimir Vala, Zdenek
Pokluda

(74) Procurador(es): Mirian Oliveira da Rocha Pitta

(86) Pedido Internacional: PCT US2007015234 de 29/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/002665 de 03/01/2008

(57) Resumo: PROCESSOS PARA REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO METABÓLICO E VARIANTES DO *PENICILLIUM SP*. A presente invenção provê um método para preparar metabólitos ácidos, como o ácido micofenólico, e uma linhagem de *Penicillium sp.* com o número de acesso CCM 8364 para uso no referido método, cujo método produz ácido micofenólico com maiores rendimentos.



PROCESSOS PARA REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO METABÓLICO E VARIANTES DO *PENICILLIUM* SP

O presente pedido reivindica o benefício dos seguintes Pedidos de Patente Provisória dos Estados Unidos: Nos. 60/818.145, depositado em 29 de junho de 2006 e 60/847.344, depositado em 25 de setembro de 2006. Os conteúdos desses pedidos ficam incorporados ao presente por referência.

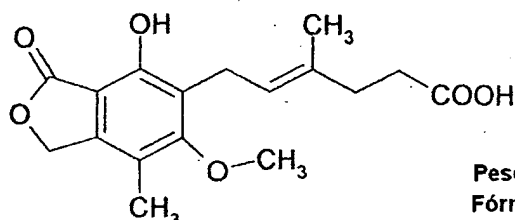
Área da Invenção

A presente invenção refere-se a um método para regular a produção de ácido metabólito por uma célula de um microorganismo, por meio da regulação do nível de saturação de oxigênio em um caldo de fermentação. Especificamente, a invenção se refere a um método para regular a produção de ácido micofenólico pela bactéria *Penicillium* por meio da regulação do nível de saturação de oxigênio no meio de cultura, e a uma linhagem de *Penicillium* recentemente isolada, que tem o número de acesso CCM 8364.

Antecedentes da Invenção

O ácido micofenólico (MPA - *MicoPhenolic Acid*) é um metabólito produzido por várias espécies de *Penicillium* (Imperial Chemical Industries GB 1 158 387 (1967), Lilly & Co Elli GB 1 593 208 (1978)) ou por linhagens mutantes obtidas da *Penicillium* (Ajanimoto KK US 4 452 891 (1981)). O MPA tem atividades biológicas e farmacológicas; por exemplo, como agente antimicrobiano, (Florey e outros, 1946), agente antitumoral (Williams e outros, *J. Antibiot.*, 21, 463 (1968) e como agente imunossupressor (Mitsui, Suzuki, 1969). Em terapia, usa-se geralmente o micofenolato mofetil, um éster 2-morfolinoetil derivado do MPA.

A estrutura química do MPA é:



Peso Molecular = 320,35
Fórmula Molecular = C₁₇H₂₀O₆

Um dos métodos para produzir MPA é a fermentação em cultura submersa, conforme descrição em EP 1 624 070 A1, em que se usa NaOH para regular o pH do meio de fermentação, mantendo-o entre 4 e 7.

5 O MPA pode ser isolado do meio de fermentação por uma variedade de processos, inclusive os descritos em Imperial Chemical Industries GB 1158 387 (1967); BIOCON, WO 01/64931 A1 (2001), e IVAX, WO 2006/031665 (2006), WO 01/21607 e WO 2005/105768). O MPA isolado é então usado para a produção
10 de micofenolato mofetil (WO -2/10085).

Um nível elevado de produção de MPA é desejável para a produção eficiente e econômica de medicamentos baseados no ingrediente farmacêutico ativo micofenolato mofetil. A presente invenção provê um método para tanto.

15 Sumário da Invenção

Sob um aspecto, a presente invenção provê um método para regular a produção de um metabólito ácido produzido por uma célula microbiana. Em uma incorporação preferencial, o método consiste em fornecer células
20 microbianas que produzem metabólito ácido em um sistema de cultura de fermentação submersa e produzir o metabólito ácido proveniente das células microbianas na referida cultura, sendo que a saturação de oxigênio do meio de cultura é regulada para controlar o pH do meio de cultura.
25 Preferivelmente, o metabólito ácido é o ácido micofenólico (MPA).

Sob um outro aspecto, a presente invenção provê um método para preparar o micofenolato mofetil que consiste em converter o ácido micofenólico em micofenolato mofetil,
30 sendo que o ácido micofenólico é preparado regulando-se a saturação de oxigênio em um caldo de fermentação que contém uma célula microbiana produtora de ácido micofenólico.

Ainda sob outro aspecto, a presente invenção provê também uma linhagem de *Penicillium* sp. depositada sob o

número de acesso CCM 8364 na Coleção de Microorganismos Tcheca (CCM - *Czech Collection of Microorganisms*), na Universidade Masarik em Brno, na República Tcheca. A linhagem de *Penicillium sp.* depositada sob número de acesso CCM 8364 produz ácido micofenólico em concentrações elevadas (acima de 1 g de MPA por litro de meio de cultura).

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1: Uma representação gráfica que mostra a regulação do pH do meio de cultura por meio da regulação do nível de saturação de oxigênio, para se obter um pH acima de pH 4,5.

Figura 2: Uma representação gráfica que mostra a regulação do pH do meio de cultura por meio da regulação do nível de saturação de oxigênio, para obter-se um pH abaixo de pH 4,5.

