



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 91171 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

| | |
|--------------|--------------|
| C07K001/14 A | C12P021/02 B |
| C07K007/10 - | C12P021/02 C |
| C12R001:45 C | |

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

| | |
|--|--|
| (22) <i>Data de depósito:</i> 1989.07.14 | (73) <i>Titular(es):</i> DR. KARL THOMAE, GMBH - D-7950 BIBERACH AM RISS DE |
| (30) <i>Prioridade:</i> 1988.07.15 US 219698 | |
| (43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.02.08 | (72) <i>Inventor(es):</i> ROLF-GUNTER WERNER DE HANS ZAHNER DE GUNTHER JUNG DE THOMAS HORNER DE ROLAND KELLNER DE |
| (45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 08/94 1994.08.17 | (74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT |

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE EPIDERMINA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 91 171


REQUERENTE: DR.KARL THOMAE GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER
HAFTUNG, alemã, industrial e comercial, com se
de em D-7950 Biberach an der Riss, República
Federal Alemã.

EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFI
CAÇÃO DE EPIDERMINA " .

INVENTORES: Dr.Rolf-Günter Werner, Prof.Hans Zähler, Prof.
Dr.Günther Jung, Thomas Horner, Roland Kellner
Hans-Peter Fiedler.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Norte-americano em 15 de Julho de 1988 ,
son o nº . 219,698.



Descrição referente à patente de invenção de DR. KARL THOMAE GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG, alemã, industrial e comercial, com sede em D-7950 Biberach an der Riss, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Rolf-Günter Werner, Prof. dr. Hans Zähner, Prof. Dr. Günther Jung, Thomas Hörner, Roland Kellner, Hans-Peter Fiedler, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE EPI-
DERMINA".

DESCRIÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a obtenção do polipeptídeo epidermina.

O antibiótico epidermina é conhecido através do pedido de Patente Europeia 85 113 908.9 (número de publicação O 181 578).

Nessa publicação descreve-se um processo para a obtenção, para o isolamento e para a purificação desta substância a partir de um caldo de cultura obtido com a participação de uma estirpe resistente de Staphylococcus epidermidis. A estirpe resistente foi depositada em 26.10.1984 sob o número DSM

M.A.:

~~CONFIDENTIAL~~

3095 na "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen". Para o isolamento do componente activo procede-se à sua concentração quer através de extracção com n-butanol do filtrado da cultura liberta de células e de cal, evaporação do extracto de butanol, diluição em metanol do resíduo e agitação numa quantidade em excesso de éter dietílico frio para separação das impurezas lipídicas, obtendo-se a actividade no precipitado, quer por adsorção do filtrado da cultura centrifugado para concentração da epidermina em Amberlite XAD-8 ou em tipos análogos deste polímero numa base de éster acrílico (Firma Serva), sendo a epidermina adsorvida eluída da resina com metanol/ácido clorídrico concentrado (99:1) e isolada por evaporação da solução metanólica clorídrica após neutralização com amoníaco. Uma cromatografia realizada de seguida do eluído da Amberlite XAD ou do extracto de butanol de que se eliminaram os lípidos, respectivamente, em Sephadex LH-20 com metanol/ácido acético (95:5) se para um grande número de pequenos peptídeos, ácidos aminados e sais do meio do antibiótico. Numa distribuição em contracorrente multiplicativa realizada de seguida de acordo com Craig, numa primeira distribuição do fluído com o sistema de n-butanol/acetato de etilo/ácido acético 0,1 N (3:1:3), o antibiótico mantém-se na parte inicial do aparelho. Numa segunda distribuição de Craig com o sistema neutro 2-butanol/acetato de amónio 0,05 N (1:1) o antibiótico encontra-se no meio do aparelho. O acetato de amónio é removido por liofilização sob alto vácuo e a epidermina formada surge após a liofilização sob a forma de um pó branco, apresentando homogeneidade em todos os sistemas de camada fina empregues. Deste modo é possível obter a partir de 80 litros de filtrado da cultura (por adsorção em Amberlite XAD-8, cromatografia em gel Sephadex LH-20 e repartição multiplicativa de acordo com Craig) 2,6 g de epidermina liofilizada.

A cultura da estirpe produtora *Staphylococcus epidermidis* DSM 3095 realiza-se, tal como descrito na referência mencionada, aerobicamente a 37°C num meio complexo com uma composição de 2 a 4% de extracto de carne, 1 a 3% de extracto de

malte e 0,25 a 1% de CaCO_3 ou 0,25 a 0,5% de Ca(OH)_2 (percentagens de peso). Deste modo o máximo de actividade antibiótica é alcançado após 18 a 32 horas.

Verificou-se que o antibiótico epidermina pode ser obtido em rendimentos substancialmente superiores e de modo mais simples, por meio de adsorção do antibiótico formado no filtrado da cultura ou no caldo da cultura, contendo ainda o microorganismo, em Amberlite XAD-1180 ou em Amberlite XAD-16 ou em tipos de polímeros modificados com base em copolímeros de estireno/divinilo através de uma coluna ou, no caso de caldo da cultura, também por adições sucessivas da resina. O componente activo é separado da resina por eluição com metanol/ácido clorídrico diluído, especialmente 0,01 N (9:1, v:v), o eluído é ajustado a um valor de pH entre 5,3 e 5,8 e é feito contactar com um permutador catiónico fraco, tal como Amberlite IRC-50 ou uma resina análoga, como por exemplo Amberlite-IRC-84, podendo a permuta iónica ter lugar numa coluna ou também por adições sucessivas, neste último caso de preferência através de adição dupla de uma quantidade de 3 por cento em volume de cada vez da resina ao eluído da resina XAD dentro de um período de uma hora. Após a adsorção a resina é feita passar através de uma coluna, as substâncias não ligadas são em seguida retiradas por lavagem com uma solução de tampão de fosfato de sódio 0,05 N em água a pH 7,0 e a epidermina é em seguida eluída com uma solução de 80% do tampão de fosfato de sódio acima mencionado, contendo uma concentração 1,5 N em cloreto de sódio e 20% em volume de metanol, a um valor de pH entre 6,0 e 8,0, de preferência 7,0.


Para desmineralização ajusta-se valor de pH do eluído a 6,0 e faz-se contactar para adsorção sucessivamente numa resina do tipo do copolímero de estireno/divinilo anteriormente referido, p.ex. em Amberlite XAD-1180. Os sais são eliminados por lavagem com água e em seguida a epidermina é eluída com metanol/ácido acético a 50% (9:1, v:v). Após remoção do

~~CONFIDENTIAL~~

solvente e liofilização obtém-se uma epidermina bruta liofilizada. A partir deste produto bruto é possível isolar a epidermina pura por meio de cromatografia de HPLC preparativa (high performance liquid chromatography) com ajuda de Nucleosil 100 C-18 (10 μ m) ou de Lichro-Sorb RP Select B. Para esse fim, a epidermina é eluída e é lavada de modo faseado, primeiro com um solvente A, constituído por água com 1% do peso de ácido fórmico, e depois com um solvente B, constituído por metanol/água (80:20, v:v) com 1% em peso de ácido fórmico.

De acordo com técnicas do processuais fermentativas é possível realizar a obtenção da epidermina por meio de uma fermentação descontínua ("batch"), por meio de uma fermentação modificada com adições apropriadas realizadas durante o processo ("feeding"), na qual são adicionados alguns nutrientes isolados durante a fermentação, por meio de uma fermentação com adsorção descontínua da epidermina realizada como no caso da adsorção "on line" e por meio de uma fermentação com adsorção "on line" em contínuo.

Na fermentação descontínua, chamada fermentação em "batch", foram obtidos os melhores resultados com uma solução nutriente da seguinte composição: 3,3% de extracto de carne, 3% de extracto de malte e 0,37% de hidróxido de cálcio (% em peso). É vantajoso para o rendimento efectuar uma adição de 1 a 5% em peso de um cloreto de um metal alcalino, tal como cloreto de sódio ou cloreto de potássio, e 0,001 a 0,002% em peso de iões de ferro, p.ex. sob a forma de FeCl_3 e/ou FeSO_4 , e ainda de cloreto de amónio ou de sulfato de amónio (entre 57 e 200 m molar); as concentrações aproximadas preferidas são de 3% em peso de cloreto de sódio e 0,00125% em peso de cloreto férrico. A influência de concentrações iniciais de 3% de cloreto de sódio e de diferentes concentrações de cloreto de férrico na produção de epidermina é apresentada na Figura 1. De todas as fontes de carbono os melhores resultados foram obtidos com a maltose de extracto de malte. É conveniente que a adição




de glucose seja feita apenas em conjunto com outras fontes de carbono. Uma combinação de lactose com maltose ou de galactose com maltose deu igualmente bons resultados. Uma combinação de glucose com maltose ou com lactose ou com galactose deu origem ao mesmo rendimento que o extracto de malte. Com todas as outras fontes de carbono tradicionais não se verificou qualquer produção de epidermina, ou apenas se verificou uma produção diminuta.

