

(11) Número de Publicação: PT 832108 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)

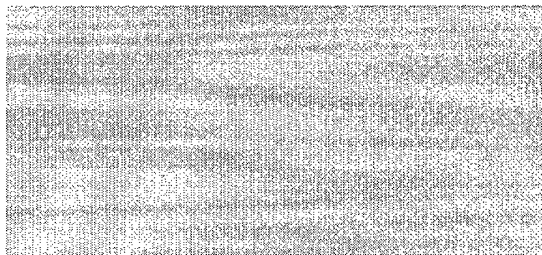
C07K007/64 A C07K001/34 B
C12P021/04 B B01D037/00 B
B01D061/14 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1996.06.07	(73) Titular(es): ABBOTT LABORATORIES CHAD 0377 AP6D-2, 100 ABBOTT PARK ROAD ABBOTT PARK, IL. 60064-3500 US
(30) Prioridade: 1995.06.07 US 472615	
(43) Data de publicação do pedido: 1998.04.01	(72) Inventor(es): ALEXANDER H. CHU US GENE P. WLOCH US
(45) Data e BPI da concessão: 2000.04.26	(74) Mandatário(s): ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PROCESSO PARA RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS INSOLÚVEIS EM ÁGUA A PARTIR DE UM CALDO DE FERMENTAÇÃO

(57) Resumo:





DESCRIÇÃO

"Processo para recuperação de compostos insolúveis em água a partir de um caldo de fermentação"

Campo Técnico

A presente invenção refere-se a um novo processo para recuperação de compostos insolúveis em água a partir de um caldo de fermentação. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um processo para recuperação de ciclosporinas e outros produtos comerciais valiosos a partir de um caldo de fermentação.

Antecedentes da Invenção

No passado têm sido utilizados vários processos para isolar compostos comerciais valiosos, insolúveis em água, a partir de caldos de fermentação. As tecnologias tradicionais para o isolamento deste tipo de compostos empregam separações sólido-líquido (*e.g.* filtração, centrifugação, etc.) para isolar os ingredientes activos insolúveis em água e subseqüentes extracções sólido-líquido para recuperar as actividades. Por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos 4 117 118 e 4 215 199 de Harri descrevem processos para o isolamento de ciclosporinas A e B a partir de caldos de fermentação envolvendo passos de centrifugação, homogeneização e múltiplas extracções (utilizando metanol, cloreto de metileno e outros solventes orgânicos imiscíveis com a água) com correspondentes evaporações (ou seja, concentrações). Posteriormente, os extractos finais são sujeitos a purificações cromatográficas utilizando enchimentos de sílica gel e SEPHADEX[®] LH20. Empregam-se procedimentos semelhantes para o isolamento de outros tipos de compostos insolúveis em água tais como lovastatina (um anti-hipercolesterolémico) e tacrolimus (FK-506, um imunossupressor). Apesar destas metodologias serem actualmente utilizadas para fermentações à escala industrial, estas requerem tipicamente dispendiosos separadores sólido-líquido e extractores/evaporadores/condensadores para solventes, com elevadas carências energéticas. Em adição, os rendimentos da recuperação dos produtos deste tipo de processos são baixos devido a operações em múltiplas etapas. Assim, o



investimento de capital e os subsequentes custos de produção são elevados.

Um outro exemplo, a patente de Rudat *et al.* (Patente US No. 5 256 547) descreve um processo para a produção e isolamento de ciclosporina A que envolve a mistura da cultura com um auxiliar de filtração tal como gesso recristalizado ou alcite moída para formar uma suspensão, e filtração da mistura para obter uma biomassa húmida. A biomassa é então seca e extractada duas ou três vezes com um éster de ácido carboxílico inferior, ou alternativamente com um gás super-crítico tal como dióxido de carbono. O extracto é então desengordurado e cromatografado por HPLC preparativa utilizando sílica gel ou óxido de alumina. Este método oferece vantagens limitadas sobre os descritos em patentes anteriores porque sofre ainda de múltiplas operações complicadas e dispendiosas.

Apesar da utilização tanto de microfiltração (MF) como de ultrafiltração (UF) para clarificar/filtrar caldos de fermentação aquosos, ter sido estabelecida na literatura, as extracções com solventes orgânicos são usualmente realizadas na forma de um passo de purificação secundário para recuperar o produto activo. Tal como anteriormente notado, os procedimentos de purificação convencionais envolvem duas operações unitárias distintas, nomeadamente, separação e extracção/evaporação. De um modo geral, para produtos insolúveis em água, o composto é primeiro isolado a partir do grande volume de caldo de fermentação aquoso e depois é purificado por repetidas extracções do composto com solvente e evaporações do solvente, de modo a que o composto possa ser adicionalmente extraído com um solvente diferente e evaporado até se atingir uma concentração a partir da qual se possa obter a última purificação. As repetidas extracções e evaporações tornam contudo o processo muito oneroso para fabricos em larga escala.

Uma característica única da presente invenção consiste em se ter um sistema de processamento contínuo que obvia a necessidade de passos separados de extracção e evaporação após o passo inicial de centrifugação e/ou filtração. Esta tecnologia oferece muitas vantagens sobre os processos da arte anterior, incluindo a simplicidade de projecto, reduzidos custos de capital e de fabrico, e aumentado rendimento da recuperação. Adicionalmente, ao contrário dos processos tradicionais, todo o processo da presente invenção é



automatizável e completamente fechado, o que reduz a exposição tanto pessoal como ambiental ao composto. Esta é uma consideração importante na medida em que compostos imunossupressores e outros compostos terapêuticos potentes podem ser altamente tóxicos.

Sumário da Invenção

É portando um objectivo da presente invenção proporcionar um processo para a recuperação de compostos insolúveis em água derivados de caldos de fermentação.

É outro objectivo da presente invenção proporcionar um processo para a recuperação de ciclosporinas e outras drogas a partir de um caldo de fermentação que as contenha.

É outro objectivo da presente invenção proporcionar um processo menos oneroso para a recuperação em larga escala de ciclosporinas e outras drogas a partir de um caldo de fermentação.

Outros objectivos da presente invenção serão aparentes aos peritos na arte a partir da presente descrição.

