



(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 27787 A1** (51) Cl. internationale : **C12P 00/00**

(43) Date de publication :
01.03.2006

(21) N° Dépôt :
28412

(22) Date de Dépôt :
26.07.2005

(30) Données de Priorité :
05.08.2004 EP 04398006.9

(71) Demandeur(s) :
**TECNIMEDE- SOCIEDADE TECNICO-MEDICINAL, S.A., RUA da Tapada Grande, n°.2
Abrunheira 2710-089 Sintra (PT)**

(72) Inventeur(s) :
**RUI JORGE CASTANHAS BARBOSA GOMES ; JOAO JOSE VAZAO
MANO CLEMENTE ; MONICA MARIA ALMEIDA BEZERRA FERNANDES
THOMAZ ; ANTONIO EDUARDO PIO BARBOSA PEREIRA DA CUNHA**

(74) Mandataire :
ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)

(54) Titre : **PROCEDE AMELIORE POUR LA PRODUCTION DE L'ACIDE
MYCOPHENOLIQUE.**

(57) Abrégé : "PROCEDE AMELIORE POUR LA PRODUCTION DE L'ACIDE MYCOPHENOLIQUE " Selon la présente invention, l'acide mycophénolique (MPA) est produit dans la fermentation submergée, en employant le mutant du pénicillium brevicompactum ATCC 17456 dans des conditions d'aérobies. Le procédé de l'invention consiste en deux fermentations en séquence ou plus, étant une ou plusieurs fermentations de graines et une fermentation de production. Dans la fermentation de production, une variation dans la température et/ou le pH est faite à une certaine concentration de la biomasse et en conséquence les concentrations en MPA de 3,4 g/L dans le réacteur fed batch et de 2,6 g/L dans le réacteur en lots ont été atteintes. Le pourcentage d'inoculum a été optimisé pour maximiser la concentration finale du MPA. En plus, le procédé de l'invention suit une méthode de séparation de la biomasse qui comporte une étape chromatographique en utilisant une résine d'adsorption. Après l'élution en utilisant un dissolvant organique, une étape de précipitation est exécutée en utilisant eau refroidie à bas pH, le précipité est alors centrifugé et séché dans un four. La pureté atteinte du MPA est approximativement 98%. Le procédé de la présente invention a les avantages d' une

productivité élevée, d'utiliser des procédés simples et a été conçu en tenant compte de la capacité à échelonner la totalité du procédé à une grande échelle de production. L'échelle pilote a été employée pour examiner les paramètres de rehaussement de l'échelle. Une fermentation avec le volume fonctionnement de 300 L a été employée.

"PROCÉDÉ AMÉLIORÉ POUR LA PRODUCTION DE L'ACIDE
MYCOPHÉNOLOGIQUE"

Selon la présente invention, l'acide mycophénolique (MPA) est produit dans la fermentation submergée, en employant le mutant du *penicillium brevicompactum* ATCC **17456** dans des conditions d'aérobies. Le procédé de l'invention consiste en deux fermentations en séquence ou plus, étant une ou plusieurs fermentations de graines et une fermentation de production. Dans la fermentation de production, une variation dans la température et/ou le pH est faite à une certaine concentration de la biomasse et en conséquence les concentrations en MPA de 3,4 g/L dans le réacteur fed batch et de 2,6 g/L dans le réacteur en lots ont été atteintes. Le pourcentage d'inoculum a été optimisé pour maximiser la concentration finale du MPA.

En plus, le procédé de l'invention suit une méthode de séparation de la biomasse qui comporte une étape chromatographique en utilisant une résine d'adsorption. Après l'élution en utilisant un dissolvant organique, une étape de précipitation est exécutée en utilisant eau refroidie à bas pH, le précipité est alors centrifugé et séché dans un four. La pureté atteinte du MPA est approximativement 98%.

Le procédé de la présente invention a les avantages d'une productivité élevée, d'utiliser des procédés simples et a été conçu en tenant compte de la capacité à échelonner la totalité du procédé à une **grande échelle de** production. L'échelle pilote a été employée pour examiner les paramètres de rehaussement de l'échelle. Une fermentation avec le volume fonctionnement de 300 L a été employée.

DESCRIPTION**"PROCÉDÉ AMÉLIORÉ POUR LA PRODUCTION DE L'ACIDE MYCOPHÉNOLIQUE"****SOMMAIRE DE L'INVENTION**

La présente invention se rapporte à un procédé amélioré pour la production de l'acide mycophénolique (MPA). Le procédé de l'invention consiste en deux fermentations en séquence ou plus, étant une ou plusieurs fermentations de graines et une fermentation de production. En outre, le procédé de l'invention suit une méthode de séparation de biomasse qui comporte une étape chromatographique en utilisant une résine d'adsorption.