A fermentação realiza-se sob bom arejamento a temperaturas entre 34 e 37°C, de preferência a 36°C. Os melhores resultados da produção foram obtidos quando o pH da fermentação se situava entre 6,0 a 7,0. Na ausência de carbonatos ou de hidróxidos de catiões bivalentes, como carbonato de cálcio ou hidróxido de cálcio, apenas se obtém uma produção reduzida. Após adição de, por exemplo, carbonato de cálcio o valor de pH mostra um percurso característico com redução até à zona ácida, verificando-se neste caso apenas uma produção fraca. Se se faz subir em seguida o valor do pH para a zona alcalina inicia-se a produção. Em vez de carbonato de cálcio também se pode empregar carbonato de magnésio. O hidróxido de cálcio permite melhores resultados que o carbonato de cálcio. Com 50 mM de hidróxido de cálcio a produção pode ser um pouco superior em comparação com 25 mM de carbonato de cálcio. Ao utilizar as fontes de carbono (açúcares) a estirpe forma ácidos orgânicos, como p.ex. ácido acético, que podem ser complexados através de catiões bivalentes, obtendo-se simultaneamente uma tamponização do meio. O acréscimo de actividade no instante de produção máxima por meio da estirpe DSM 3095, avaliado por meio do teste de difusão em placas (determinação do diâmetro de inibição em mm contra *Micrococcus luteus* ATCC 9341), com utilização de uma linha calibrada, tomando a actividade numa solução nutriente de infusão Brain-Heart de acordo com a EP-A-0 027 710 como 100%, foi como se apresenta em seguida:

segundo processo de acordo com o estado da técnica:

- ~~CONFIDENTIAL~~
- a.) agar de infusão de Brain-Heart
de acordo com EP-A-0 027 710 100%,
 - b.) 3% de extracto de carne, 2% de extrac-
to de malte, carbonato de cálcio 25 mM
de acordo com EP-A-0 131 578 200%,
 - c.) 3% de extracto de carne, 2% de extrac-
to de malte, hidróxido de cálcio 50 mM
de acordo com EP-A-0 131 578 320%;
- segundo o processo de acordo com a presente invenção:
- d.) 3,3% de extracto de carne, 3% de extracto
to de malte, hidróxido de cálcio 50 mM 440%,
 - e.) 3,3% de extracto de carne, 3% de extracto
to de malte, hidróxido de cálcio 50 mM,
3% de cloreto de sódio, cloreto de fer-
ro(III) 75 μ M 1720%,
 - f.) 3,3% de extracto de carne, 3% de extracto
to de malte, hidróxido de cálcio 50 mM,
adição de glucose, de KH_2PO_4 e de cloreto
to de amónio 1950%,
 - g.) 3,3% de extracto de carne, 3% de extracto
to de malte, hidróxido de cálcio 50 mM
ou adsorção "on line" da epidermina a-
pós as primeiras fases de isolamento,
outros aditivos ver sob o ponto f 2780%.

A Fig. 2 mostra o decurso da fermentação tal como anteriormente descrito em d); a Fig. 1 mostra a dependência da produção de epidermina em relação à adição de 3% de cloreto de sódio e de diversas quantidades de cloreto de ferro(III), tal como referido em e). Todos os valores em percentagem anteriormente mencionados referem-se a percentagens em peso. A fig. 3



mostra o decurso da fermentação tal como se descreve sob o ponto f) e a Fig. 4 o mesmo processo com intercalação da adsorção "on line" tal como referido no ponto g).


Uma comparação do valor obtido por meio do teste de difusão em placas ou por HPLC mostra, na utilização do processo da presente invenção com as suas variantes em comparação com os processos conhecidos em si, um aumento significativo do rendimento da epidermina, nomeadamente de 320% até 2780%.

Em seguida descrevem-se com mais pormenor cada fase e as condições para se levar a cabo o processo da presente invenção.

A estirpe produtora pode ser conservada, de preferência com congelação (-18°C), num meio contendo 3,3% em peso de extracto de carne, 3% em peso de extracto de malte, 0,37% em peso de hidróxido de cálcio em 40% em peso de glicerina (o resto é água). Para cada fermentação deixa-se crescer uma pré-cultura durante 18 horas a 36°C num meio de agar (pH 7,2 a 7,4), que contém por litro 8 g de Lab Lemco Pulver (Firma Oxoid), 10 g de peptona, 3 g de cloreto de sódio, 2 g de Na_2HPO_4 , 15 g de agar e 10 g de glucose esterilizada.

A fermentação pode ser realizada em balões de Erlenmeyer apropriados para este fim e para a preparação de maiores quantidades de substância podem também ser empregues fermentadores de 200 litros ou mais.

Para as experiências em balões são utilizados balões de Erlenmeyer de 500 ml com uma indentação lateral. Os balões são cheios com 100 ml de solução nutriente e são colocados em autoclave durante 20 minutos a 121°C . Como material de inoculação pode utilizar-se 1% de uma pré-cultura com uma idade de 8 horas. A incubação realiza-se a 36°C num agitador orbital com 160 rotações por minuto (rpm).

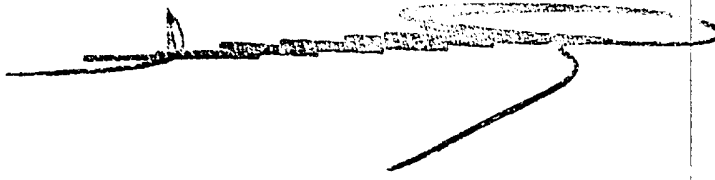


Para a fermentação numa escala de 15 l carregou-se um fermentador de 20 l (tipo b 20. de Braun/Melsungen ou de Giovanola Freres, Monthey, Suíça; com sistema de agitação mecânica) com 15 l de solução nutriente e com adição de 0,5 ml de um poliol (propilenoglicol) e esterilizou-se in situ a 121° C durante 30 minutos. Para inoculação utilizaram-se 150 ml de uma pré-cultura com uma idade de 8 horas. A fermentação foi levada a cabo a uma temperatura de 35 até 37°C, com 0,2 a 0,6 vvm e 700 a 1000 rpm, de preferência a 36°C, com 0,4 vvm e 900 rpm.

Obtenção da epidermina por fermentação em "batch".

Nos biorreactores utilizados o melhor crescimento e o melhor rendimento em epidermina tiveram lugar a 36°C com um nível de arejamento de 0,4 vvm e uma agitação de 900 rotações por minuto. Um arejamento reduzido ou uma rotação mais lenta diminuem o rendimento da epidermina (Fig. 5). Um reforço do arejamento e da rotação conduziu a um fraco melhoramento do rendimento e também a uma formação intensa de espuma. Esta circunstância é devida à forte actividade de superfície do antibiótico e a supressão da espuma por meios mecânicos ou químicos não foi possível sem prejuízo da actividade.

A Fig. 2 mostra o decurso de uma fermentação em "batch" numa escala de 20 l com a estirpe fortemente produtora DSM 3095 numa solução nutriente contendo 33 g de extracto de carne, 30 g de extracto de malte, 3,8 g de hidróxido de cálcio em 1 litro. Esta estirpe gera assim epidermina numa quantidade até 80 mg/l. É possível detectar um crescimento intenso juntamente com a utilização das fontes de carbono adicionadas com formação de acetato por meio da queda do valor de pH. O número máximo de células é alcançado após 30 horas. Após este tempo são esgotadas as fontes de carbono fermentáveis principais, tais como glucose e maltose. O fosfato adicionado é consumido após 8 horas. A concentração máxima do antibiótico é alcançada



após 48 horas e é de 30 mg/l.

Tanto a adição de cloretos, como cloreto de sódio ou cloreto de cálcio, numa quantidade até 70 g por litro, como a de FeCl_3 ou de FeSO_4 até 150 mM aumentam o rendimento de epidermina sem prolongamento do processo de fermentação (Fig. 1). Obteve-se um rendimento máximo da epidermina de 310 mg/l com a adição simultânea de 3% de cloreto de sódio e 75 mM de cloreto de ferro(III) ao meio de produção.