Em resumo, a invenção refere-se a um processo para a recuperação de um composto insolúvel em água a partir de um caldo de fermentação em bruto, compreendendo os passos de:

a. concentração do caldo de fermentação por filtração tangencial através de uma membrana de filtração porosa compatível com o solvente, para produzir um permeado que atravessa a membrana e um retentado que compreende o caldo concentrado, sendo o composto insolúvel em água retido no retentado enquanto o retentado é continuamente recirculado ao longo de um caminho de circulação para formar uma corrente de retentado, em que o caldo em bruto é alimentado na corrente de retentado até que todo o caldo em bruto seja concentrado;

b. solubilização do composto insolúvel em água do retentado por adição de um solvente ao caldo concentrado para produzir uma solução do composto; e

c. filtração ou diafiltração da solução através da membrana porosa do



passo (a) para produzir um permeado de solvente que atravessa a membrana porosa em que o permeado de solvente compreende o composto solubilizado.

Opcionalmente, o permeado de solvente pode ser adicionalmente concentrado utilizando uma membrana de osmose inversa ou de ultrafiltração e purificado por qualquer método conhecido dos peritos na arte.

Breve descrição dos desenhos

A Fig. 1 apresenta uma representação diagramática de uma concretização da invenção.

Descrição detalhada da invenção

O processo de acordo com a presente invenção é dirigido no sentido de recuperar compostos insolúveis em água que são produzidos por fermentações em larga escala. O termo "recuperação", tal como aqui utilizado, refere-se ao processo de remoção de materiais que não o composto de interesse e engloba a remoção do fluido em excesso (*eg.* concentração por eliminação de caldo de fermentação) e/ou remoção de impurezas dissolvidas ou insolúveis. Apesar da remoção do fluido e das impurezas do composto de interesse resultar em alguma purificação do composto, deve-se notar que "recuperação" não necessita de alcançar qualquer grau particular de purificação. Ou seja, a recuperação não resulta necessariamente no composto de acordo com um padrão definido de purificação (tal como uma especificação de National Formulary, United States Pharmacopeia ou European Pharmacopeia); em vez disso, a remoção de fluido e impurezas é por si só suficiente para se conseguir a recuperação.

Uma condição para a utilização da invenção é a de que o composto por si seja insolúvel no caldo de fermentação no final da fermentação. "Composto insolúvel", tal como aqui empregue, refere-se a qualquer composto sólido disperso num líquido ou num gás ou a qualquer emulsão deste composto. A insolubilidade do composto pode resultar das propriedades naturais do próprio composto ou como consequência de ajustamento das condições de pH e iónica da solução. Por exemplo, imunossuppressores tais como ciclosporinas, são



tipicamente produzidos na forma de produtos insolúveis em condições de fermentação. Contudo, certos compostos antibióticos, tais como eritromicina, são tipicamente solúveis no meio de crescimento utilizado para a cultura do organismo produtor, mas podem ser tornados insolúveis no final do processo de fermentação aumentando o pH do caldo para aproximadamente 8,7-11,0. Contudo, quer a insolubilidade do composto seja inerente ao próprio composto quer resulte das condições particulares da solução, um normal perito na arte poderá prontamente entender que o processo de acordo com a presente invenção é aplicável a qualquer composto insolúvel em água, existente em suspensão ou na forma de uma emulsão. Os exemplos de compostos insolúveis em água incluem, mas não se lhes limitam, antibióticos (tais como eritromicinas A, B, C e D), imunossuppressores (tais como ciclosporinas A, B e G, rapamicina, ascomicina ou tacrolimus), hormonas do crescimento, anti-hipercolesterolémicos (tais como lovastatina, pravastatina ou sinvastatina) e quaisquer seus intermediários e/ou derivados.

O modo como a fermentação é realizada não é importante para a invenção, na medida em que podem ser utilizadas quaisquer condições de fermentação conhecidas. Na maioria das circunstâncias, e particularmente para fermentações industriais em larga escala, o meio de cultura e as condições de fermentação (estirpe do organismo, tipo de inóculo, tempo de fermentação, temperatura de fermentação, etc.) são optimizados para produzir um rendimento máximo do composto desejado. Estão descritos exemplos de parâmetros de fermentação adequados para a produção de ciclosporina A e B nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 4 117 118 e 4 215 199 de Harri *et al.*, e 5 256 547 de Rudat *et al.*; os parâmetros de fermentação adequados para a produção dos anti-hipercolesterolémicos lovastatina, sinvastatina, pravastatina e semelhantes, estão descritos nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 4 231 938 de Monaghan *et al.*, 4 444 784 de Hoffman *et al.* E 4 346 227 de Terahara *et al.*; e os parâmetros de fermentação adequados para a produção dos imunossuppressores tacrolimus (FK-506) estão descritos na Patente dos Estados Unidos No. 4 894 366 de Okuhara *et al.*, todas aqui incorporadas por referência. Para as finalidades da presente invenção, o processo de fermentação em si pode ser realizado em qualquer aparelho de fermentação em larga escala ou pequena escala, de dimensões variando entre 10 litros e 100 000 litros.



No final da fermentação, o caldo de fermentação, contendo o composto desejado, é colocado em contacto com uma membrana de filtração compatível com o solvente e filtrado por filtração tangencial. "Filtração tangencial", tal como aqui empregue, refere-se ao processo de passagem de uma suspensão (tal como um caldo de fermentação) através de uma superfície de filtração porosa num fluxo substancialmente contínuo e sob pressão de modo a que uma grande porção do líquido atravessa a membrana de filtração. A porção da suspensão que atravessa a membrana de filtração é referida como "permeado" ou "filtrado"; a porção da suspensão que não atravessa a membrana é denominada "retentado" ou "concentrado". O composto insolúvel em água de interesse permanece no retentado. Deve-se notar que o processo de filtração não requer a remoção completa de todo o meio aquoso a partir do composto insolúvel, ou seja, o retentado pode também compreender algum caldo de fermentação residual. Contudo, o meio aquoso remanescente pode diminuir a eficiência de solubilização do solvente no passo subsequente (descrito adiante) devido a um efeito de diluição. Isto pode, por sua vez, requerer a utilização de mais solvente para conseguir o mesmo grau de eficiência de concentração.