ART ANTÉRIEUR

L'acide mycophénolique (MPA), ((E)-6-(1,3-di-hydro-4-hydroxy-6-métoxy-7-méthyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-méthyl-4-hexénoic)acide) a été obtenu pour la première fois en utilisant un *penicillium* (B. Rosio, Riv. Igiene Sanita Pub. Ann. 7, 825-869, 1896 ou plus tard - Oxford, P.W. Clutterbuck et al, Biochem.J. 26, 1442-1458 (1932)).

De nos jours, l'acide mycophénolique est employé sous la forme estérifiée, l'ester éthylique de morpholine, (ester 2-(4-morpholynil)-éthyl) du ((E)-6- (acide 1,3-di-hydro-4-hydroxy-6-métoxy-7-méthyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-méthyl-4-hexénoic), qui agit en tant que prodrogue de l'acide mycophénolique. Cette drogue est employée pour empêcher le rejet des tissus ou des organes transplantés ; elle a également une utilisation potentielle dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et du psoriasis.

Bien que quelques tentatives aient été faites pour obtenir une synthèse chimique totale de l'acide mycophénolique (par exemple : Danheiser Rick L et al, J.Am.Chem.Soc., 1986,

108, pp 806-810 ; Patterson J.W. et al, J.Chem.Soc.Chem.Comm., vol.. 53 n°9, 1997, pp 3195-3400 ou Covarrubias-Zúñiga et al., tetrahedron Lett. 39 (1998) 2880-2882) ils ont une applicabilité industrielle limitée. Pour cette raison l'acide mycophénolique a été produit industriellement par des procédés de fermentation aérobies en utilisant des espèces de *penicillium*.

Le premier brevet pour la production d'acide mycophénolique (GB 1157099 (1966) - Imperial Chemical Industries Ltd.) révèle un procédé pour la production de MPA à travers un procédé de fermentation en utilisant le *brevicompectum* de *penicillium*, le *stoloniferum* de *penicillium* et le *viridicatum* de *penicillium*. Les rendements atteints selon le processus revendiqué varient de 14 mg/L à 226 mg/L d'acide mycophénolique dans le bouillon de fermentation.

Le brevet GB 1158387 (1967) - Imperial Chemical Industries Ltd. - révèle un procédé pour la production de l'acide mycophénolique en utilisant un procédé de fermentation semblable à celui du GB 1157099 mais les rendements de MPA atteints étaient de l'ordre de 363 mg/L avec une pureté de 77% ou de 70 mg/L de MPA avec une pureté de 94,94%.

Le brevet GB 1593208 (1978) - Lilly & Co Elli - révèle un procédé amélioré pour obtenir l'acide mycophénolique en utilisant un nouveau mutant d'espèces de *penicillium*.

Le brevet USA 4452891 (1981) - Ajinomoto KK - révèle un procédé amélioré pour produire l'acide mycophénolique en utilisant un nouveau mutant d'espèces de *penicillium*. Ce brevet couvre essentiellement le procédé pour obtenir des mutants à production élevée. Des concentrations en MPA de 2,4 g/L (dans des flacons secoués) et de 3,6 g/L (dans des flacons non agités) ont été obtenues. Cependant, l'échelle réduite des exemples présentés et les procédés de fermentation utilisés ne favorisent pas l'extensibilité de ce procédé à la production industrielle.

Plus récemment la demande de brevet international WO 01/64931 (2000) - Biocon India Ltd. - revendique un procédé de fermentation à semi-conducteurs pour obtenir l'acide mycophénolique. Bien qu'il n'est pas mentionné quelle productivité de masse est obtenue, c'est un procédé de fermentation à semi-conducteurs qui nécessite un travail très intensif, est toujours sujet à la manipulation extensive et les problèmes d'homogénéité sont plus disposés à se produire.

Concernant le procédé de purification, elle implique beaucoup d'étapes comme l'extraction par solvants, la concentration, la cristallisation, la dissolution dans un dissolvant, le traitement des adsorbants, la filtration, la distillation et d'autres. Industriellement, ceci comporte la manipulation de grandes quantités de dissolvants qui peuvent être présenter des problèmes et s'avérer coûteux en termes de dissolvants eux-mêmes et en termes de conditions d'équipement et d'usine.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

La production du MPA par la fermentation submergée est connue dans l'art. Le rendement du procédé en MPA utilisant un type de souche sauvage est normalement tout à fait bas en comparaison à un mutant résistant aux antibiotiques polyènes.