Esta produção de epidermina rápida oferece uma boa possibilidade para o desenvolvimento de um processo de fermentação contínua com altas quantidades de circulação do meio empregue.

Obtenção da epidermina por fermentação "feedind".

Para se conseguir aumentar o rendimento de epidermina através do prolongamento da fase de crescimento e da obtenção de uma alta densidade celular, foram necessárias altas concentrações tanto das fontes de carbono como do fosfato adicionado. A produção de epidermina está sujeita a uma repressão catabólica forte (Fig. 6) e é também regulada através do conteúdo em fosfato do meio (Fig. 7).

A concentração de azoto mantém-se durante todo o processo de fermentação acima de 150 mM, mas a maior parte deste conteúdo não pode ser utilizada pelos microorganismos. Em culturas em balões realiza-se a adição de sais de amónio até 150 mM tal como consta da Fig. 8 (para cloreto de amónio), para um estímulo importante da produção de epidermina.

A glucose é metabolizada antes do acetato, tal como mostra o aumento da acidez do meio. Se o açúcar escassear, os ácidos orgânicos são utilizados como fontes de carbono, alterando-se o valor de pH do meio para a zona alcalina. Por es-




ta razão adiciona-se a glucose em dependência do pH durante o processo de fermentação. O valor do pH é fixado em pH 6,0, não se reprimindo a acidificação.

Adicionam-se fosfatos de forma contínua. A velocidade de adição é regulada em função da velocidade de utilização de fosfato nas fermentações "batch", nas quais se adiciona fosfato até 10 mM.

A adição de glucose e de fosfato provoca um aumento significativo do rendimento de epidermina quer quando são adicionados isoladamente quer em conjunto. O maior conteúdo em epidermina, o qual se verificou quando se adiciona glucose de acordo com o valor do pH durante a fermentação, não depende das fontes adicionais de carbono, sendo devido a uma formação mais lenta do antibiótico em meio ácido. É possível verificar esta dependência por meio de fermentações em que se conservou constante o pH por adição de ácido sulfúrico. Apenas o desenvolvimento de uma fermentação "feeding" combinada com uma adição de glucose em dependência do pH e com uma adição contínua de fosfatos e de azoto amoniacal permite a obtenção de um aumento significativo da biomassa como de um aumento do rendimento em antibiótico. A Fig. 3 mostra o decurso de uma fermentação "feeding" combinada.

A massa celular cresce até triplicar, atingindo 2×10^{11} células por ml; o máximo rendimento de epidermina é de 350 mg/l. Se bem que a máxima concentração celular se atinja logo após 24 horas, o rendimento máximo de epidermina é obtido durante a fase estacionária após 72 horas; no decurso da fermentação "feeding" não é possível identificar a fase de crescimento e a fase de produção que caracterizam a fermentação em "batch". Pelo contrário a produção de epidermina torna-se dependente estreitamente do crescimento dos organismos. Logo na fase exponencial alcançam-se 80% do rendimento total e em seguida aumenta a biomassa por meio do número das células vivas,



de tal modo que a fase estacionária deve ser considerada como um estado equilibrado entre o crescimento e a lise das células.

A adição de cloreto de sódio durante a fermentação "feeding" não tem como resultado a mesma acção estimulante como no caso da fermentação em "batch". Durante as primeiras 24 horas a velocidade de produção foi 40% mais elevada e a velocidade de crescimento 70% mais elevada do que no caso da fermentação "feeding". A produtividade específica do microorganismo é por essa razão 20% mais baixa; após 24 horas termina a produção de epidermina, o que tem a sua razão de ser numa limitação dos nutrientes por meio de um factor até agora desconhecido ou num envenenamento do organismo por meio de um produto secundário que possa ocorrer como resultado do metabolismo.

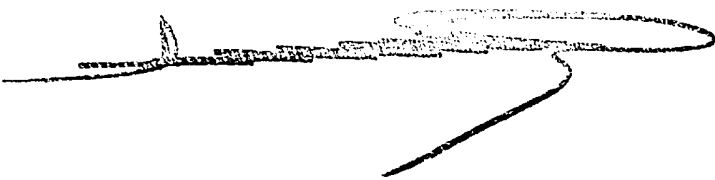
A fermentação "feeding" combinada foi também efectuada na escala de 200 l numa instalação piloto utilizando o mesmo factor de arejamento, a mesma velocidade de agitação e as mesmas condições de adição. Sem qualquer optimização adicional conseguiu-se um rendimento de epidermina da ordem de 80 a 90% do rendimento obtido na escala de 20 l.

Obtenção de epidermina com adsorção "on line" do antibiótico.

Adsorção descontínua:

A fim de tornear a inibição retroactiva ("feed back") e outras influências possíveis sobre o organismo produtor e a fim de proteger a epidermina já formada da influência destruidora de proteases e do calor, retirou-se de forma descontínua a epidermina a partir do caldo de fermentação durante o decurso da fermentação.

Para este fim, pulverizou-se o caldo de fermentação inteiro, incluindo o organismo produtor, por meio de pressão numa câmara de adsorção de forma esférica cheia com Amber-



lite XAD-1180. Provocou-se deste modo uma turbolência importante da resina e uma adsorção rápida da epidermina. A resina sob a forma de esferas facilmente móveis foi separada por filtração através de uma rede (abertura da malha 0,25 mm), fazendo-se em seguida retornar para o fermentador o caldo de fermentação com a biomassa (Fig. 9). Na Fig. 4 mostra-se a evolução de uma fermentação "feeding" com adsorção descontínua da epidermina. Os parâmetros e as condições da fermentação foram idênticos aos anteriormente descritos. A máxima massa celular foi obtida após 46 horas com 4.10^{11} células e o rendimento máximo de epidermina após a eluição a partir da resina foi de 500 mg/l. A duração integral da fermentação foi a mesma do que a da fermentação "feeding".

A primeira purificação ou pré-purificação foi simplificada por meio da inclusão da primeira fase de isolamento no processo de fermentação; o rendimento da epidermina depois desta primeira fase de purificação foi 50% superior em comparação com o rendimento da fermentação "feeding" antes da purificação.

Adsorção contínua:

A adsorção contínua "on line" da epidermina durante o processo da fermentação foi efectuada por meio de uma instalação de filtração tangencial ("cross flow"). O produto retido foi feito retornar ao reactor enquanto que o filtrado foi adsorvido numa coluna de Amberlite XAD-1180. Também se fez retornar o eluído para o reactor (comparar com Fig. 10). A adsorção foi estabelecida após 12 a 15 horas do início da fermentação. O rendimento máximo de epidermina após separação do antibiótico a partir da resina adsorvente foi obtido num máximo de 500 mg/l após 80 a 90 horas.

O esquema de isolamento otimizado, como se pode verificar na Fig. 10, representa um grande avanço na investiga

ção tendente a aumentar a produção de epidermina. Como resulta do final, obtém-se a partir do composto da adsorção de acordo com a presente invenção com a cromatografia de permuta iônica um produto com uma pureza de 80%. A utilização de um processo em "batch" ou também de um processo com adsorção "on line" conduz a um método rápido de purificação da epidermina.

Para o controlo do decurso da fermentação recolheram-se amostras de modo estéril e diferentes momentos durante a fermentação. As amostras foram analisadas do modo seguinte:

a) Valor do pH:

Medição com um aparelho de determinação do pH de laboratório (pH-mV-Meter Knick)

b) Decurso do crescimento:

Foi possível seguir o crescimento por meio do acréscimo do número de células vivas.


Para este fim diluíram-se em solução salina 0,5 ml de uma amostra da cultura e inocularam-se placas com amostras de 0,1 ml (meio: peptona 10 g, extracto de carne 8 g, cloreto de sódio 3 g, hidrogenofosfato dissódico 2 g, glucose 10 g para 1 litro). Após 18 horas de incubação a 37°C foi possível contar as colónias.

c) Concentração de antibiótico:

As amostras foram centrifugadas numa centrífuga de Eppendorf 3200 durante 2 minutos e foram ensaiadas utilizando 10 µl do sobrenadante no teste de difusão em placas ou por meio de HPLC, como se descreve em seguida. Paralelamente traçou-se uma curva padrão com concentrações conhecidas.