A membrana de filtração pode ser feita de qualquer material capaz de suportar (ou seja, que não sofre deterioração) as condições particulares da solução existentes no final do processo de fermentação, ou seja, elevada ou baixa acidez, elevada ou baixa alcalinidade, elevada ou baixa temperatura, elevada pressão e semelhantes. Adicionalmente, quando se utiliza a mesma membrana de filtração no subsequente passo de filtração (a ver adiante), esta deve ser "compatível com o solvente", ou seja, a membrana de filtração tem que resistir à degradação quando em contacto com o solvente particular a utilizar para solubilizar o composto de interesse (tal como discutido adiante). Pode-se utilizar qualquer membrana de filtração comercialmente disponível para filtração tangencial, apesar de se preferirem membranas do tipo superficial ou não profundas. Membranas "do tipo superficial" ou "não profundas" são as membranas que retêm particulados sobre a sua superfície em vez de absorverem ou capturarem particulados sobre ou no interior da matriz estrutural da membrana. As membranas de filtração adequadas incluem estruturas poliméricas compatíveis com solventes orgânicos feitas de celulose, poliestireno, polissulfona ou poliamida. As membranas de microfiltração preferidas são membranas DURAPORE® HVPP compatíveis com solventes



orgânicos (fabricadas por Millipore Corporation, Bedford, MA 01730) ou estruturas cerâmicas compostas de alumina. A membrana de microfiltração mais preferida é a de alumina cerâmica. Os filtros de alumina cerâmica tais como MEMBRALOX[®], podem ser adquiridos a U.S. Filter Corporation (181 Thorn Hill Rd., Warrendale, PA 15086-7527). As membranas de ultrafiltração compatíveis com o solvente adequadas incluem membranas PZHK (classificação de peso molecular 200 000), também disponíveis de Millipore Corporation.

A dimensão dos poros da primeira membrana de filtração é seleccionada de acordo com a dimensão das partículas do composto insolúvel desejado contido no caldo de fermentação no final do processo de fermentação. Devido à sua natureza hidrófoba, os compostos insolúveis em água, quer se autoagreguem para formar particulados em solução aquosa, quer formem estruturas agregadas em associação com as estruturas do organismo produtor respectivo (*eg.* componentes da parede celular, micélio, etc.). Assim, a dimensão dos poros da membrana na presente invenção é seleccionada de modo a reter as partículas insolúveis desejadas e permitir que outra matéria insolúvel de menores dimensões (quando presente), bem como composto solúveis, passem através na forma do permeado aquoso. "Particulado", como aqui empregue, refere-se quer ao composto insolúvel desejado numa forma autoagregada, quer ao composto desejado associado física e/ou quimicamente a quaisquer matéria ou partículas insolúveis não desejadas. Por exemplo, as ciclosporinas associam-se fisicamente a micélios no final do processo de fermentação. Ocorre um fenómeno semelhante com o imunossupressor tacrolimus (FK-506). Assim, para estes compostos, a dimensão dos poros é seleccionada de modo a reter os particulados de micélio/composto e não o composto específico por si só.

Podem ser empregues membranas de filtração com várias dimensões de poros no primeiro passo de filtração, dependendo da dimensão da matéria particulada de interesse. As membranas de microfiltração preferidas (em particular para a retenção de micélios e ciclosporina) têm dimensões de poros que variam de cerca de 0,02 a 5,0 μm , enquanto as membranas de ultrafiltração úteis têm dimensões de poros que variam de cerca de 0,001 a cerca de 0,05 μm . Entenda-se contudo que um perito na arte pode seleccionar prontamente uma membrana adequada para qualquer particulado desejado de



dimensões conhecidas. Adicionalmente, no interesse da eficiência, é de um modo geral desejável utilizar a maior dimensão de poros que retenha ainda os particulados insolúveis (uma vez que quanto maior a dimensão dos poros maior o caudal, mantendo-se iguais as outras condições). Assim, em adição às membranas de microfiltração e ultrafiltração, estão contempladas na invenção membranas de filtração de poros maiores, desde que retenham o composto de interesse e sejam adequadas para filtração tangencial.

Opcionalmente, podem ser optimizadas outras condições de filtração (uma vez seleccionada uma membrana de filtração) para aumentar a eficiência do processamento do composto e para minimizar os custos de processamento. Por exemplo, tendo seleccionada uma membrana com uma dimensão de poros particular, outras variáveis da filtração, tais como a pressão transmembrana, a velocidade do fluxo tangencial e a temperatura serão correlacionados empiricamente com a velocidade do fluxo de permeado. (A velocidade do fluxo de permeado, também conhecida por velocidade de permeação, refere-se ao volume de permeado gerado por filtração através de uma dada área superficial da membrana e ao longo de um dado período de tempo. Esta velocidade é tipicamente expressa em unidades de litro/metro quadrado/hora ($\text{l/m}^2/\text{h}$). Ajustando as variáveis de filtração, a velocidade do fluxo de permeado pode ser optimizada de modo a reduzir a quantidade de membrana necessária. Por exemplo, um caldo de fermentação pode ter uma velocidade de fluxo de permeado não optimizada de $10 \text{ l/m}^2/\text{h}$. Assim, a filtração de 1000 litros de caldo num período de 10 horas (100 l/h), necessitaria de 10 m^2 de membrana (uma vez que $100 \text{ l}/10 \text{ m}^2/\text{h} = 10 \text{ l/m}^2/\text{h}$). Contudo, por optimização da velocidade do fluxo de permeado para $100 \text{ l/m}^2/\text{h}$ apenas será necessário 1 m^2 de membrana para conseguir o mesmo resultado (*i.e.*, filtração de 1000 litros de caldo num período de 10 horas). Uma vez que o custo da membrana por si só pode contribuir significativamente para o custo global do processamento de grandes volumes de caldo, a redução da área superficial da membrana é uma consideração particularmente importante para operações de aumento de escala.

Após a filtração inicial, o retentado pode opcionalmente ser diafiltrado com aproximadamente dois a quatro volumes de água (relativamente ao retentado) para remover adicionalmente impurezas solúveis em água. "Diafiltração" ou "diafiltragem", tal como aqui empregues, referem-se a um



caso especial de filtração tangencial, ou seja, ao processo de adição de um líquido ao retentado a uma velocidade aproximadamente igual à velocidade de permeação de modo a que o retentado seja mantido geralmente a um volume constante durante a filtração tangencial. "Diafiltrado" é um termo análogo a permeado, e refere-se à porção de suspensão que atravessa a membrana durante o processo de diafiltração. Durante a diafiltração, o caldo de fermentação residual no retentado é continuamente diluído, de modo que a diafiltração também purifica o composto insolúvel desejado dos contaminantes solúveis residuais que permanecem no caldo. Adicionalmente, dependendo do teor de sólidos, tanto a extensão da concentração como o volume de diafiltrado podem variar de modo a minimizar a possibilidade de entupimento da membrana, para reduzir o tempo do processo e para maximizar o rendimento em produto.