Descrição Detalhada da Invenção

No presente documento, as expressões "níveis elevados" ou "concentrações elevadas", quando usadas com relação ao MPA, referem-se a um nível (ou concentração) acima de cerca de 1 g de MPA por litro; preferivelmente, de cerca de 6 a cerca de 10 g de MPA por litro de caldo de fermentação (meio de cultura).

Vários fatores são importantes para a obtenção de altas concentrações de MPA no meio de cultura de fermentação submersa. Esses fatores incluem a composição do meio e as condições da cultivação. Especificamente, é preciso manter o pH do caldo de fermentação em um nível ótimo durante a fase de produção. Normalmente, usa-se a adição de NaOH para regular o pH do caldo de fermentação e mantê-lo entre pH 4 e 7. NaOH também é usado para produzir um deslocamento do pH depois da fase log de crescimento terminar. A presente invenção refere-se a um novo método para regular a produção de MPA regulando-se o pH do

caldo/meio de cultura de fermentação por meio da regulação do nível de oxigênio, sem acrescentar uma substância química ao caldo/meio de cultura de fermentação. Assim, sendo, a presente invenção usa somente uma fonte natural, para regular o pH do caldo/meio de cultura de fermentação. A saturação por oxigênio usando o ar é realizada por aeração controlada desse processo aeróbico, regulando desse modo o pH do processo. Conseqüentemente, o presente processo diminui o consumo de perigosos ácidos e/ou compostos alcalinos.

A presente invenção provê um método para regular a produção de um metabólito ácido produzido por uma célula microbiana por meio da regulação da saturação de oxigênio do caldo de fermentação. Mais especificamente, o método consiste em prover uma célula microbiana em um sistema de cultura de fermentação submersa, em que a saturação de oxigênio do meio de cultura da cultura de fermentação submersa é regulado/controlado, para produzir um metabólito ácido. Regular ou controlar a saturação de oxigênio do referido meio de cultura garante que o pH do meio de cultura seja mantido entre pH 4 e pH 7, preferivelmente entre pH 4 e pH 6 e, mais preferivelmente, entre pH 4 e pH 5,5. A referida regulação provê um método para produzir o metabólito ácido que permite a obtenção de uma alta concentração do metabólito ácido no caldo de fermentação (meio de cultura).

Preferivelmente, o metabólito ácido é selecionado no grupo que consiste de ácido urônico, ácido paspálico, metil-carbinol-amino de ácido lisérgico e ácido micofenólico. Preferivelmente, o metabólito ácido é ácido micofenólico.

Preferivelmente, a célula microbiana é selecionada no grupo que consiste de uma célula fúngica e uma célula bacteriana. Preferivelmente, a célula microbiana é uma

célula fúngica; mais preferivelmente, a célula microbiana é uma célula de *Penicillium sp.* para a produção de ácido micofenólico, uma célula de *Claviceps sp.* para a produção de ácido paspálico e metil-carbinol-amino, ou uma célula de *Klebsiella pneumoniae* para a produção de ácido urônico. Preferivelmente, a célula de *Penicillium sp.* é uma linhagem única de *Penicillium*. Preferivelmente, a linhagem de *Penicillium* é a linhagem que tem o número de acesso CCM 8364.

10 No método da presente invenção, um meio de cultura adequado consiste de uma fonte básica e uma fonte complexa de nitrogênio. A fonte básica de nitrogênio pode ser, por exemplo, moléculas inorgânicas simples, aminoácidos ou outros compostos orgânicos contendo nitrogênio, como por
15 exemplo sais de amônia/amônio, qualquer aminoácido naturalmente ocorrente. Uma fonte complexa de nitrogênio preferencial é a caseína hidrolisada e/ou milho macerado. O meio de cultura também contém uma fonte de carbono. Uma fonte de carbono adequada para uso no meio de cultura pode
20 ser um carboidrato, preferivelmente um açúcar, mais preferivelmente um monossacarídeo e, mais preferivelmente ainda, sacarose.

Além disso, o meio de cultura contém um suplemento de aminoácido específico em acréscimo à fonte complexa de
25 nitrogênio, ou quando a fonte básica de nitrogênio é um aminoácido simples. Preferivelmente, o suplemento de aminoácido inclui uma ou mais das seguintes: glicina, metionina e asparagina. Preferivelmente, a metionina é D, L-metionina. Preferivelmente, a asparagina é L-asparagina.

30 O aminoácido no suplemento de aminoácido é geralmente usado em uma concentração de cerca de 1 a cerca de 30g por litro, preferivelmente em uma concentração de cerca de 5 a cerca de 8g/litro. A glicina é geralmente usada em uma concentração de cerca de 1 a cerca de 30g/litro,

preferivelmente em uma concentração de cerca de 2 a cerca de 20 g/litro; mais preferivelmente, a glicina é usada em uma concentração de cerca de 3 a cerca de 15 g/litro e, mais preferivelmente ainda, a concentração de glicina é de
5 cerca de 5 a cerca de 8 g/litro.

A D,L-metionina é geralmente usada em uma concentração de cerca de 0,01 a cerca de 10 g/litro; mais preferivelmente, a D,L-metionina é usada em uma concentração de cerca de 0,1 a cerca de 1 g/litro.