Sistema de HPLC:

| | | |
|---------------------------|---|--|
| Volume injectado | : | 10 µl |
| Solvente de arrastamento: | A | : água com 0,05 % de ácido perclórico a 70 % |



| | | | | |
|-----------|-----|---|------|------|
| | B | : acetonitrilo | | |
| Gradiente | | : Minutos | A | B |
| | 0 | | 77,5 | 22,5 |
| | 8 | | 63,0 | 37,0 |
| | 8,5 | | 0 | 100 |
| | 9,5 | | 0 | 100 |
| | 10 | | 77,5 | 22,5 |
| | 14 | | 77,5 | 22,5 |
| Caudal | | : 2 ml/min | | |
| Deteccão | | : 210 nm | | |
| Coluna | | : Nucleosil 7 C-18 com a respectiva pré-coluna. | | |

d) Determinação de fosfato:

O conteúdo em fosfato no filtrado da cultura foi determinado de acordo com o método de Itaya e Ui (1966) em Clin.

Chim. Acta 14, 361-366.

e) Determinação do azoto:

A concentração de azoto foi determinada de acordo com o método de Kjeldahl com um aparelho de destilação automático (tipo Kjeldahlsystem II, da firma Tecador).

f) Determinação da glucose e de maltose:

O conteúdo de glucose e de maltose no meio foi determinado por via enzimática com um "kit" de análise da firma Boehringer de Mannheim.

g) Determinação do acetato:

Esta determinação foi efectuada por meio de cromatografia em fase gasosa de acordo com as instruções de Platen e Schink (1987), Arch. Microbiol. 149, 136-141.

h) Determinação da epidermina:

A concentração de epidermina no caldo de cultura foi determinada umas vezes por análise microbiológica e outras vezes por HPLC de acordo com Fiedler et al., 1987, Chromatogra-

phia 24, 433-483.

Após se ter atingido o máximo de produção centrí-
fugou-se o caldo de cultura por meio de centrifugação contínua
(centrífuga: tipo LA 71b-4, Iohr & Söhne, Ruhstorf/Rott) a
1380 rpm. Para uma separação óptimas das células o caudal deve
ser mantido muito reduzido. Conseguiu-se uma primeira concentra-
ção dos componentes activos por meio do método de adsorção em
copolímeros de estireno-divinilo anteriormente descrito.

Já foram descritos anteriormente outros proces-
sos para a adsorção do antibiótico, por exemplo por adsorção
em "batch" e por processos de adsorção descontínua e contínua
sem e com separação da massa celular.

Os exemplos que se seguem destinam-se a elucidar
mais completamente a presente invenção:

Exemplo 1

Fermentação em "batch" com a estirpe de Staphylococcus epider-
midis DSM 3095:

Meio: 3,3% em peso de Lab Lemco Pulver
3,0% em peso de extracto de malte
0,38% em peso de hidróxido de cálcio
pH 6,5 (com H_2SO_4 3 N)

Reactor; tipo b 20 (Giovanola) com 15 l de meio

Arejamento: : 0,4 vvm
Frequência de agitação: 900 r/min
Temperatura : 36°C:

Resultado: Rendimento máximo de epidermina: 80 mg/l após 48 h;
Resultados ver Fig. 2.

Exemplo 2

Fermentação "feeding" com a estirpe de Staphylococcus epider-

midis DSM 3095:

Meio: 3,3% em peso de Lab Lemco Pulver
3,0% em peso de extracto de malte
0,38% em peso de hidróxido de cálcio
pH 6,5 (com H_2SO_4 3 N)

Reactor; tipo b 20 (Giovanola) com 15 l de meio

Arejamento : 0,4 vvm
Frequência de agitação : 900 r/min
Temperatura : 36°C:

Condições de adição:

Solução 1:

Glucose 1 kg, água 1 l, pH 6,0. Esta solução foi adicionada em função do pH, sendo pH do meio de fermentação ajustado a 6,0.

Solução 2:

NH_4Cl 500 g, KH_2PO_4 120 g, água ,1,5 l, pH 6,0 (ajustado com NaOH anidro). A solução foi adicionada de forma constante com um caudal de 1 ml por litro e hora. A adição foi iniciada após 4 horas.

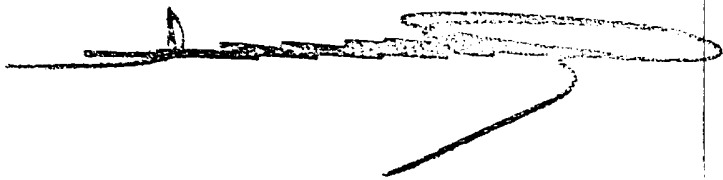
Resultado: Rendimento máximo de epidermina: 350 mg/l após 72 h;
Resultados ver Fig. 3.

Exemplo 3

Fermentação "feeding" com adsorção "on line" do antibiótico:

Meio: ver Exemplo 2
Reactor: ver Exemplo 2
Adsorção: em Amberlite XAD-1180; 150 g de peso seco

Resultados: Rendimento máximo de epidermina: 350 mg/l após 72 h; o rendimento em epidermina foi determinado depois da 1ª fase do isolamento (ver também Exemplo 4). Para os resultados ver também a Fig. 4.



Exemplo 4

Isolamento e purificação da epidermina a partir de um caldo de cultura de 15 l após utilização da adsorção "on line":

Após adsorção "on line" da epidermina durante o processo da fermentação lavou-se a resina (ver Exemplo 3) com 150 l de água e, quando se utilizou uma câmara de adsorção, fez-se passar por uma coluna para nova lavagem e eluição.

Lavagem: 5 l de metanol/H₂O 1:1 (v:v)

Eluição: 5 l de metanol/ácido clorídrico 0,01 N 9:1 (v:v).

O valor do pH do eluído foi ajustado a 5,5; a epidermina foi adsorvida na resina por adição de 2 porções de 45 g cada de Amberlite IRC-50 num período de uma hora ao eluído. A resina foi carregada numa coluna para lavagem e eluição.

Lavagem: 2 l de tampão de fosfato de sódio 0,05 N a pH 7,0;

Eluição: 10 l de fosfato de sódio 0,05 N, cloreto de sódio 1,5 N em água/metanol 8:2 (v:v), pH 7,0.

A fim de desmineralizar a solução ajustou-se o valor do pH do eluído a 6,0 e adsorveu-se a epidermina por fases sucessivas em Amberlite XAD-1180 em 2 cargas de 75 g de peso seco cada uma num período de 1 hora. Para lavagem e eluição encheu-se uma coluna com a resina.

Lavagem: 20 l de água


Eluição: 2,5 l de metanol/ácido clorídrico 0,01 N 9:1 (v:v).

Depois de se eliminar o solvente por evaporação e de se liofilizar o eluído obtiveram-se 6500 mg de uma substância que continha 5200 mg de epidermina (pureza 80%). A purificação final foi levada a efeito por HPLC preparativa com eluição por gradiente:

Coluna: Nucleosil 100 C-18 (10 µm)

Solvente: A: água com 1% em peso de ácido fórmico

B: metanol/água 8:2 contendo 1% de ácido fórmico.

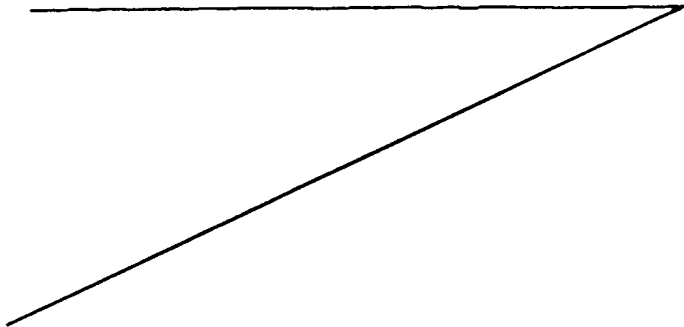



Após HPLC preparativa ("hight performance liquid chromatography") e liofilização obtiveram-se 4,94 g de epidermina pura. O antibiótico apresenta-se como uma única substância em todos os ensaios realizados com o produto obtido. Na Fig. 10 apresenta-se o fluxograma.

Durante a preparação e o isolamento da epidermina utilizou-se para controlo e para caracterização biológica o ensaio de difusão em placa. Para uma descrição mais exacta podem ser seguidos os métodos descritos em EP-A-85 113 903.8. Nesta publicação define-se mais em pormenor a estirpe Staphylococcus epidermidis DSM 3095.

O caldo de cultura obtido com a estirpe DSM 3095 pode também ser substituído por um caldo de cultura obtido a partir da estirpe NCIB 11536 (depositada na National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen) obtendo-se do mesmo modo a epidermina a partir deste caldo por isolamento e purificação final. Com respeito à produção de epidermina, no entanto, considera-se a estirpe DSM 3095 preferida em relação à estirpe NCIB 11536.