No segundo passo do processo de acordo com a invenção, o retentado é misturado com um solvente capaz de solubilizar o composto de interesse para formar uma pasta com o solvente. O solvente e o seu volume são seleccionados de modo a solubilizar preferencialmente o composto de interesse e minimizar a solubilização de outros compostos insolúveis bem como a minimizar a extracção de quaisquer impurezas solúveis presentes no retentado. Os solventes úteis na presente invenção incluem álcoois, ésteres inferiores, éteres inferiores, cetonas inferiores e certos hidrocarbonetos clorados tais como clorofórmio e cloreto de metilo. Os solventes preferidos incluem álcoois, ésteres, éteres e cetonas inferiores, em que "inferior" se refere a hidrocarbonetos lineares ou ramificados de 1-6 carbonos. São exemplos de álcoois inferiores o metanol, o etanol, o propanol, o butanol e o pentanol; são exemplos de ésteres inferiores o acetato de metilo, o acetato de etilo e o butanoato de metilo; são exemplos de éteres inferiores o éter etilmetílico, o éter dietílico e o 2-metoxipentano e são exemplos de cetonas inferiores a propanona, a 2-butanona e a 3-pentanona. Os solventes preferidos para ciclosporinas incluem álcoois inferiores primários ou secundários e propanona. Os peritos na arte podem seleccionar facilmente um solvente adequado conhecendo as propriedades físicas e químicas do composto de interesse.

A quantidade de solvente utilizado é geralmente pelo menos equivalente à quantidade de retentado que permanece no final da primeira filtração, mas pode



exceder grandemente esta quantidade. Tipicamente, utilizam-se dois a seis volumes equivalentes. A eficiência da solubilização depende do volume de solvente, isto é, quanto mais solvente se utilizar mais produto é recuperado do retentado. Contudo, também se prefere utilizar tão pouco volume quanto possível para minimizar o volume de permeado que poderá necessitar de ser concentrado num passo adicional a jusante (como é discutido adiante).

O solvente é misturado com o retentado durante um período de tempo suficiente para solubilizar a maioria do composto insolúvel em água de interesse. Apesar de este período de tempo poder variar de 0 a 24 horas, os períodos de tempo típicos variam de cerca de duas horas a cerca de seis horas. Entenda-se contudo que o tempo óptimo de mistura pode variar, dependendo da quantidade de retentado presente, do composto de interesse, da sua solubilidade no solvente e do volume de solvente utilizado.

No terceiro passo do processo, filtra-se a pasta de solvente por filtração tangencial através de uma membrana de filtração porosa compatível com o solvente. A membrana de filtração é preferivelmente a mesma membrana de filtração que se utilizou no primeiro passo do processo mas pode-se também utilizar uma membrana de filtração fresca ou diferente (desde que o solvente seja compatível). Uma vez que o composto desejado está agora dissolvido em solvente, o permeado de solvente, e não o retentado, é recolhido durante o processo de filtração. Apesar da pasta ser finalmente rejeitada, após a permeação, a pasta pode opcionalmente ser diafiltrada com solvente adicional. De um modo semelhante à diafiltração aquosa anteriormente descrita, a diafiltração com solvente é conseguida por adição do solvente à pasta residual a uma velocidade aproximadamente igual à velocidade de permeação. Nesta situação, o solvente adicional serve para extrair adicionalmente composto residual não solubilizado que permaneça na pasta. O diafiltrado de solvente subsequente obtido é combinado com o permeado de solvente e constitui o permeado de solvente reunido.

A concentração adicional do permeado de solvente reunido pode opcionalmente ser conseguida por filtração tangencial através de uma membrana compatível com o solvente possuindo uma dimensão de poros diferente da previamente utilizada. A membrana de retenção utilizada neste



passo é seleccionada de modo a reter o composto desejado com base na dimensão solubilizada do composto (*i.e.* peso molecular) e não na sua dimensão particulada (agregado insolúvel) e a permitir que o solvente passe através da membrana na forma de permeado (que é rejeitado). Empregam-se para este fim membranas de ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) ou osmose inversa (OI) com limites de exclusão de pesos moleculares específicos (MWCO). As membranas de UF/MWCO adequadas para a concentração do permeado recolhido incluem membranas de acetato de celulose regeneradas de configuração do tipo placa e quadro ou em espiral, que estão comercialmente disponíveis de Millipore Corporation. As membranas de NF e OI/MWCO adequadas incluem os módulos MPS da série SeIRO™ desenvolvidos por Membrane Products Kiryat Weizmann Ltd. (P.O.B. 138, 76101 Rehovot, Israel) e distribuídas nos E.U.A. por LCI Corporation (P.O. Box 16348 Charlotte, NC 28297) e também incluem os módulos em espiral de acetato de celulose da série NANOMAX™ também disponíveis de Millipore Corporation.

Após a concentração na membrana, o produto pode opcionalmente ser ainda processado por cristalização ou cromatografia. No caso de purificação por cromatografia, a solução pode ser colocada em contacto com um meio cromatográfico que retenha selectivamente o composto de interesse contido na solução. Tipicamente, um tal meio cromatográfico é uma matriz microporosa (preparada por copolimerização de estireno e divinilbenzeno) ou um gel de sílica poroso ou óxido de alumina. A matriz deve ter uma área superficial suficientemente grande para ligar os componentes desejados do produto alimentado. Os meios cromatográficos úteis na presente invenção incluem enchimentos poliméricos, suportes ou resinas. Os exemplos destes meios cromatográficos incluem os meios das séries SEPHAROSE®, SEPHADEX® e SEPHACRYL®, (disponíveis de Pharmacia Biotech Incorporated, 800 Centennial Ave., P.O. Box 1327, Piscataway, NJ 08855-1327), DOWEX® (disponível de Dow Chemicals, Midland, MI), meios das séries BIO-REX®, MACROPREP® e BIO-GEL® (disponíveis de BioRad Laboratories, 85A Marcus Drive, Melville, NY 11747) e enchimentos da série Tentacle (disponíveis de EM Separations Technology, 350 Columbia St., P.O. Box 352, Wakefield, RI 02880). Um exemplo de um enchimento polimérico não funcional é AMBERCHROM™ CG161-m que pode ser adquirido a TosoHaas (Independence Mall West, Philadelphia, PA 19105).



Num outro passo opcional, o composto concentrado pode ser purificado uma segunda vez com um meio cromatográfico adequado tal como sílica gel ou enchimentos de C8 ou C18 de fase inversa. Os meios cromatográficos para estas purificações são bem conhecidos dos normais peritos na arte. Num passo opcional final do processo, o composto pode ser extraído para um outro solvente orgânico, concentrado e cristalizado. Os cristais são então separados por filtração ou centrifugação e secos sob vácuo para obter o produto final purificado.