Étonnamment, le procédé suivant la présente invention mène à une productivité de masse élevée, une fois comparé aux procédés décrits dans l'art antérieur, en employant des procédés simples et en tenant compte de l'extensibilité du procédé entier à une **grande** échelle de production. L'échelle pilote a été utilisée pour examiner les paramètres d'extrapolation en utilisant un volume de fonctionnement de fermentation de 300 L.

Selon l'invention, la préparation de l'acide mycophénolique comporte deux fermentations consécutives ou plus dans l'ordre et une étape chromatographique en utilisant une résine d'adsorption.

FERMENTATION

Selon l'invention, l'isolat utilisé est un mutant qui présente une productivité accrue du MPA dépassant celle de la souche originale. En plus, selon la présente invention, la concentration désirée du MPA est atteinte au cours des premières phases, ce qui simplifie les procédés de purification comme moins de contaminants de séparation difficile sont produits. En outre, selon l'invention, une concentration élevée d'inoculum et une variation dans la température et/ou le pH à une certaine valeur de biomasse réduit le temps de fermentation en augmentant le taux de production du MPA et augmente la concentration finale du MPA. Des fermentations à phases multiples sont utilisées pour obtenir le volume nécessaire d'inoculum pour inoculer le fermenteur de production.

Selon la présente invention, la fermentation est une fermentation à plusieurs étapes dans laquelle les fermentations d'inoculum sont poursuivies jusqu'à la fin de la demande de base (demande d'alcali) et jusqu'à ce que le volume d'inoculum soit contenu dans la marge de 2% à 10%. La fermentation de production est opérée de 190 h à 260 h ou jusqu'à ce que la concentration du MPA se stabilise, le volume d'inoculum étant contenu dans la gamme de 10% à 30%.

Le procédé suivant la présente invention, où la productivité du MPA est sensiblement augmentée et où une

culture submergée et un mutant du *brevicompactum* de *penicillium* ATCC 17456 résistant au clofibrate est employée, est caractérisé par :

- une source de carbone en des concentrations élevées, par exemple le glycérol, le glucose, le sucrose, l'huile de soja ou la mélasse, est utilisée;
- une concentration élevée d'inoculum pour le fermenteur de production (10% à 30% en biomasse) est utilisée;
- l'inoculation pour le fermenteur de production est rendue dépendante du changement du métabolisme dérivé de l'épuisement de la source de carbone, qui peut être déterminée par l'arrêt de la consommation de base ;
- le fermenteur de production est actionné aux valeurs du pH de 4,0 à 7,0 et à une température de 23°C à 28°C pendant la phase végétative de croissance (jusqu'aux niveaux de biomasse du poids humide de 20% (w/w) au poids humide de 35% (w/w)) ;
- la sporulation de masse est induite pendant que la biomasse atteint 20% (w/w) à 35% (w/w) avec une augmentation de la température allant jusqu'à 5°C et une augmentation du pH jusqu'à 4 unités de pH ;
- le procédé est mis en marche pendant 190 h à 260 h ou jusqu'à ce que la concentration du MPA se stabilise.

Le pré inoculum est préparé à partir d'une barre oblique contenant la souche de *brevicompactum* de *penicillium* et transférée à un milieu liquide (Tableau 2).

Tableau 1 - Composition du medium du pré inoculum

	Quantité	Unité
Solution	de 1,0	ml

sels	
Glucose	50 à 150 g
Glycine	5 à 20 g
L Méthionine	0,5 g
KH_2PO_4	3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Anti-mousse	1 g
Eau	à 1 L

Tableau 2 - Composition du medium

	Quantités pour le medium de 1 L
Solution de sels	1,0 ml
Glycérol	50 à 250 g
Glycine	5 à 20 g
L Méthionine	0,5 g
KH_2PO_4	3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Anti-mousse	1 g
Eau	à 1 L

Ainsi, le pré inoculum est incubé dans un dispositif d'agitation orbital à 27°C et à 150 t/mn pendant 72 h à 96 h, étant le fermenteur de graine inoculé de 2% à 10% du volume du fermenteur.

Ce fermenteur est actionné à 23°C à 28°C, avec l'aération et la vitesse d'agitation capable de maintenir PO_2 à plus de 30% ; étant le pH **maintenu** constant à 4,0 à 7,0 au moyen d'addition de NaOH 3M.

Cette fermentation fonctionne pour 72 h à 96 h, jusqu'à la fin de la demande en alcali. A ce stage, la biomasse devrait être entre 10% (w/w) à 30% (w/w).