10 A L-asparagina é geralmente usada em uma concentração de cerca de 1 a cerca de 30 g/litro; mais preferivelmente, a L-asparagina é usada em uma concentração de cerca de 2 a 20 g/litro; ainda mais preferivelmente, a L-asparagina é usada em uma concentração de cerca de 3 a cerca de 15
15 g/litro, e o mais preferível é que seja usada em uma concentração de cerca de 5 a cerca de 8 g/litro.

A regulação da produção de MPA ocorre quando *penicillium sp.* é cultivada em uma cultura de fermentação submersa que tem um nível definido de saturação de
20 oxigênio. Nessa cultura de fermentação submersa o nível de saturação de oxigênio no meio de cultura é controlado durante pelo menos uma parte da fase de produção. Alternativamente, o nível de saturação de oxigênio é controlado durante toda a fase de produção. Assim sendo, o
25 nível de saturação de oxigênio no meio de cultura pode ser controlado durante o período de tempo desde 0 a 24 horas, ou durante o período de tempo desde 0 a 48 horas, ou desde 24 a 48 horas ou desde 48 horas. Preferivelmente, o nível de saturação de oxigênio é controlado até que o pH suba
30 devido ao esgotamento da fonte de carbono no final da fase de produção.

A produção de MPA em fermentação submersa pode ser aumentada controlando-se o nível de saturação de oxigênio no meio de cultura. Preferivelmente, o nível de saturação

de oxigênio está na faixa de 5 a 40%; mais preferivelmente, o nível de saturação de oxigênio está na faixa de 5 a 35% e, ainda mais preferivelmente, o nível de saturação de oxigênio está na faixa de 5 a 30%. A porcentagem de saturação de oxigênio refere-se ao pO_2 , conforme medido por eletrodo pO_2 , de acordo com o qual uma saturação de oxigênio de 100% está correlacionada com a aeração máxima do meio de cultura, sem a cultura de células microbianas.

Em uma incorporação preferencial, a *Penicillium sp* é crescida em um meio de cultura diferente nas etapas de inoculação e produção da cultura. A primeira etapa (etapa de inoculação) começa em $T=0$ horas; uma segunda etapa pode começar em $T=24$ horas e a terceira etapa (etapa de produção) pode ter início em $T=48$ horas.

Preferivelmente, o processo consiste ainda em crescer células microbianas em um meio de inoculação e em inocular o meio de produção com um inoculado de, no mínimo, 20% e, preferivelmente, no mínimo 25% do volume do meio de produção.

No método da presente invenção, o pH do meio de cultura é mantido em um pH acima de pH 4, preferivelmente entre pH 4 e pH 7. Preferivelmente, o pH é mantido regulando-se o nível de saturação de oxigênio no meio de cultura. O nível de saturação de oxigênio no meio de cultura é regulado pelo monitoramento contínuo do nível de oxigênio usando-se um eletrodo pO_2 e ajustando-se o nível de oxigênio quando necessário, por meio do ajuste da velocidade da agitação e do volume de ar adicionado. Assim, o pH do meio de cultura pode ser mantido em um pH acima de pH 4 durante a etapa de produção da cultura, que é o período em que o metabólito ácido é ativamente produzido no sistema de cultura de fermentação. Esse período pode começar após um inoculado com a célula microbiana ter sido transferido para o sistema de cultura de fermentação.

Preferivelmente, o pH é acima de pH 4,5 durante a etapa de produção da cultura; mais preferivelmente, o pH é entre cerca de pH 4,5 e cerca de pH 5,5 durante a etapa de produção da cultura.

5 A temperatura da cultura submersa regulada dessa maneira é mantida entre cerca de 20°C e cerca de 30°C, por um período de tempo suficiente para produzir MPA. Preferivelmente, a temperatura da cultura submersa no processo da presente invenção é mantida entre cerca de 24°C
10 e cerca de 26°C, por um período de cerca de 240 horas a cerca de 300 horas.

A regulação da produção de MPA, de acordo com o processo para regular o nível de saturação de oxigênio no meio de cultura da presente invenção, produz uma
15 concentração final de MPA (gramas/litro de meio de cultura) que é acima de 1 g/litro; mais preferivelmente, acima de 2 g/litro ou acima de 3 g/litro e, ainda mais preferivelmente, acima de 4 g/litro e, mais preferivelmente que tudo, acima de 5 g/litro, acima de 6 g/litro, ou acima
20 de 8 g/litro.

A presente invenção também provê uma nova linhagem de *Penicillium* sp. (depositada com o número de acesso CCM 8364) que produz altos níveis de MPA, como, por exemplo, acima de 1 g/litro. Essa linhagem produz níveis mais altos
25 de MPA em comparação com uma linhagem de *Penicillium* sp do tipo selvagem, a partir da qual foi produzida a linhagem CCM 8364. A referida linhagem selvagem de *Penicillium* sp produz MPA com um rendimento médio de cerca de 600 mg/litro quando crescida em cultura submersa.

30 A presente invenção também provê uma cultura da referida linhagem, preferivelmente uma cultura biologicamente pura; por exemplo, uma cultura que consiste apenas no crescimento de células da linhagem fúngica com o número de depósito CCM 8364. Tal cultura contém,

preferivelmente, pelo menos cerca de 90% dessa linhagem fúngica. Essa linhagem em cultura pode ser na forma de células individuais, agregados celulares, hifas, filamentos e seus agregados em qualquer ou sobre qualquer superfície ou ambiente.