Numa concretização preferida e particularmente para fermentações em larga escala, o isolamento do composto insolúvel em água desejado é realizado num sistema de circulação fechada como apresentado na Fig. 1. O caldo de fermentação (A) é introduzido através de uma primeira porta de entrada (1) no sistema que compreende um tanque de recepção (2), um primeiro tubo conector (4) que se prolonga desde a porta de saída (3) do tanque de recepção (2) até à porta de entrada (6) do módulo de filtração (7), uma bomba (5) para bombear o caldo de fermentação (em bruto ou concentrado) através do primeiro tubo conector (4), um módulo de filtração (7), uma membrana de filtração (8) alojada no interior do módulo de filtração (7) e um segundo tubo (10) que se prolonga desde a porta de saída (9) do módulo de filtração (7) até uma segunda porta de entrada (11) do tanque de recepção (2).

Em operação, o caldo de fermentação em bruto (A) entra primeiro no tanque de recepção (2) através de uma porta de entrada (1), de onde escoar, sob pressão criada pela bomba (5), para e através do primeiro tubo conector (4) para o módulo de filtração (7). No interior do módulo de filtração (7), o caldo entra em contacto com a membrana de filtração (8). O caldo passa através da membrana de filtração (8) e é filtrado por filtração tangencial para produzir um permeado (B), que é descarregado através de uma porta de saída (12) e um retentado (C). O retentado (C) entra então num segundo tubo conector (10) que se prolonga desde a porta de saída (9) do módulo de filtração (7) para a segunda porta de entrada (11) do tanque de recepção (2). O caldo concentrado (C) entra no tanque de recepção (2) onde é misturado com o caldo de fermentação (A) não concentrado que entra. Assim, o caldo de circulação forma uma corrente de retentado, que escoar unidireccionalmente através do sistema



fechado. Na concretização preferida, o sistema é projectado de modo a fazer circular o caldo de fermentação aproximadamente sob 3-50 psi de pressão transmembranar (TMP) e a uma temperatura controlada de aproximadamente 30-60°C. O caldo é feito circular através do sistema fechado até aproximadamente um quarto ou metade do volume de caldo inicial ficar no retentado.

De modo a minimizar o problema do entupimento da membrana (resultante da concentração do caldo), o sistema pode opcionalmente ser projectado de modo a incorporar um mecanismo de retropulsção, o qual serve para forçar periodicamente o permeado em sentido inverso através do elemento de filtração. Como resultado da retropulsção, a camada de colmatação é levantada da membrana e levada no fluxo tangencial de retentado. Como alternativa ou em adição ao mecanismo de retropulsção, o projecto do sistema pode incorporar qualquer configuração de alimentação e purga conhecida na arte. Estas configurações ajudam a evitar sobreconcentração local de retentado sobre a membrana. Assim, um perito na arte pode prontamente adaptar o sistema para evitar o entupimento da membrana por qualquer método conhecido.

Deve-se notar também que o sistema de operação descrito pode ser reconfigurado e/ou significativamente aumentado de modo a acomodar grandes volumes de caldo e a minimizar os custos de processamento. Por exemplo, o sistema de operação pode ser projectado com numerosos módulos de filtração (em paralelo ou em série), múltiplas bombas, condutas e tanques de recepção. Os grandes sistemas de operação podem ser parcial ou completamente automatizados. Adicionalmente, os grandes sistemas de operação podem incorporar mais passos de purificação a jusante como parte de um esquema global de recuperação/purificação. Assim, os indivíduos com normal perícia na arte nas artes da engenharia química poderão prontamente aumentar a escala ou adaptar o sistema de operação em conformidade com os recursos disponíveis (ou seja, equipamento e espaço) e para conter os custos de fabrico.

No segundo passo do processo, a porta de saída (12) do permeado do módulo da membrana de filtração (7) está fechada. Depois, adiciona-se um solvente adequado ao retentado no tanque de recepção (2), através da mesma



porta de entrada (1) que o caldo de fermentação em bruto. O solvente é misturado com o composto de interesse durante duas a seis horas até a maioria do composto estar dissolvido.

No passo seguinte, a porta de saída é reaberta e a pasta com solvente é recirculada através de todo o sistema fechado onde entra em contacto e é filtrada através da membrana de filtração do primeiro passo. Ao contrário do primeiro passo, onde o permeado aquoso contém pouco composto, o permeado de solvente contém a maioria do composto na forma de produto dissolvido. Portanto, é continuamente recolhido num tanque de armazenagem para posterior processamento a jusante. Na concretização preferida, uma vez reiniciada a corrente de retentado, adiciona-se solvente fresco continuamente ao tanque de recepção para manter um volume de pasta constante. Por outras palavras, a pasta de solvente é diafiltrada com solvente fresco para extrair continuamente qualquer produto residual para a fase líquida. O diafiltrado de solvente é então combinado com o permeado de solvente no tanque de armazenagem separado.

No final do passo de diafiltração com solvente, a adição de solvente fresco é interrompida e a pasta de solvente é adicionalmente concentrada apenas por filtração. Este passo permite a um fabricante recuperar a máxima quantidade do produto da pasta antes de rejeitar a pasta esgotada como resíduo. Se necessário, pode ser projectado um quarto passo de um modo tal que possa ser adicionada água ao concentrado de pasta esgotada para recuperar solvente residual que possa não ser desejável para tratamento anaeróbio do resíduo (uma vez que a presença de solvente orgânico usualmente aumenta a BOD (demanda biológica ou bioquímica de oxigénio). Também, o solvente recuperado deste passo de lavagem pode ser reciclado ou destilado para reutilização para minimizar o impacto ambiental. Isto completa então os três ciclos de operações com membranas que estão resumidos na Tabela 1 que se segue.

O permeado de solvente reunido (ou seja, permeado de solvente mais diafiltrado de solvente) é subsequentemente concentrado utilizando um módulo de OI em espiral da série NANMAX™ da Millipore. Depois, o concentrado pode ser adicionalmente purificado por recristalização ou cromatografia. Num

exemplo típico, carrega-se uma coluna AMBERCHROM™ CG161-m com uma quantidade de concentrado de ciclosporina em bruto e o leite é eluído com um gradiente de etanol-água (20-60%). As fracções individuais são analisadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) ou cromatografia em camada fina (TLC) para determinar as fracções que contêm a actividade do produto. A solução cromatografada e/ou todas as fracções reunidas de eluente podem então ser concentradas por ultrafiltração ou osmose inversa e adicionalmente purificadas por quaisquer métodos conhecidos dos normais peritos na arte. A solução concentrada pode também ser extractada com um solvente adequado para a preparar para a purificação final.