A epidermina possui actividade como antibiótico contra infecções na pele, como eczemas, impetigo, celulite e acne.





REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para o isolamento de epidermina a partir de um caldo de cultura ou de um filtrado da cultura de uma estirpe de Staphylococcus epidermidis e para a purificação desta substância caracterizado por

- a.) fazer contactar o filtrado da cultura ou o caldo da cultura com um copolímero de estireno-divinilo,
- b.) libertar o componente activo da resina por eluição com metanol/ácido clorídrico diluído,
- c.) ajustar o pH do eluído a um valor de 5,3 a 5,8,
- d.) fazer contactar o eluído com um permutador de catiões fraco
- e.) em seguida retirar a substância não ligada por lavagem com uma solução tampão a pH 7,
- f.) eluir o componente activo do permutador de catiões com uma solução composta por uma substância tampão, cloreto de sódio e metanol a um pH de 6,0 a 8,0 e, para purificação,
- g.) readsorver a substância activa do eluído num copolímero de estirenodivinilo, lavar a resina com água para eliminar os sais, dissolver a epidermina a partir da resina com uma mistura metanol/ácido acético e evaporar ou liofilizar a solução, podendo ainda a epidermina deste modo obtida ser em seguida submetida a uma cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) para conseguir uma purificação fina.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se extrair a epidermina a partir do caldo de cultura ou do filtrado de cultura por adsorção num copolímero de

- 19 -

~~CONFIDENTIAL~~


estireno-divinilo, libertar a substância activa da resina com metanol/ácido clorídrico 0,01 N (9:1 v:v), fazer contactar o eluído, cujo pH foi ajustado a um valor entre 5,3 e 5,8, com um permutador catiónico constituído por um copolímero de ácido metacrílico-divinilbenzeno, como a Amberlite IRC-50 ou IRC-84, tendo a permuta iónica lugar numa coluna ou também por adições sucessivas, retirar as substâncias não ligadas a partir da resina por lavagem com um tampão de fosfato de sódio 0,05 N a pH 7,0, dissolver a substância activa a partir da resina com uma solução constituída por 80% de tampão de fosfato, 20% de metanol, que é 1,5 N em relação a cloreto de sódio, a pH 7, ajustar o eluído obtido deste modo a um valor de pH de 6,0 e fazer contactar com uma resina constituída por um copolímero de estireno-divinilo, purificando-o em seguida por eliminação dos sais por lavagem, libertar a epidermina desta resina com metanol/ácido acético a 50% (9:1 v:v) e evaporar ou liofilizar o eluído, podendo a epidermina deste modo obtida, se desejado, ser ainda submetida a uma purificação final por meio de cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) preparativa.

- 3ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 e 2, caracterizado por a produção da epidermina ser levada a efeito por uma fermentação com adições sucessivas num biorreactor a uma temperatura de 35 a 37°C, com um grau de aeração de 0,2 a 0,6 vvm e uma velocidade de agitação de 700 a 1000 rpm com adição de um cloreto, de preferência de cloreto de sódio, numa quantidade de até 70 g por litro e/ou de um sal de ferro numa quantidade de até 150 mM.

- 4ª -

Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por se adicionarem fontes de carbono e/ou fosfatos e/ou amoníaco ou sais de amónio de modo contínuo ou descontínuo



ao caldo de fermentação no decurso da fermentação.

- 5ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado por se retirar de forma descontínua durante o decurso da fermentação a partir do caldo de fermentação a epidermina formada por adsorção num copolímero de estireno-divinilo, sendo o caldo de fermentação tratado deste modo e a biomassa feita retornar ao fermentador.

- 6ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado por se retirar de forma contínua durante o decurso da fermentação a epidermina formada por adsorção "on line" a partir do caldo de fermentação num copolímero de estireno-divinilo, sendo o retentado feito retornar continuamente ao fermentador.

- 7ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado por o meio de cultura conter 2 a 4% em peso de extracto de carne, 1 a 3% em peso de extracto do malte ou de maltose, galactose, lactose, glucose ou misturas de lactose com maltose ou de galactose com maltose e 0,25% a 1% em peso de carbonato de cálcio ou 0,25 a 0,5% em peso de hidróxido de cálcio e ainda de modo facultativo 1 a 6% em peso de um cloreto alcalino, 0,001 a 0,002% em peso de iões de ferro e sais de amónio numa quantidade correspondente a uma solução 57 a 200 m molar a um pH entre 6 e 7.

- 8ª -

Processo de acordo com a reivindicação 7, carac-

terizado por o meio de cultura conter 3,3% em peso de extracto de carne, 3% em peso de maltose, 0,37% em peso de hidróxido de cálcio e eventualmente 1 a 6% em peso de cloreto de sódio e/ou de cloreto de potássio, 0,001 a 0,002% em peso de iões de ferro, de preferência sob a forma de cloreto férrico ou de sulfato ferroso, bem como sais de amónio, de preferência cloreto de amónio ou sulfato de amónio numa quantidade correspondente a uma solução 57 a 200 m molar, e eventualmente também hidrogenofosfato de potássio ou de sódio a um pH entre 6 e 7.

- 9ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado por a estirpe produtora de epidermina usada ser Staphylococcus epidermidis DSM 3095.

- 10ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado por a estirpe produtora de epidermina usada ser Staphylococcus epidermidis NCIB 11536.

A requerente reivindica a prioridade do pedido norte-americano apresentado em 15 de Julho de 1938, sob o número de série 219,693.

Lisboa, 14 de Julho de 1939
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



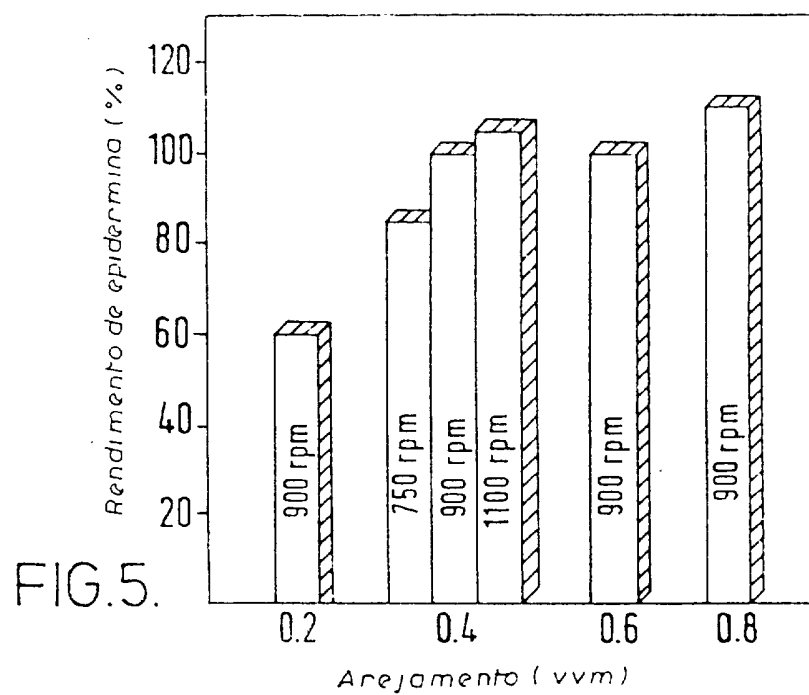
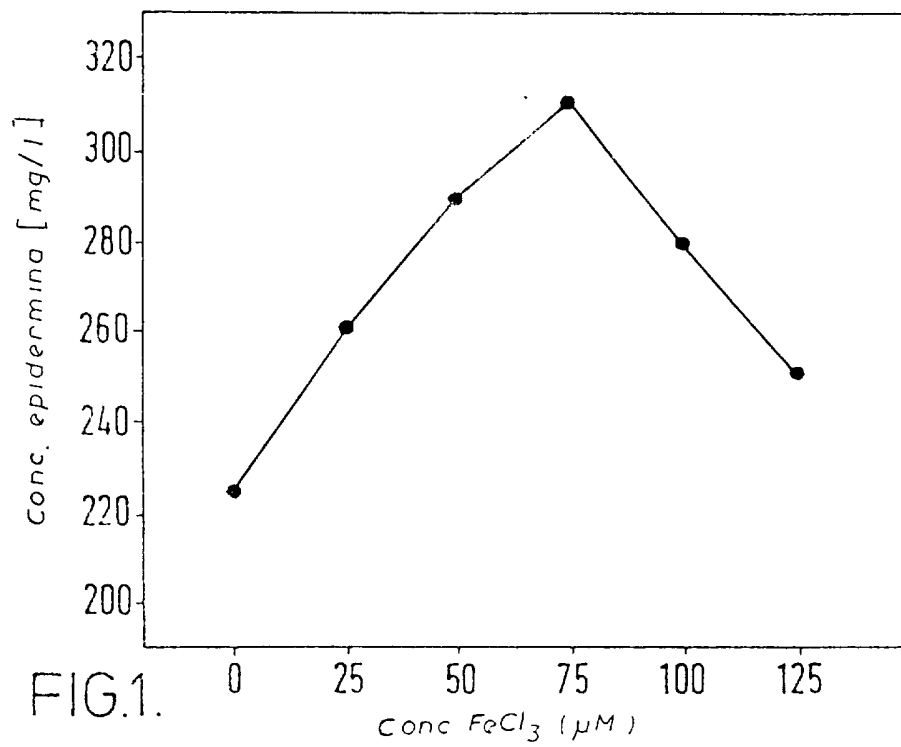