A linhagem de *Penicillium* sp que tem o número de acesso CCM 8364 é capaz de produzir uma concentração final de MPA (gramas/litro de meio de cultura) acima de 1 g/litro, preferivelmente acima de 2 g/litro ou acima de 3 g/litro, mais preferivelmente acima de 4 g/litro e, ainda mais preferivelmente, acima de 5 g/litro, acima de 6 g/litro ou acima de 8 g/litro.

A linhagem de *Penicillium* sp CCM 8364 é produzida usando-se um sistema de métodos químicos e físicos para produzir mutações, combinados com meios de seleção positiva.

A presente invenção também provê um processo para preparar micofenolato mofetil por meio da preparação de ácido micofenólico de acordo com o processo da presente invenção e a sua subsequente conversão em micofenolato mofetil. O ácido micofenólico pode ser convertido em micofenolato mofetil, por exemplo, de acordo com o processo descrito em WO-02/100855.

A invenção tendo sido descrita com referência a incorporações preferenciais específicas e exemplos ilustrativos, os profissionais com experiência nessa arte poderão reconhecer modificações da invenção conforme descrita e ilustrada que não ultrapassam o espírito e abrangência da invenção conforme foi descrita na especificação. As descrições das referências citadas neste pedido de patente ficam incorporadas ao presente por referência. Além disso, os seguintes exemplos destinam-se a ilustrar adicionalmente certas incorporações preferenciais da invenção e não são limitantes por natureza.

ExemplosExemplo 1: Características do Crescimento da LinhagemCCM 8364 de *Penicillium*Morfologia Macroscópica

5 Durante o crescimento saprofítico em meio malte
espassado com agar - MEA - (35 g de extrato de malte, 5 g
de peptona, 13 g de agar, 1000 ml de H₂O), a linhagem CCM
8364 forma colônias de micélios aéreos "sphaecelus" com um
diâmetro de 1,1 cm, após 7 dias de cultura. A textura da
10 superfície é aveludada, centralmente umbonada e tem margens
brancas. O nível de conidiogênese é moderado, as colônias
têm uma coloração próxima do marrom com presença de
exudado, amarelo-marrom, com reverso amarelo-marrom.

Durante o crescimento saprofítico em meio de levedura
15 de Czapek espessado com agar, a linhagem CCM 8364 forma
colônias de micélios aéreos "sphaecelus" com um diâmetro de
2,3 cm, após 7 dias de cultura. A textura da superfície
é aveludada, é sulcada radialmente e centralmente umbonada,
com margens brancas. O nível de conidiogênese é moderado,
20 as colônias têm coloração próxima do marrom, com presença
de exudado marrom avermelhado, com reverso cor de canela.

Durante o crescimento saprofítico em meio de produção
G25N espessado com agar, a linhagem CCM 8364 forma colônias
de micélios aéreos "sphaecelus" com um diâmetro de 0,3 cm,
25 após 7 dias de cultura. A textura da superfície é
aveludada. O nível de conidiogênese é de leve a moderado,
as colônias são centralmente planas ou elevadas com margens
brancas, e têm coloração cinzenta enfumada - cinzenta
azulada com um toque esverdeado, ausência de exudado,
30 reverso pálido.

Morfologia Microscópica

O micélio consiste de estipes de 300-600 x 4-6 µm, a
superfície é lisa, penicilos variáveis, triverticilados e
irregulares, com mais pontos de ramificação ocorrendo em um

padrão não uniforme, ramos em verticilos de 2 a 3, metulas em verticilos, 12 a 20 x 4 a 4,5 μm , fiálides ampuliformes-acerosas, medindo 13 a 16 x 2,5 a 3 μm , conídios em cadeias curtas, esferóides de 3,5 a 5,5 μm e elipsóides de 4 a 6 x 2 a 4 μm com disjuntores, paredes distintamente ásperas.

Exemplo 2: Ensaio de MPA

Cada isolado foi avaliado quanto à produção de MPA. Este ensaio consiste de duas etapas - inoculação e produção. O meio de inoculação (IM - Inoculation Medium) contém fontes de carbono (por exemplo, sacarose), fontes de nitrogênio (as fontes adequadas incluem caseína hidrolisada e milho macerado) e sais inorgânicos (como KH_2PO_4). 50 ml de IM foram esterilizados a 120°C por 20 minutos, em um frasco de Erlenmeyer de 250 ml. Os esporos do isolado foram lavados para fora de uma cultura em agar, com 20 ml de água esterilizada. 5 ml dessa suspensão de esporos foram usados como inoculado para o IM e, então, cultivados por 3 a 5 dias a uma temperatura de 24 a 28°C, com uma taxa de 280 rotações por minuto, durante agitação. O IM resultante foi usado para inoculação do meio de produção (PM - Production Medium) por adição de 10% do volume total.