Tabela 1

<u>Ciclo No.</u>	<u>Processo</u>	<u>Alimentação</u>	<u>Retentado</u>	<u>Permeado</u>
1	Concentração de composto	Caldo de fermentação	Caldo (produto)	Resíduo aquoso
1a*	Diafiltração	água	Caldo (produto)	Resíduo aquoso
2	Solubilização/ Mistura	Solvente	Pasta (produto)	Nenhum
3	Filtração	Nenhum	Pasta (produto residual)	Líquido clarificado (produto)
3a*	Diafiltração	Solvente fresco	Pasta (produto residual)	Líquido clarificado (produto)
3b*	Concentração da pasta	Nenhum	Pasta (produto residual)	Líquido clarificado (produto)
4*	Lavagem	água	Pasta esgotada	Solvente recuperado

* refere-se a passos opcionais

A invenção será agora adicionalmente descrita por meio de exemplos. Os exemplos são meramente ilustrativos da invenção e não se pretende com eles limitar o âmbito da invenção de nenhum modo.



Exemplo 1

Recuperação de ciclosporinas por microfiltração em cerâmica e extracção com metanol

Alimentaram-se aproximadamente 160 litros de caldo de fermentação de ciclosporina de uma Operação CD-263 contendo 5,1% de sólidos secos e 10% de sólidos molhados em suspensão, a uma tanque de recepção. A unidade de membrana consistia em dois elementos de membrana de microfiltração em cerâmica (CMF) ROMICON[®] (Koch Membrane Systems, Inc., 850 Main Street, Wilmington, MA 01887) de 0,2 μm (em série), possuindo cada uma delas uma área superficial de 0,2 m^2 . A pressão de entrada foi regulada para 60 psi e o caldo foi recirculado através do sistema enquanto o permeado aquoso contendo as impurezas insolúveis em água era removido. Após 90 minutos, tempo durante o qual a velocidade do fluxo de permeado média foi de 183 $\text{l/m}^2/\text{h}$, o volume foi concentrado para aproximadamente 50 litros. Depois, adicionou-se água fresca ao tanque de recepção à mesma velocidade da velocidade de permeação para continuar a remoção de água e impurezas associadas. A velocidade do fluxo de permeado foi medida como aproximadamente 150 $\text{l/m}^2/\text{h}$. Recolheram-se aproximadamente 155 litros de permeado e diafiltrado e analisou-se uma amostra por HPLC; foi detectada pouca actividade de ciclosporina na amostra.

Num segundo passo, adicionaram-se 100 litros de metanol ao tanque de recepção que continha 50 litros de caldo concentrado (diafiltrado), fechou-se a válvula para a membrana e misturou-se a pasta durante duas horas. A unidade de CMF foi reiniciada e o produto dissolvido foi separado pela membrana (*ie*, como permeado) e recolhido num tanque de produto. A velocidade do fluxo de permeado iniciou-se a 105 $\text{l/m}^2/\text{h}$ sob uma pressão de 60 psi (entrada) e 32 psi (saída) e diminuiu lentamente para 36 $\text{l/m}^2/\text{h}$. Aumentou-se então a pressão para aproximadamente 80 psi (entrada) e 55 psi (saída) enquanto a temperatura era mantida a 28-30°C. Após concentração da pasta para 100 litros, adicionaram-se 20 litros de metanol para lavagem (de modo a aumentar o rendimento de ciclosporina). Recuperaram-se cerca de 27 gramas (64%) de ciclosporina enquanto ficavam ainda 15 gramas (36%) presentes no retentado após a lavagem com metanol, como determinado por HPLC.



Exemplo 2

Recuperação de ciclosporinas por microfiltração em cerâmica e extracção com metanol/acetato de etilo

Alimentaram-se aproximadamente 8 litros de caldo de fermentação de ciclosporina de uma Operação CD-265 contendo 4,6% de sólidos secos, a um tanque de recepção. A unidade de membrana consistia em um elemento de membrana de microfiltração em cerâmica (CMF) CERAFLOR[®] da Millipore de 0,2 μm , possuindo uma área superficial de 0,12 m^2 . A pressão de saída foi regulada para 20-30 psi e a pressão de entrada para 50-55 psi. O caldo foi recirculado através do sistema enquanto o permeado aquoso contendo as impurezas solúveis em água era removido. A velocidade do fluxo de permeado inicial através da membrana era de 450 $\text{l/m}^2/\text{h}$, e diminuiu lentamente para 100 $\text{l/m}^2/\text{h}$ após 30 minutos de filtração. O volume foi concentrado para aproximadamente 2 litros e adicionaram-se mais 8 litros de caldo fresco, que se concentraram adicionalmente para aproximadamente 2 litros. A velocidade do fluxo de permeado diminuiu para cerca de 50 $\text{l/m}^2/\text{h}$. Depois, adicionou-se ao tanque um total de 12 litros de água destilada em alíquotas de 2 litros, à mesma velocidade que a velocidade de permeação (diafiltração) para continuar a remoção de água e impurezas associadas. A velocidade do fluxo foi medida como aproximadamente 50-65 $\text{l/m}^2/\text{h}$.

Num segundo passo, fechou-se a válvula para a membrana e adicionaram-se 2 litros de metanol ao tanque de recepção; misturou-se então a pasta durante duas horas. Adicionaram-se 2 litros adicionais de metanol/acetato de etilo (50/50 v/v) antes de se reiniciar a unidade de CMF. O produto de ciclosporina, dissolvido no solvente de metanol/acetato de etilo, foi diafiltrado através da membrana e recolhido num tanque de produto. A velocidade do fluxo iniciou-se a 75 $\text{l/m}^2/\text{h}$ sob uma pressão de 48 psi (entrada) e 26 psi (saída) e aumentou lentamente para 155 $\text{l/m}^2/\text{h}$ com a diafiltração com um total de 16 litros de metanol/acetato de etilo. A temperatura não foi controlada e flutuou entre 28-36°C durante a diafiltração com solvente.