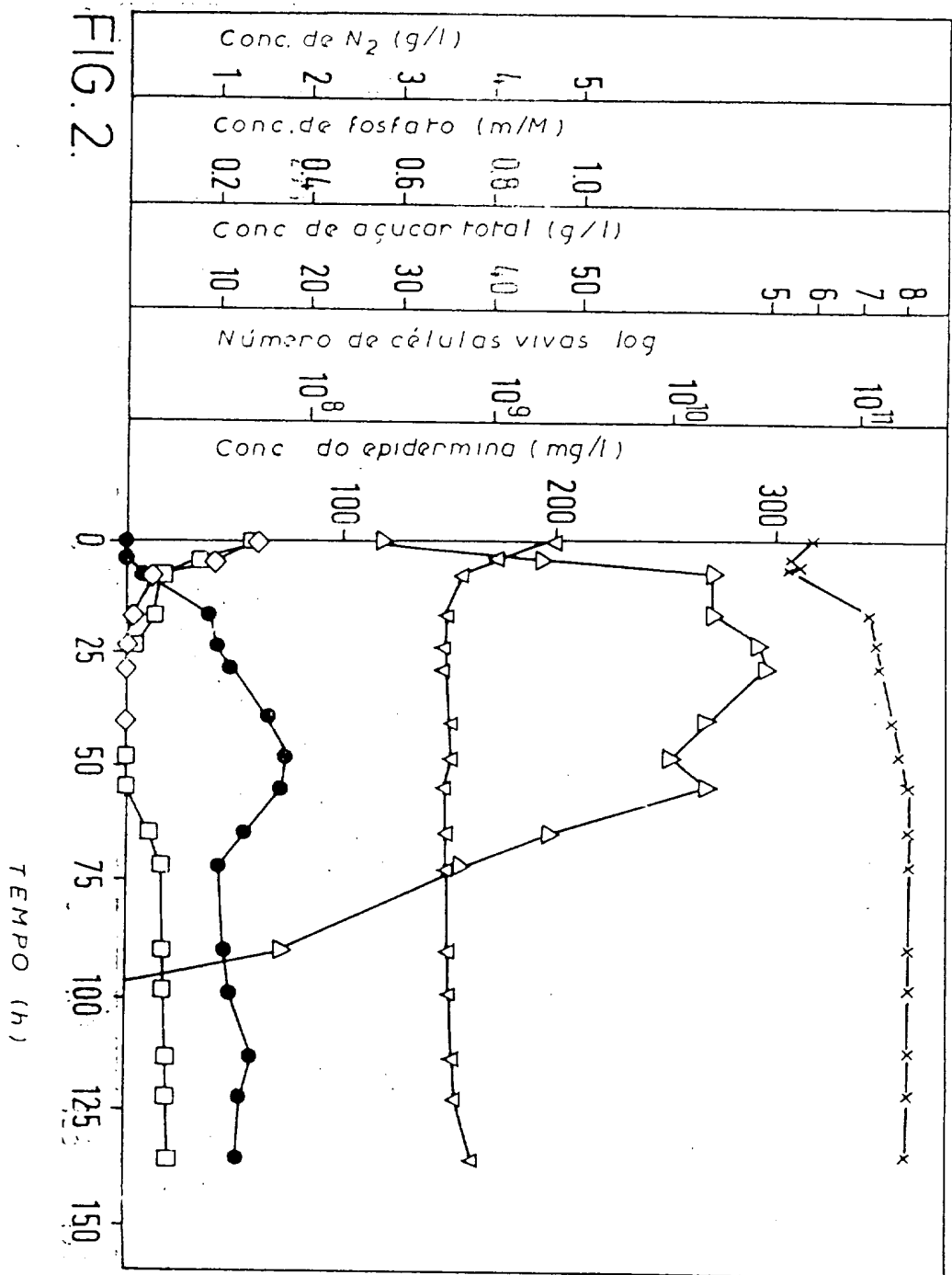
RESUMO

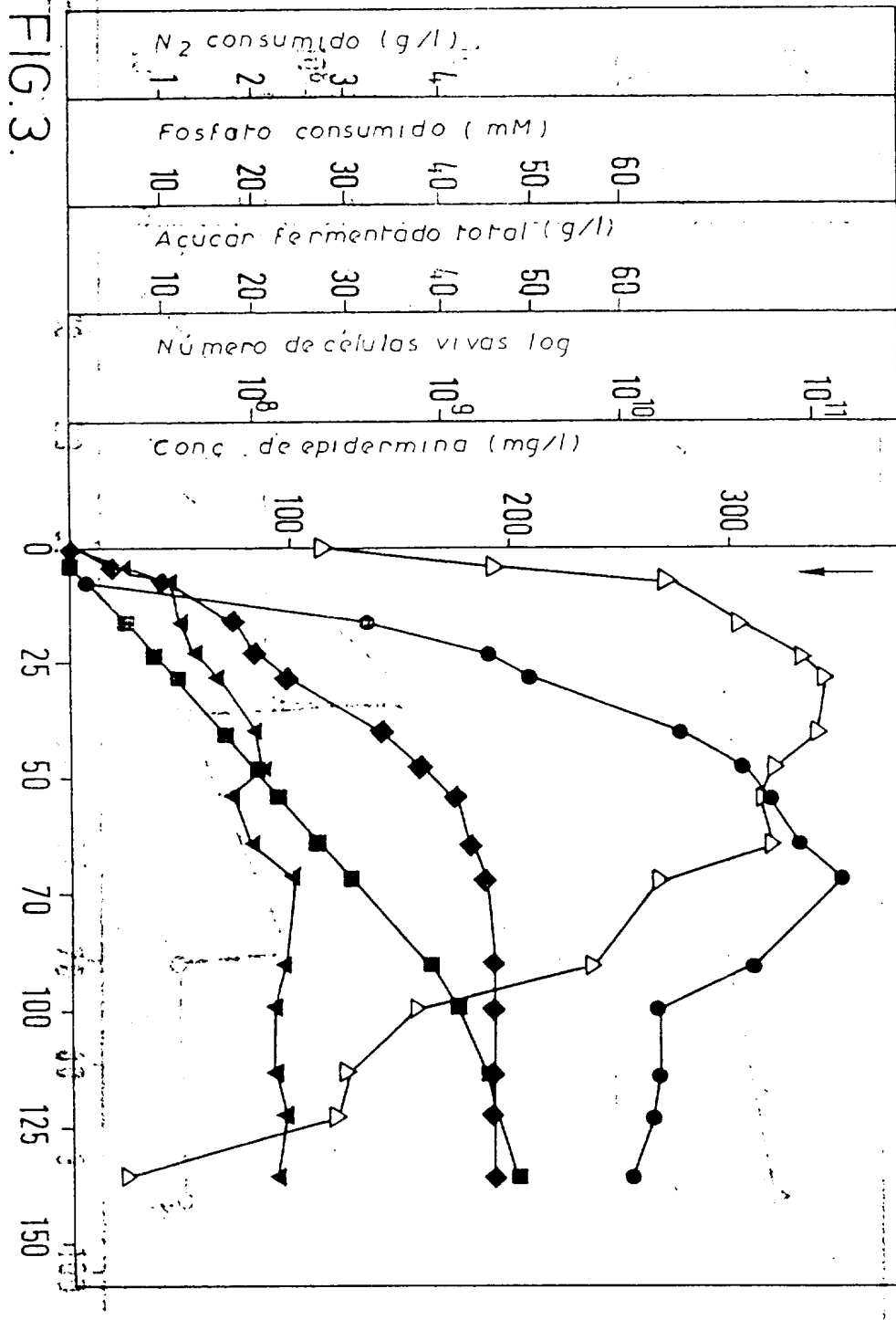
"PROCESSO PARA OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE EPIDERMINA"