O PM utilizado na presente invenção para o ensaio de MPA contém fontes de carbono (por exemplo, sacarose), fontes de nitrogênio (as fontes adequadas incluem caseína e aminoácidos como glicina, asparagina, metionina) e sais inorgânicos (por exemplo, K_3PO_4 , MgSO_4). 50 ml de PM foram esterilizados a 120°C por 20 minutos, em um frasco de Erlenmeyer de 250 ml. Uma cultura para teste foi então conduzida sob condições aeróbicas, a uma temperatura de 24 a 28°C, com agitação, por 10 a 14 dias. A taxa de agitação foi de 280 rotações por minuto. O pH do meio foi medido antes da inoculação (pH de 4,9 a 5,1) e duas ou três vezes antes do final do experimento, usando-se um medidor de pH conforme descrição acima. O nível de saturação de oxigênio

foi medido continuamente em fermentadores de laboratório ou industriais. As alíquotas contendo MPA foram analisadas usando-se cromatografia HPLC, de acordo com técnicas padronizadas conhecidas pelas pessoas experientes nessa arte, para determinar o seu conteúdo de MPA em comparação com um padrão (padrão interno IVAX para MPA de acordo com o relatório de pesquisa RR/RD/CHO24/01-A, reteste RR/RD/AN061/05-A). A coluna usada foi uma *Chromolith speed ROD, RP18e*, 50 x 4,6 mm (fabricada pela MERCK); fase móvel: 40% de acetonitrilo, 60% de água contendo 680 µl de H₃PO₄ por litro de H₂O, fluxo de 5 a 6,5 ml/minuto e temperatura de 30°C.

Exemplo 3: Processo de Mutação e Seleção

1. Seleção

Na primeira etapa do procedimento a cultura esporulada de *Penicillium sp* do tipo selvagem foi suspensa em água e livrada de fragmentos de micélios. A suspensão foi então diluída para 100 esporos/ml e espalhada em placas Petri contendo MEA. As placas foram então incubadas à temperatura de 24 a 27°C, por sete dias. As colônias que cresceram na placa de agar foram colhidas e mantidas no mesmo meio nutriente de agar, em um frasco de Blacke. Após 16 dias de cultura, isolados de monocolônias foram testados no teste de produção. O isolado com a melhor produção (1,2 g MPA por litro de caldo de fermentação) sofreu mutação na etapa subsequente.

2. Mutação com N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (NG)

Uma cultura esporulada foi suspensa em água e livrada de fragmentos de micélios. As populações de conídios foram então expostas à solução de 0,2 M NG em salmoura por 8 horas. Nesse tratamento de mutação, aproximadamente 99,9% dos esporos foram mortos. Os esporos tratados foram então lavados e livrados de mutagenes e espalhados em placas Petri contendo MEA. As placas foram incubadas a uma

temperatura de 24 a 27°C, por sete dias. As colônias que cresceram na placa de agar foram colhidas e mantidas em culturas do mesmo meio nutriente de agar, em um frasco de Blacke. Após 16 dias de culturação, isolados de monocolônias foram testados no teste de produção. O isolado com a melhor produção (2,4 g de MPA/litro de caldo de fermentação) sofreu mutação na etapa subsequente.

3. Mutação com etil-metano-sulfonato

Uma cultura esporulada foi suspensa em água e livrada de fragmentos de micélios. As populações de conídios foram expostas à solução de 0,2M EMS em salmoura, por 16 horas. Nesse tratamento de mutação aproximadamente 99,9% dos esporos foram mortos. Os esporos foram então lavados e livrados de mutagenes e inoculados em placas de Petri contendo MEA. As placas foram incubadas à temperatura de 24 a 27°C por 7 dias, até se formarem colônias nas placas. As colônias foram colhidas e mantidas em culturas do mesmo meio agar nutriente, em um frasco de Blacke. Após 16 dias de culturação, isolados de monocolônias foram testados no teste de produção. O isolado com a melhor produção (5,6 g de MPA por litro de caldo de fermentação) sofreu mutação na etapa subsequente.

4. Mutação com irradiação ultravioleta

Uma cultura esporulada foi suspensa em água e livrada de fragmentos de micélios. A suspensão foi diluída para 1×10^5 esporos/ml e espalhada sobre placas de Petri contendo MEA. As placas foram expostas à radiação ultravioleta, sendo a dose de radiação de cerca de $15 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$, por cerca de 500 segundos. Nesse tratamento de mutação aproximadamente 99,9% dos esporos foram mortos. As placas de Petri foram então incubadas à temperatura de 24 a 27°C, por sete dias. As colônias que cresceram na placa de agar foram colhidas e mantidas em culturas do mesmo meio agar nutriente, em um frasco de Blacke. Após 16 dias de cultivo,

isolados de monocolônias foram testados no teste de produção. O isolado com a melhor produção (6,0 MPA/litro de caldo de fermentação) sofreu mutação na etapa subsequente.

5. Mutação com radiação Gamma

5 Uma cultura esporulada foi suspensa em água e livrada de fragmentos de micélios. A suspensão foi diluída para 1×10^5 esporos/ml e exposta à radiação Gamma, com a dose de radiação sendo de 1500 Gy. Os isolados irradiados foram espalhados sobre placas de Petri contendo MEA. As placas de
10 Petri foram então incubadas à temperatura de 24 a 27°C por sete dias, até se formarem colônias sobre as placas. As colônias foram colhidas e mantidas em culturas do mesmo meio agar nutriente, em um frasco Blacke. Após 16 dias de cultivo, isolados de monocolônia foram testados no teste de
15 produção. O isolado com a melhor produção (10 g de MPA por litro de caldo de fermentação), foi passado duas vezes sobre meio agar em um frasco de Blacke. O teste de produção foi realizado após cada passagem, para se verificar a continuidade da elevada produção de MPA.