Exemplo 3

Extracção com metanol de ciclosporina A utilizando uma membrana cerâmica Niro[®] de 0,05 µm

Alimentaram-se aproximadamente 140 litros de caldo de fermentação de ciclosporina de uma Operação CD-268 contendo 11,3% de sólidos secos e 26% de sólidos molhados em suspensão, a um tanque de recepção. A unidade de membrana consistia em um elemento de membrana de microfiltração em cerâmica (CMF) Niro[®] de 0,05 µm, possuindo uma área superficial de 0,3 m², e canais com 6 milímetros (mm) de diâmetro. A pressão de entrada foi regulada para 60 psi e o caldo foi recirculado através do sistema enquanto o permeado aquoso contendo as impurezas solúveis em água era removido. A velocidade do fluxo de permeado inicial através da membrana era de 246 l/m²/h, e diminuiu lentamente para 48 l/m²/h após 90 minutos. O volume de caldo foi concentrado para aproximadamente 58 litros e depois adicionaram-se 72 litros água destilada ao tanque de recepção para continuar a remoção de água e impurezas associadas. A velocidade do fluxo de permeado aumentou para aproximadamente 220-280 l/m²/h devido ao efeito de diluição. Após concentração do caldo diluído para 40 litros, adicionaram-se 90 litros adicionais de água destilada para continuar a lavagem do caldo. Analisou-se o permeado recolhido por HPLC que apresentou pouca actividade (aproximadamente 0,002 gramas/l) de ciclosporina A. Quando se concentrou o caldo (retentado) para 38 litros, interrompeu-se a unidade cerâmica e adicionaram-se 92 litros de metanol e misturou-se durante aproximadamente 14 horas para dissolver a ciclosporina na fase de álcool.

Reiniciou-se a unidade de CMF e o produto dissolvido no permeado de metanol foi separado pela membrana e recolhido num tanque de produto. A velocidade do fluxo de permeado de solvente iniciou-se a 50 l/m²/h sob uma pressão de 68-70 psi (entrada) e 38-40 psi (saída) e diminuiu lentamente para 14 l/m²/h. A temperatura iniciou-se a 35°C e aumentou lentamente para cerca de 50°C com o calor gerado pela recirculação. Recolheu-se um total de 70 litros de metanol contendo o produto para processamento adicional.



Exemplo 4

Extracção com etanol de ciclosporina A utilizando uma membrana cerâmica Niro[®] de 0,05 µm

Bombearam-se aproximadamente 30 500 l de caldo de fermentação da operação Run-102 para um tanque de recepção que alimentava (quatro ciclos de recirculação cada um contendo quatro) em série módulos de microfiltração em cerâmica (CMF) Niro[®] (que alojavam membranas de 0,05 µm com um total de 60 m² área superficial para o sistema). As pressões transmembranares foram controladas a aproximadamente 5 a 15 psi e as temperaturas da alimentação foram controladas de 35°C a 45°C. As velocidades do fluxo de permeado variaram de 23 l/m²/h a 62 l/m²/h. O material foi concentrado para 9 000 l e com aproximadamente 24 000 l de água. As velocidades de fluxo do permeado variaram de 44 l/m²/h a 70 l/m²/h. Concentrou-se o material para um volume final de 8 100 l. Adicionaram-se então ao concentrado aproximadamente 10 900 l de álcool etílico de qualidade 3A Especialmente Desnaturado e aqueceu-se a 35°C a 40°C durante duas horas. Diafiltrou-se a pasta de solvente com 19 000 l adicionais de álcool etílico de qualidade 3A Especialmente Desnaturado. Concentrou-se a lama até um volume final de aproximadamente 6 500 l e continha menos de 5% de actividade de caldo em bruto como determinado por HPLC. Recolheram-se aproximadamente 35 000 l de permeado de solvente e subsequentemente concentraram-se por osmose inversa como descrito no Exemplo 5 que se segue.

Exemplo 5

Concentração de ciclosporina A utilizando uma membrana de osmose inversa NANOMAX[™]-50 de Millipore

Alimentaram-se aproximadamente 35 000 l de solução em etanol enriquecida em ciclosporina da operação Run-102 a uma unidade de osmose inversa Millipore contendo um total de 180 m² de área superficial de membranas NANOMAX[™]-50. As membranas são compatíveis com etanol até 70% (em peso) e portanto a corrente de alimentação foi parcialmente diluída com água e clarificada por filtração antes da alimentação à unidade de osmose inversa. O material foi bombeado a partir de um tanque de alimentação até uma bomba de

alta pressão de múltiplos andares. O produto foi bombeado através das membranas a velocidades de fluxo tangencial de 120-170 l/min e o retentado foi feito retornar ao tanque de alimentação. A pressão transmembranar foi tipicamente controlada a 500 psi com a temperatura controlada a 39°C-47°C. As velocidades de fluxo de permeado variaram de 3,3-15,3 l/m²/h. O permeado da osmose inversa continha apenas actividade residual de ciclosporina e foi rejeitado.

Exemplo 6

Concentração adicional de ciclosporina A utilizando uma membrana de ultrafiltração da série PLAC 1000 MWCO da Millipore

Colocaram-se aproximadamente 20 litros de permeado de metanol contendo ciclosporina A da microfiltração em cerâmica do caldo de fermentação (operação CD-273) num tanque de alimentação de um sistema de ultrafiltração PROSTAK™ de Millipore. Utilizou-se uma membrana de celulose regenerada PLAC de 0,93 m² com MWCO de cerca de 1 000, num módulo do tipo placa e quadro de fluxo tangencial. Manteve-se a temperatura da corrente a 28-30°C utilizando um permutador de calor com água de arrefecimento. As pressões de entrada e de saída foram controladas a aproximadamente 80 psi e 68 psi, respectivamente, e a pressão transmembranar (TMP) foi controlada a cerca de 55 psi. A velocidade do fluxo de permeado iniciou-se a 11,6 l/m²/h e acabou a 8,4 l/m²/h após uma concentração de 5 vezes (ou seja, 4 litros de retentado final). O produto foi retido no retentado e removeu-se metanol no permeado. O rendimento típico de produto para este passo de concentração em membrana foi de cerca de 94% com 6% do produto perdido no permeado. Finalmente, o sistema foi lavado e limpo com metanol fresco seguido por água destilada para restabelecer a velocidade de fluxo inicial.

Lisboa, -7 JUN. 2000

Por ABBOTT LABORATORIES

- O AGENTE OFICIAL -



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Processo de recuperação de um composto insolúvel em água a partir de um caldo de fermentação em bruto, compreendendo os passos de:

a. concentração do referido caldo de fermentação por filtração tangencial através de uma membrana de filtração porosa compatível com o solvente, para produzir um permeado que atravessa a referida membrana e um retentado que compreende o referido caldo concentrado, sendo o referido composto insolúvel em água retido no referido retentado enquanto o referido retentado é continuamente recirculado ao longo de um caminho de circulação para formar uma corrente de retentado, em que o referido caldo em bruto é alimentado na referida corrente de retentado até que todo o referido caldo em bruto seja concentrado;

b. solubilização do referido composto insolúvel em água do referido retentado por adição de um solvente ao referido caldo concentrado para produzir uma solução do referido composto; e

c. filtração ou diafiltração da referida solução através da referida membrana de filtração do passo (a) para produzir um permeado de solvente que atravessa a referida membrana de filtração em que o referido permeado de solvente compreende o referido composto solubilizado.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1 em que o referido composto é seleccionado de entre o grupo que consiste em um imunossupressor, um antibiótico macrólido, um anti-hipercolesterolémico, uma ciclosporina, e seus derivados e intermediários.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2 em que o referido composto é um imunossupressor seleccionado de entre ciclosporina A, ciclosporina B, ciclosporina G, rapamicina, ascomicina e tacrolimus.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3 em que o referido imunossupressor é ciclosporina A.