Le fermenteur de production est inoculé avec 10% à 30% de son volume. Le fermenteur de production fonctionne au commencement à une température de 23°C à 28°C et à un taux d'aération et à une vitesse d'agitation capables de maintenir le PO_2 à plus de 30% ; le pH est maintenu à un niveau variant de 4,0 à 7,0 au moyen d'addition de NaOH 3M. Quand la biomasse atteint 20% (w/w) à 35% (w/w), la température est augmentée jusqu'à 5°C et le pH est augmenté jusqu'à 4,0 unités de pH.

Au cas où un traitement par lots serait adopté, la fermentation fonctionne pour 190 h à 260 h, ou jusqu'à ce que la concentration du MPA cesse d'augmenter.

Dans le cas du système fed batch, la source de carbone est alimentée automatiquement toutes les fois que la consommation d'alcali cesse et le pH commence à augmenter. De cette manière, la source de carbone est maintenue à une concentration minimum et le pH est contrôlé par le substrat. La fin de la fermentation est atteinte à 180 h après le décalage des valeurs du pH et de la température, ou quand la concentration du MPA se stabilise.

Exemple 1

Les différents modes de fermentation et stratégies des décalages de pH et de température sont illustrés dans le tableau 3.

Tableau - 3 Comparaison entre les différentes stratégies

Expérience N°	1	2	3
Stratégies	A	B	C
Conditions			
Volume de fermentation	20 L	20 L	20 L
Flux d'air	20 L/min	20 L/min	20 L/min
Agitation	300-800 t/mn	300-800 t/mn	300-800 t/mn
Température	Constant	Avec variation	Avec variation
pH	Constant	Avec variation	Avec variation
Productivité			
Temps de culture	< 200 h	< 200 h	> 300 h
Concentration du MPA	1,2 g/l	2,6 g/l	3,4 g/l
Type de fermentation			
	Groupe	Groupe	Fed batch

A - Fermentation en lots avec pH et température constants

B - fermentation en lots avec des décalages du pH et de la température

C - Fermentation fed batch avec des décalages du pH et de la température

Les données présentées dans le Tableau 3 mènent à la conclusion que l'expérience réalisée à une température et valeurs de pH constants s'est révélée beaucoup moins productive que celles menées avec des variations du pH et de la température. L'expérience réalisée dans la fermentation fed batch a eu comme conséquence la

concentration la plus élevée, bien que le temps nécessaire pour atteindre cette valeur était sensiblement plus long.

Exemple 2

La pertinence de la biomasse d'inoculum est présentée dans le Tableau 4.

Tableau - 4 Comparaison entre différentes concentrations d'inoculum

Expérience N°	2	5
Biomasse % (w/w) d'inoculum	19	12
[MPA] mg/L	2354	1890
Age (h)	216	240
[MPA] mg/L à l'âge de 190 h	2200	1600

Le pourcentage de la biomasse - % de (w/w) - joue un rôle important dans la concentration finale du MPA, particulièrement quand on compare les concentrations enregistrées au cours de la même période.

PURIFICATION

Selon la présente invention, la purification est considérablement simplifiée en employant la bonne résine à une charge appropriée et l'intégration avec une stratégie de fermentation qui empêche la formation et/ou l'accumulation de contaminants durs à **séparer**. Ainsi, au cours de la première étape de la purification du MPA, une colonne d'adsorption est employée au lieu normalement des procédés d'extraction par solvants ou de contre extraction normalement utilisés. Il n'y a aucune évidence dans l'art antérieur d'un procédé dans lequel une colonne d'adsorption

est utilisée au cours de telles premières phases de la purification du MPA.

Le procédé de purification du MPA à partir de la fermentation commence par ajuster le pH du bouillon de fermentation à 7,0, après quoi une opération appropriée d'enlèvement de biomasse est requise, comme la centrifugation ou la filtration, suivie d'une étape de chromatographie d'adsorption. Après élution de la colonne chromatographique avec du dissolvant organique tel que le méthanol, suit une étape de précipitation en utilisant l'eau réfrigérée à pH réduit, par exemple 2,0. Le précipité est alors lavé avec de l'eau épurée à pH réduit et séché dans un four pour obtenir une poudre blanche avec une teneur en MPA de 98%.

Au cours de la phase de chromatographie d'adsorption, le surnageant traverse la colonne chromatographique, contenant la résine d'adsorption au pH approprié à un débit de moins de deux volumes de colonne par heure, étant alors la colonne lavée avec au moins un volume de colonne de NaCl 0,2 M à pH de 7,0 un débit ne dépassant pas une colonne de débit à un 1 par heure suivie d'une solution de méthanol au même débit. L'étape d'élution est exécutée avec 100% d'un dissolvant organique, par exemple le méthanol, à un débit de moins d'un volume de colonne par heure.