20 A recém-produzida linhagem foi depositada conforme o Tratado de Budapeste na Coleção Tcheca de Microorganismos (CCM) na Universidade Masaryk, Tverdého 14, Brno, República Tcheca, sob número CCM 8364.

O sistema de procedimentos de mutação, quando
25 combinado com os procedimentos de seleção positiva, resultou em um aumento do conteúdo médio de MPA, de 600 mg de MPA por litro de caldo de fermentação para a linhagem original, para 10 g de MPA por litro de caldo de fermentação para a linhagem CCM 8364, de acordo com o
30 ensaio de MPA.

Exemplo 4: Produção de MPA durante Fermentação em Cultura de Alta Saturação de Oxigênio

A linhagem CCM 8364 foi usada para fermentação em um fermentador submerso, com volume total de cerca de 14

metros cúbicos. O meio de produção continha sacarose como fonte de carbono e caseína hidrolisada, glicina, asparagina e metionina como fontes de nitrogênio e minerais, inclusive K, P e Mg, com um pH inicial de 5,0. O meio de produção foi inoculado pelo inoculado da terceira etapa (aproximadamente 26% do peso). A temperatura de cultivo foi de 24 a 26°C, e o tempo da fermentação de produção foi de 285 horas. O pH do meio de cultura foi controlado saturando-se com oxigênio até um nível acima de 30%. Os valores do oxigênio dissolvido, pH durante a cultura e concentração de MPA no final da etapa de produção estão resumidos na tabela seguinte. Devido à saturação de oxigênio do meio de produção o pH caiu abaixo de pH 4 e o nível final de produção de MPA alcançou 5,7 g de MPA por litro.

No.	Tempo (h)	24	48	72	120	144	164	192	240	MPA g/l
1	Saturação de Oxigênio	45%	37%	36%	60%	64%	64%	76%	79%	5,7
	pH	4,52	4,82	4,45	3,84	3,96	3,77	3,91	4,65	

Exemplo 5: Produção de MPA durante Fermentação em Cultura de Baixa Saturação de Oxigênio

A linhagem 8364 foi usada para fermentação em um fermentador submerso com volume total de cerca de 14 metros cúbicos. O meio de produção continha sacarose como fonte de carbono e caseína hidrolisada, glicina, asparagina e metionina como fontes de nitrogênio e minerais inclusive K, P e Mg, com um pH inicial de 5,0. A linhagem de produção, *Penicillium* sp CCM 8364 foi usada para fermentação. O meio de produção foi inoculado pelo inoculado da terceira etapa (aproximadamente 26% do peso). A temperatura de cultura foi de 24 a 26°C e o tempo de fermentação da produção foi de 278 horas. O pH do meio de cultura foi controlado por meio da saturação com oxigênio. Os valores do oxigênio

dissolvido, pH do meio de cultura durante a cultura e concentração de MPA no final da etapa de produção estão na tabela seguinte.

No.	Tempo (h)	24	48	72	120	144	164	192	240	MPA g/l
2	Saturação de Oxigênio	24%	18%	17%	24%	20%	21%	17%	16%	7,5
	pH	4,24	4,54	4,77	5,15	5,37	5,14	4,47	4,41	

Exemplo 6: Produção de MPA durante Fermentação em Cultura de Baixa Concentração de Oxigênio

A linhagem CCM 8364 foi usada para fermentação em um fermentador submerso com volume total de cerca de 14 metros cúbicos. O meio de produção continha sacarose como fonte de carbono e caseína hidrolisada, glicina, asparagina e metionina como fontes de nitrogênio e minerais, inclusive K, P e Mg, com um pH inicial de 5,0. O meio de produção foi inoculado pelo inoculado da terceira etapa (aproximadamente 26% do peso). A temperatura do cultivo foi de 24 a 26°C. O caldo de fermentação foi alimentado por um meio com uma fonte de carbono (1 x 10% do peso) às 143 horas e a fermentação da produção terminou às 257 horas. O pH do meio de cultura foi controlado por meio da saturação com oxigênio. Os valores do oxigênio dissolvido, pH do meio de cultura durante o cultivo e concentração de MPA no final da etapa de produção estão na tabela abaixo.

No.	Tempo (h)	24	48	72	120	144	164	192	240	MPA g/l
1	Saturação de Oxigênio	30%	25%	17%	18%	13%	11%	9%	9%	8,2
	pH	4,03	4,19	4,65	5,05	5,09	5,06	4,86	5,65	

Exemplo 7: Produção de Micofenolato Mofetil de Ácido Micofenólico, de Acordo com WO 02/100855

100 g de ácido micofenólico bruto, preparado de acordo com o exemplo 5, foram colocados em um frasco de reação com um refrigerador de refluxo, juntamente com 200 ml de dibutil éter. Sob agitação contínua, a mistura foi aquecida até a temperatura de 50 a 60°C e, então, foram acrescentados 40 ml de 2-morfolino-etanol. A mistura de reação foi aquecida até fervura sob separação azeotrópica da água. Após 48 horas, a mistura foi resfriada até 23°C e 200 ml de diclorometano foram adicionados. A solução foi extraída duas vezes com 100 ml de K₂CO₃ aquoso 0,5M e uma vez com 100 ml de água. Então, o diclorometano foi destilado a vácuo e a suspensão foi resfriada até uma temperatura de 10 a 15°C. Nessa matéria, o micofenolato mofetil cristalino sintetizado foi recristalizado do acetato etílico. Após a secagem dos cristais, foram obtidos 110 gramas de micofenolato mofetil, com uma pureza acima de 99,0% (HPLC).