5. Processo de acordo com a reivindicação 2 em que o referido composto é um anti-hipercolesterolémico seleccionado de entre lovastatina, pravastatina, sinvastatina e fluvastatina.



6. Processo de acordo com a reivindicação 2 em que o referido composto é um antibiótico macrólido seleccionado de entre as eritromicinas A, B, C e D.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1 em que a referida membrana de filtração tem uma dimensão de poros de cerca de 0,001 μm a cerca de 5,0 μm .

8. Processo de acordo com a reivindicação 1 em que a referida membrana de filtração tem uma dimensão de poros de cerca de 0,001 μm a cerca de 0,05 μm .

9. Processo de acordo com a reivindicação 1 em que a referida membrana de filtração é seleccionada de entre o grupo que consiste em celulose, poliestireno, polissulfona e poliamida.

10. Processo de acordo com a reivindicação 1 em que a referida membrana de filtração é alumina cerâmica.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10 em que a referida membrana de filtração tem uma dimensão de poros de cerca de 0,05 μm a cerca de 5,0 μm .

12. Processo de acordo com a reivindicação 1 em que o referido solvente do passo b é seleccionado de entre o grupo que consiste em álcool inferior, éster inferior, éter inferior e cetona inferior.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12 em que o referido solvente é um álcool seleccionado de entre metanol, etanol, propanol e butanol.

14. Processo de acordo com a reivindicação 1 compreendendo adicionalmente o passo de diafiltração do referido caldo concentrado através da referida membrana de filtração do passo (a) antes da solubilização do referido composto no passo (b).

15. Processo de acordo com a reivindicação 1 compreendendo adicionalmente o passo de concentração do referido permeado de solvente numa membrana de osmose inversa ou ultrafiltração.

Lisboa, -7. JUN. 2000

Por ABBOTT LABORATORIES

- O AGENTE OFICIAL -



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rue das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

Handwritten signature

1/1

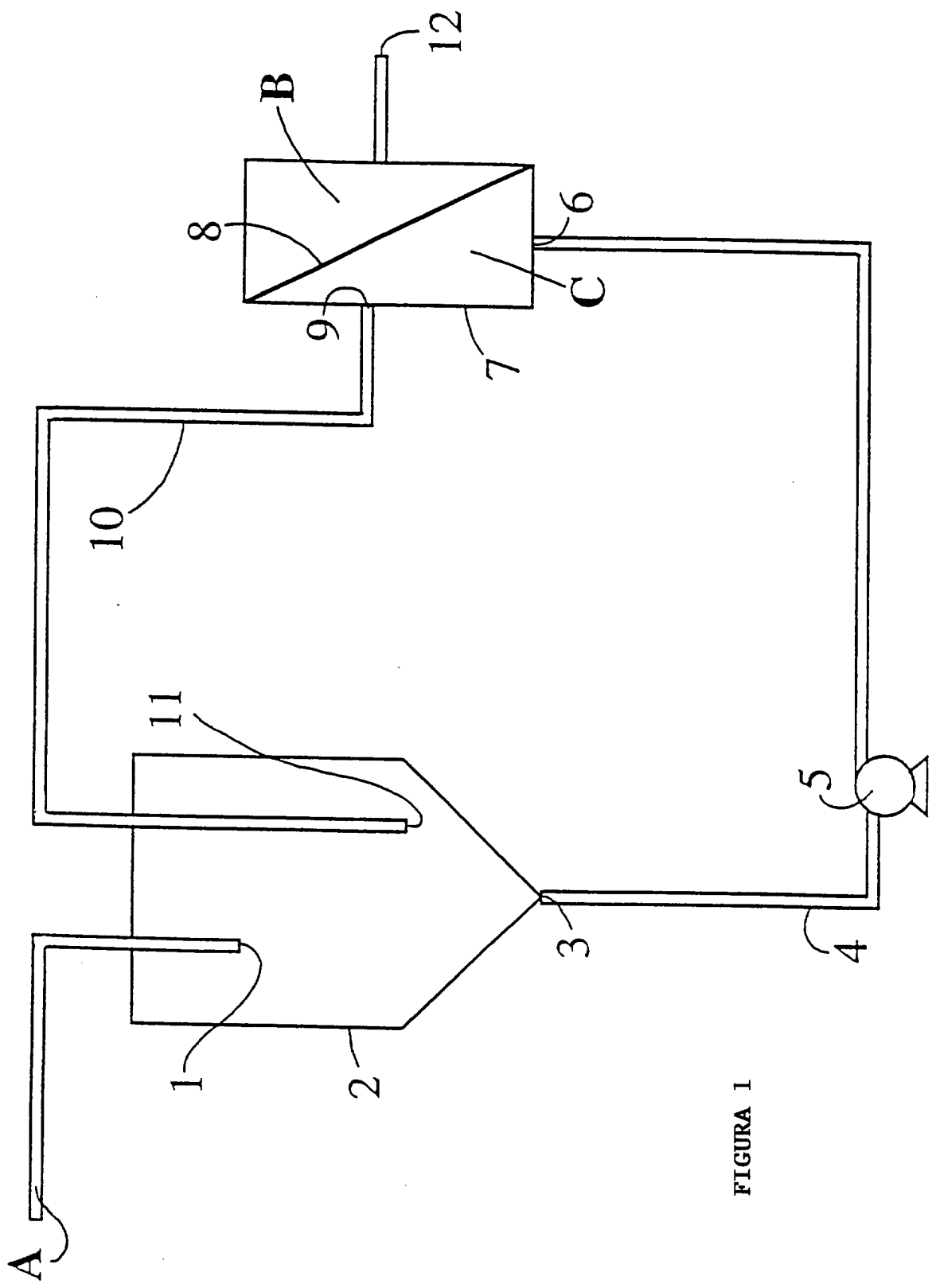


FIGURA 1