

(11) Número de Publicação: **PT 1468077 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12N 15/01** (2007.10) **C12P 17/18** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2003.01.15</b>	(73) Titular(es): <b>IMMUNOGEN, INC.</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2002.01.29 US 57561</b>	<b>830 WINTER STREET WALTHAM, MA 02451 US</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2004.10.20</b>	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2010.07.14</b>	<b>JOHNSON CHUNG</b>	<b>TW</b>
<b>197/2010</b>	<b>GRAHAM S. BYNG</b>	<b>US</b>
	(74) Mandatário:	
	<b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b>	
	<b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ESTIRPE MUTANTE DE ACTINOSYNNEMA PRETIOSUM COM PRODUÇÃO DE MAITANSINÓIDE ACRESIDA**

(57) Resumo:

**RESUMO****"ESTIRPE MUTANTE DE ACTINOSYNNEMA PRETIOSUM COM PRODUÇÃO DE  
MAITANSINÓIDE ACRESCIDA"**

Um microrganismo que é uma estirpe bacteriana mutante da espécie *Actinosynnema pretiosum*, designada PF4-4, (ATCC PTA-3921), capaz de produzir ansamitocinas maitansinóides tais como a ansamitocina P-3 com um rendimento melhorado em comparação com estirpes previamente conhecidas, e capaz de crescer sob condições de cultura variadas, e métodos para produzir ansamitocinas maitansinóides através da cultura de PF4-4 num meio de cultura adequado.

## **DESCRIÇÃO**

### **"ESTIRPE MUTANTE DE ACTINOSYNNEMA PRETIOSUM COM PRODUÇÃO DE MAITANSINÓIDE ACRESCIDA"**

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

##### ***1. Campo da invenção***

Esta invenção refere-se a um microrganismo que é uma estirpe bacteriana mutante da espécie *Actinosynnema pretiosum*, designada estirpe PF4-4 (ATCC PTA-3921), capaz de produzir ansamitocinas maitansinóides tais como a ansamitocina P-3 com um rendimento melhorado em comparação com estirpes previamente conhecidas, e métodos para produzir tais ansamitocinas maitansinóides a partir da referida estirpe PF4-4.

##### ***2. Antecedentes da invenção***

As bactérias da espécie *Actinosynnema pretiosum* produzem antibióticos maitansinóides (Higashide et al. Nature 270, 721-722, 1977). As bactérias desta espécie foram originalmente classificadas e depositadas como *Nocardia* sp., no entanto a caracterização subsequente que mostrou a ausência de quaisquer ácidos micólicos, uma parede celular do tipo III/C (ácido meso-diaminopimélico e

ausência de hidratos de carbono de diagnóstico importantes), a ausência de esporângio, e a formação de elementos para dotação de mobilidade, indicou que estas estirpes são membros do género *Actinosynnema* (Hasegawa, et al. "Motile Actinomycetes: *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum* sp nov., subsp. nov., and *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum* susp. nov." Int. J. System. Bacteriol. 33(2):314-320, 1983).

Os maitansinóides produzidos por via bacteriana são denominados ansamitocinas, e compreendem um grupo de antibióticos de ansamicina benzenóide antitumorais que se distinguem uns dos outros por intermédio das suas substituições nas posições C-3 e C-14, como ilustrado pelos substituintes R e R<sub>1</sub> da fórmula (I).

Foram depositadas várias estirpes de *Actinosynnema*, tais como ATCC 315651, *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum*. As propriedades metabólicas, fisiológicas e de produção de maitansanóides da estirpe ATCC 31565 estão descritas nas patentes U.S. 4,331,598 e 4,450,234 de Hasegawa et al., concedidas, respectivamente, a 25 de Maio de 1982, e 22 de Maio de 1984. A estirpe ATCC 31565 é uma bactéria gram-positiva que é capaz de crescer numa gama alargada de fontes de carbono e que produz principalmente uma mistura de maitansinóides e maitansinóides substituídos por C-14-hidroximetilo que podem ser recolhidos do meio de cultura com um baixo rendimento.