REIVINDICAÇÕES

1. Um processo para regular a produção de um ácido metabólico produzido por uma célula microbiológica, caracterizado por compreender a regulação da saturação de oxigênio de um meio de cultura que compreende a dita célula microbiológica.
5
2. O processo de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a provisão de ácido metabólico produtor de células microbiológicas em um sistema de cultura e fermentação submersa e do dito ácido metabólico a partir das ditas células microbiológicas na dita cultura, caracterizado por a dita saturação de oxigênio de um meio de cultura ser regulado para controlar o pH do meio de cultura.
10
3. O processo de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2, caracterizado por o ácido metabólico ser selecionado do grupo consistindo de ácido untrônico, ácido paspálico, metilcarbinolamina de ácido lisérgico e ácido micofenólico.
15
4. O processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o ácido metabólico ser o ácido micofenólico (MPA).
5. O processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o ácido micofenólico ser produzido no meio de cultura para uma concentração final de MPA (g/l de meio de cultura) que está em excesso de 1g/l.
20
6. O processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a concentração estar em excesso de 5 g/l.
- 25 7. O processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a concentração estar em excesso de 8 g/l.

8. O processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por a célula microbiológica ser selecionada do grupo consistindo de uma célula de fungo ou uma célula de bactéria.
- 5 9. O processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a célula microbiológica ser uma célula *Penicillium sp.*
10. O processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a célula *Penicillium sp.* ser uma variante simples da *Penicillium* que tem o numero de acesso CCM 8364
- 10 11. O processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por o meio de cultura compreender uma fonte de nitrogênio básico e uma fonte de nitrogênio complexo.
12. O processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a fonte de nitrogênio complexo ser selecionada de caseína hidrolizada, sabugo de milho ou mistura de ambos.
- 15 13. O processo de acordo com a reivindicação 11 ou com a reivindicação 12, caracterizado por a fonte de nitrogênio básico compreender um suplementar amino ácido.
- 20 14. O processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o suplementar amino ácido ser um ou mais dentre o glicínio, a metionina e a asparagina.
15. O processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por o nível de saturação do oxigênio ser controlado na faixa de 5 a 40%.
- 25 16. O processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por o nível de saturação do oxigênio ser controlado durante toda a inteira fase de produção.

17. O processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o nível de saturação do oxigênio no meio de cultura ser controlado durante um período de tempo selecionado entre 0 e 24 horas, ou entre 0 e 48 horas, ou entre 24 e 48 horas, havendo 48 horas de inoculação.
- 5 18. O processo de acordo com a reivindicação 16 ou com a reivindicação 17, caracterizado por o nível de saturação do oxigênio ser controlado até que o pH se eleve devido à depleção da fonte de carbono ao final da fase de produção.
- 10 19. O processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por o meio de cultura ser mantido a um pH maior que pH 4.
- 15 20. O processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o pH ser mantido pela regulação do nível de saturação do oxigênio ser controlado no meio de cultura durante a fase de produção do ácido metabólico.
21. O processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por o pH estar entre pH 4,5 e pH 5,5 aproximadamente durante a fase de produção.
- 20 22. Um processo de acordo com qualquer das precedentes reivindicações caracterizado por o ácido metabólico ser ácido micofenólico, que é convertido em mofetil micofenolato.
23. O processo de acordo com a reivindicação 22 caracterizado por o ácido micofenólico ser convertido em mofetil micofenolato por reação com o 2-morfolinoetanol.
- 25 24. Uma variante do *Penicillium* sp. Depositado como número de acesso CCM 8364 na Coleção Tcheça de Microorganismos (CCM) da Universidade de Masaryk, Brno, República Tcheça.

25. A variante de acordo com a reivindicação 24 na forma de células individuais, células agregadas, hifas, filamentos e seus agregados em superfícies ou ambientes.
- 5 26. A variante do *Pencillium sp.* de acordo com a reivindicação 24 ou com a reivindicação 25, caracterizado por a dita variante ser capaz de produzir uma concentração final de MPA (g/l do meio de cultura) que está em excesso de 1g/l.
27. A variante do *Penicillium sp.* de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a concentração estar em excesso de 5g/l.
- 10 28. A variante do *Penicillium sp.* de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por a concentração estar em excesso de 8 g/l.
29. Um processo para produção de um ácido metabólico compreendendo a fermentação de uma variante de quaisquer das reivindicações 24 a 28.
- 15 30. O processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por o ácido metabólico ser selecionado do grupo consistindo ácido untrônico, ácido paspálico, metilcarbinolamina de ácido lisérgico e ácido micofenólico.
31. O processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por o ácido metabólico ser o ácido micofenólico (MPA).
- 20 32. Uso de uma variante de acordo com quaisquer das reivindicações 24 a 28 em um processo de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 23.