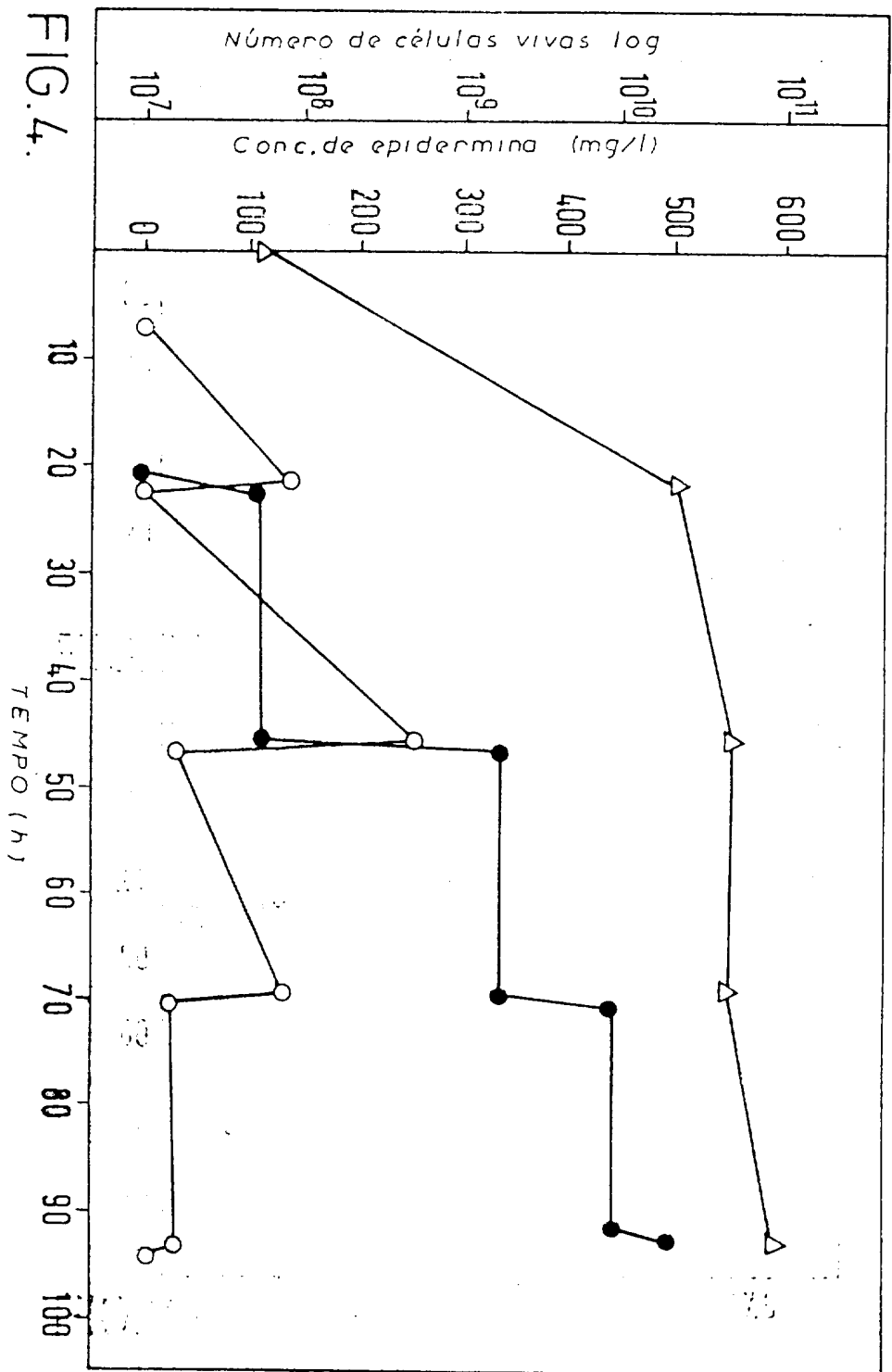
A invenção refere-se a um processo para o isolamento de epidermina a partir de um caldo de cultura ou de um filtrado de cultura de uma estirpe de Staphylococcus epidermidis e para a purificação desta substância que compreende

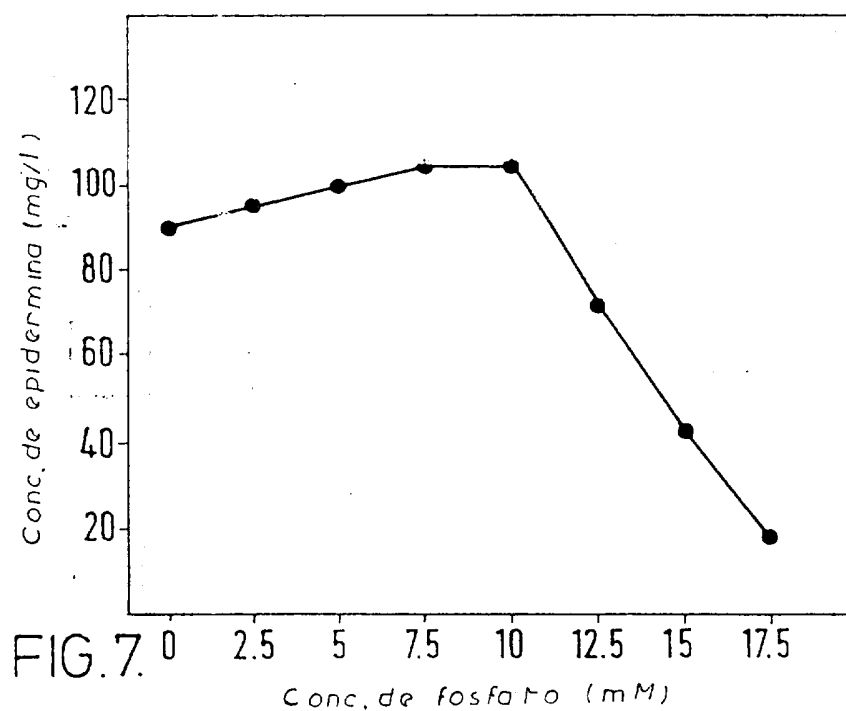
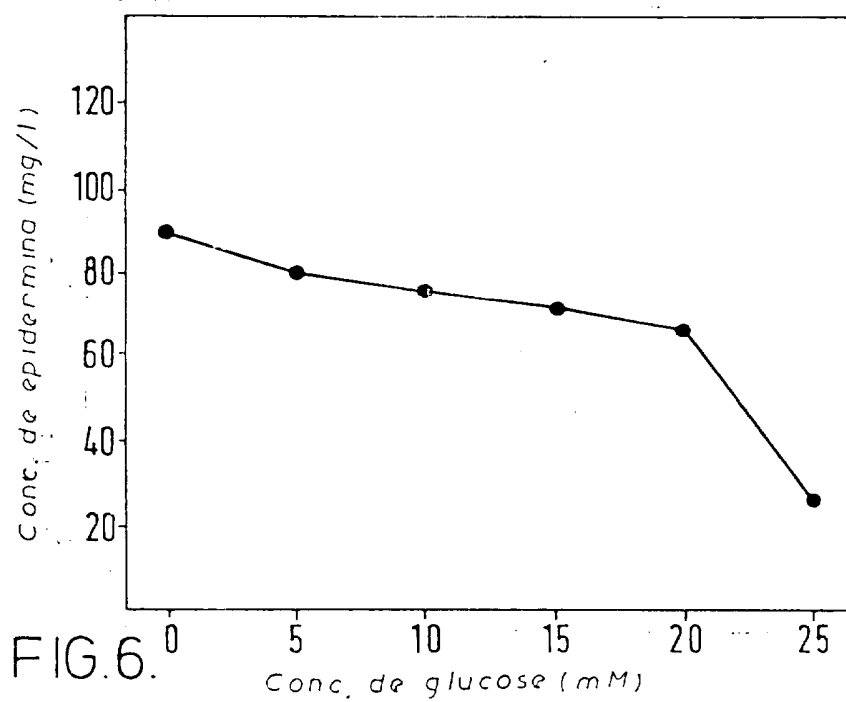
- a.) fazer contactar o filtrado da cultura ou o caldo da cultura com um copolímero de estireno-divinilo,
- b.) libertar o componente activo da resina por eluição com metanol/ácido clorídrico diluído,
- c.) ajustar o pH do eluído a um valor de 5,3 a 5,8,
- d.) fazer contactar o eluído com um permutador de catiões fraco,
- e.) em seguida retirar a substância não ligada por lavagem com uma solução tampão a pH 7,
- f.) eluir o componente activo do permutador de catiões com uma solução composta por uma substância tampão, cloreto de sódio e metanol a um pH de 6,0 a 8,0 e, para purificação.
- g.) reabsorver a substância activa do eluído num copolímero de estireno divinilo, lavar a resina com água para eliminar os sais, dissolver a epidermina a partir da resina com uma mistura metanol/ácido acético e evaporar ou liofilizar a solução, podendo ainda a epidermina deste modo obtida ser em seguida submetida a uma cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) para conseguir uma purificação fina.