Les fractions éluées contenant du MPA sont ensuite traitées en mélangeant 3 volumes d'eau **purifiée** à pH et température réduits, par exemple pH 2,0 et 4°C, à 1 volume d'éluat et permettant à la solution de se précipiter durant la nuit à une basse température. Le précipité résultant est alors séparé par un moyen approprié, tel que la centrifugation ou la filtration et ensuite lavé avec la même quantité d'eau

purifiée à pH et température réduits. Le précipité résultant est alors séché dans **une étuve sous vide** à une température de 65°C au poids constant. Le précipité résultant est de couleur blanche avec une pureté de CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SOUS HAUTE PRESSION d'au moins 98%. Le rendement du procédé de purification est d'approximativement 80%.

Exemple 3

Un volume de 160 L de surnageant de fermentation contenant 1 g/l de MPA a été utilisé pour charger une colonne contenant la résine d'adsorption. De l'éluion avec du méthanol, un étang de 14 L riche en MPA a été collecté. 42 L d'eau épurée à 4°C et pH de 2,0 ont été ajoutés à l'étang de 14 L, ont été mélangés et le pH a été de nouveau ajusté à 2,0. La solution a été alors maintenue durant la nuit à 4°C. Plus tard, le mélange a été centrifugé à 4000 g et le granulat a été lavé avec le même volume d'eau réfrigéré à pH 2,0. Le solide obtenu a été séché dans un four à vide à 65°C au poids constant. 120 g d'une poudre blanche ont été obtenus et ont été identifiés comme MPA avec une pureté de CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE **A HAUTE PERFORMANCE** dépassant 98%.

REVENDICATIONS

1. Un procédé amélioré pour la production de l'acide mycophénolique dans une culture submergée caractérisée en ce qu'elle comporte les étapes consécutives suivantes :
 - a. ayant deux étapes fermentation ou plus;
 - b. utilisant une source de carbone avec une concentration initiale de 5 à 25% ;
 - c. faisant fonctionner le fermenteur de graine de 72 à 96 heures ;
 - d. inoculant la fermentation de production à partir de la fermentation de graine ;
 - e. faisant fonctionner le fermenteur de production de 190 à 260 heures ;
 - f. décalage de la température et/ou du pH pendant la fermentation de production ;
 - g. centrifugation ou filtration pour séparer la biomasse ;
 - h. utilisation d'une résine d'adsorption après clarification ;
 - i. élution de la résine en utilisant un dissolvant ;
 - j. une étape de précipitation après l'élution ;
 - k. centrifugation ou filtration pour enlever le surnageant ;
 - l. lavage du précipité ;
 - m. séchage du précipité pour obtenir les cristaux secs de MPA.

2. Le procédé ~~sui vant~~ **selon** la revendication 1 dans lequel la source de carbone est le sucrose, le glucose, le glycérol, l'huile de soja ou ~~le~~ **la** mélasse.

3. Le procédé **selon** la revendication 1, caractérisé en ce qu'il fonctionne en mode de lots ou de fed batch de source de carbone.
4. Le procédé **selon** la revendication 1 dont la dernière des étapes de la fermentation à phase multiple est utilisée pour la production tandis que les autres sont employés pour la croissance végétative.
5. Le procédé **selon** la revendication 1 dont les fermentations de graine sont :
 - a. inoculées avec un volume situé dans la gamme de 2% à 10% ;
 - b. fonctionnent à des températures situées entre 23°C et 28°C et à un pH situé entre 4,0 et 7,0 ;
 - c. fonctionnent jusqu'à la fin de la demande en alcali.
6. Le processus **selon** la revendication 1 dont l'inoculation du fermenteur de production est située dans la gamme de 10%(w/w) à 30%(w/w) en biomasse.
7. Le procédé **selon** la revendication 1 dont la fermentation de production fonctionne de 190 h à 260 h ou jusqu'à ce que la concentration du MPA cesse d'augmenter.
8. Le procédé **selon** la revendication 1 dans lequel, à l'intérieur du fermenteur de production :
 - a. la température est décalée quand la biomasse est dans la gamme de 20%(w/w) à 35%(w/w) ;
 - b. le pH est décalé quand la biomasse est dans la gamme de 20%(w/w) à 35%(w/w) ;

- c. une variation dans le pH est effectuée en l'augmentant jusqu'à 4,0 unités de pH ;
 - d. une variation dans la température est effectuée en l'augmentant jusqu'à 5°C.
9. Le procédé **selon** la revendication 1 dont la séparation de biomasse est suivie d'une étape d'adsorption à une résine.