FIGURA 1

Figura 1: Uma representação gráfica mostrando a regulação do pH do meio de cultura, regulando-se o nível de saturação de oxigênio, para se obter um pH acima de pH 4,5

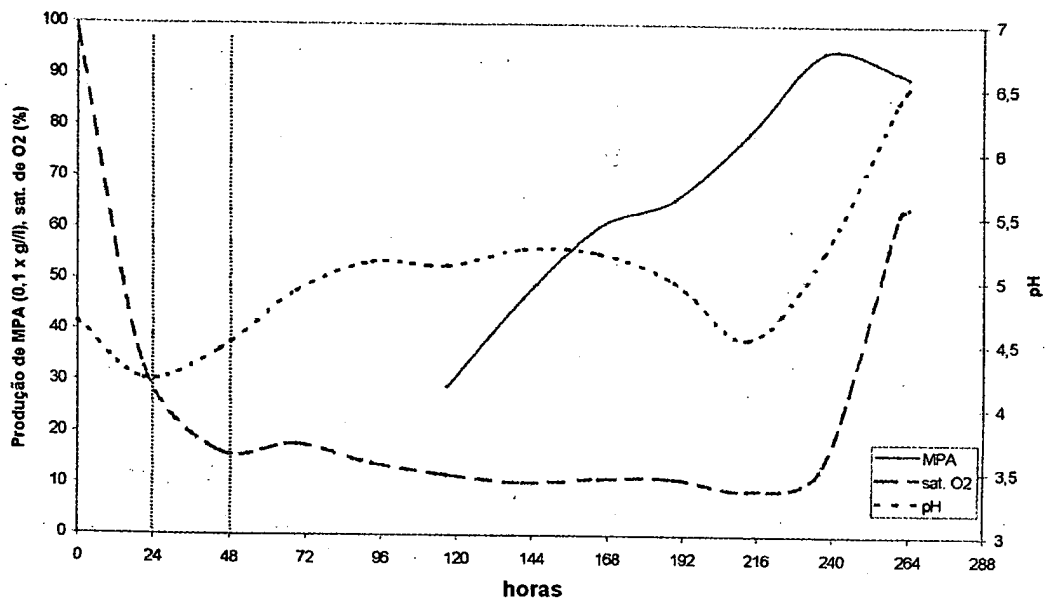
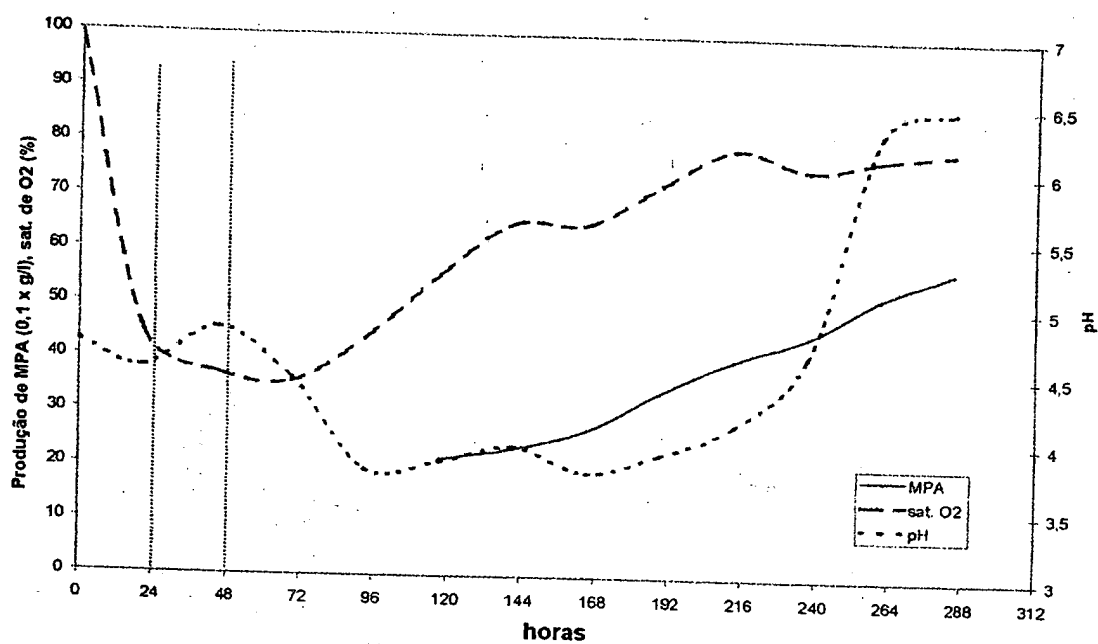


FIGURA 2

Figura 2: Uma representação gráfica mostrando a regulação do pH do meio de cultura regulando-se o nível de saturação de oxigenio para se obter um pH abaixo de pH 4,5



RESUMO

PROCESSOS PARA REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO METABÓLICO E
VARIANTES DO *PENICILLIUM SP* - A presente invenção provê um
método para preparar metabólitos ácidos, como o ácido
5 micofenólico, e uma linhagem de *Penicillium sp.* com o
número de acesso CCM 8364 para uso no referido método, cujo
método produz ácido micofenólico com maiores rendimentos.