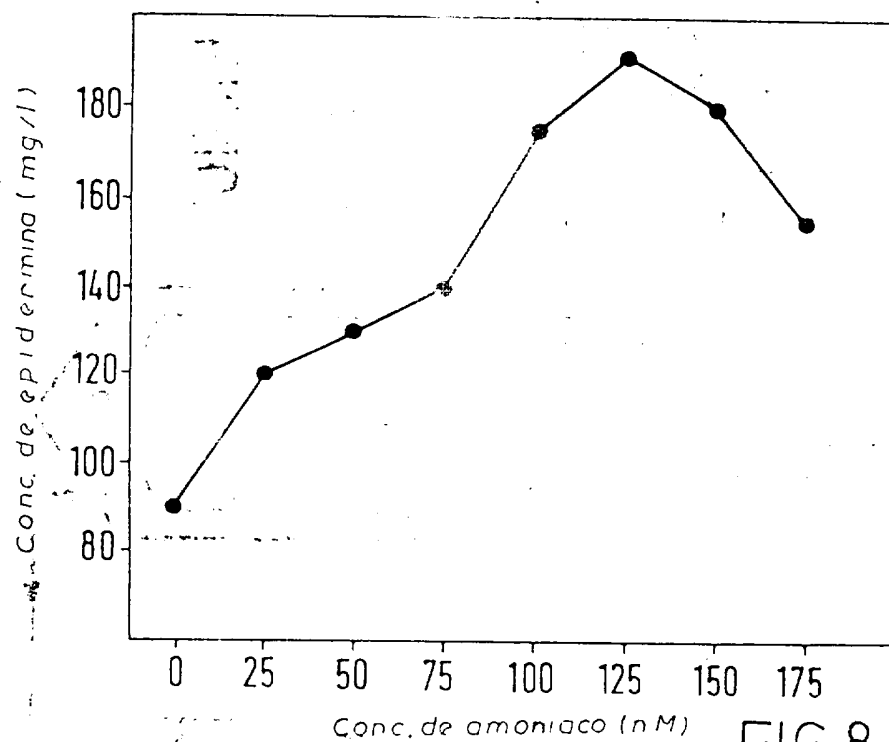


FIG.8.

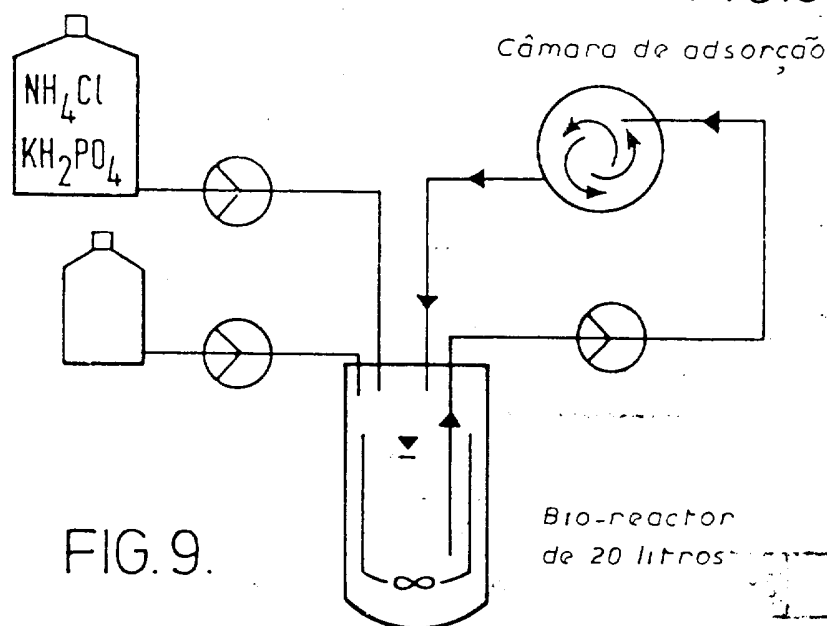


FIG.9.

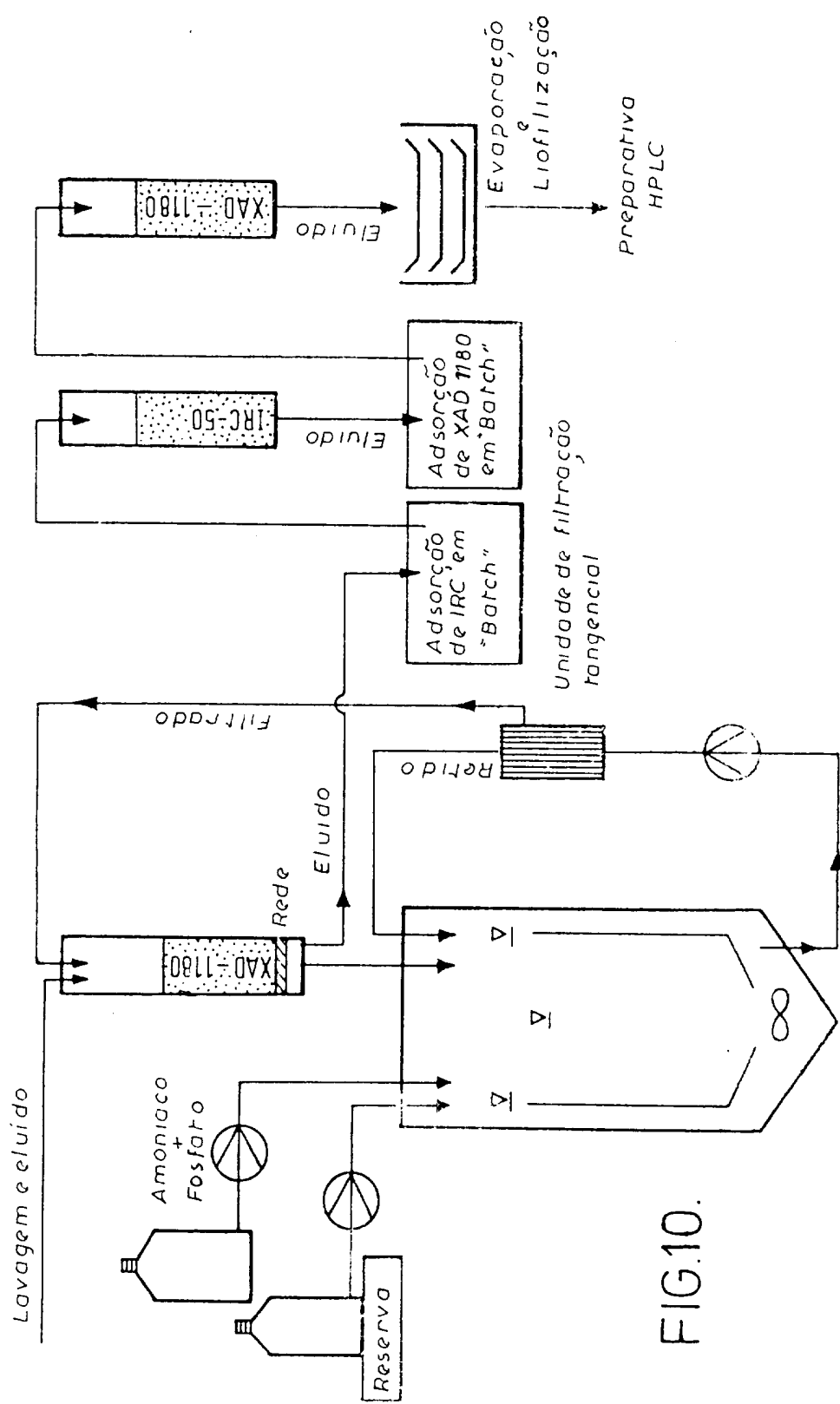


FIG.10.