W001/77360 descreve métodos para a produção de ansamitocina utilizando microrganismos produtores de ansamitocina, em particular *Actinosynnema pretiosum* spp. tais como *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 e 31281.

Os maitansinóides foram originalmente isolados a partir de plantas Africanas (Kupchan et al. J. Amer. Chem. Soc. 94, 5294-5295, 1972). A produção de maitansinóides a partir de tais fontes era difícil dado que estavam presentes em quantidades muito pequenas. Um microrganismo produtor de maitansinóides foi subsequentemente isolado a partir de folhas de carriço, o qual foi classificado como uma nova estirpe do género *Nocardia*, *Nocardia* sp. estirpe No. C.15003 (N-1). Esta estirpe foi depositada como ATCC 31281, e é apresentada na Patente U.S. 4,137,230 de Hashimoto et al., concedida a 30 de Janeiro de 1979, e na Patente U.S. 4,162,940 de Higashide et al., concedida a 31 de Julho de 1979. A purificação do maitansinóide a partir desta bactéria requer menos passos e resulta num rendimento superior em comparação com a purificação a partir de plantas.

Foi isolada uma segunda estirpe produtora de maitansinóides a partir de folhas de carriço, denominada *Nocardia* sp. Estirpe No. C-14482 (N-1001), depositada como ATCC 31309. Esta estirpe está descrita na Patente U.S. 4,292,309 de Higashide et al., concedida a 29 de Setembro de 1981.

Uma terceira estirpe foi derivada de ATCC 31309, designada C-14482, através de um processo de mutagénese. Esta terceira estirpe foi denominada *Nocardia* sp. No. N-1231, e foi depositada como ATCC 31565. As Patentes U.S. 4,331,598 de Hasegawa et al., concedida a 25 de Maio de 1982, e 4,450,234 de Hasegawa et al., concedida a 22 de Maio de 1984, apresentam ATCC 31565.

Todas as três estirpes *Nocardia* sp. acima mencionadas produzem maitansinóides denominados ansamitocinas em pequenas quantidades. Assim, foram apresentados métodos para a produção de ansamitocina P-3 utilizando *Nocardia* sp. Estirpe No. C-15003 (ver Patente U.S. No. 4,356,265, de Hatano et al., concedida a 26 de Outubro de 1982; e Hatano et al. "Selective accumulation of ansamitocins P-2, P-3 and P-4, and biosynthetic origins of their acyl moieties" Agric. Biol. Chem. 48, 1721-1729, 1984). De acordo com estes métodos, são obtidas quantidades do produto desejado, ansamitocina P-3, relativamente pequenas, com rendimentos de cerca de 100 mg/L de caldo de fermentação.

Os maitansinóides têm uma potente actividade citotóxica e mostraram uma forte actividade anti-tumoral quando administrados em forma conjugada com um agente de ligação celular. Por exemplo, a Patente U.S. 5,208,020 de Chari et al., submetida a 4 de Maio de 1993, apresenta um agente citotóxico compreendendo um ou mais maitansinóides ligados a um agente de direccionamento celular tal como um anticorpo, em que o maitansinóide é direccionado para a

eliminação de populações celulares seleccionadas através do agente de ligação celular específico. Do mesmo modo, a Patente U.S. 5,416,064, também de Chari et al., concedida a 16 de Maio de 1995 apresenta novos maitansinóides que estão ligados a agentes de ligação celular através de ligações dissulfureto que se podem quebrar, em que o maitansinóide é libertado intracelularmente. Estes conjugados têm potencial farmacêutico para o tratamento de vários cancros.

Devido às várias utilizações terapêuticas dos maitansinóides, existe uma necessidade para novas estirpes de bactérias que são capazes de produzir ansamitocinas com um rendimento melhorado e em quantidades suficientes para facilitar o desenvolvimento comercial, por exemplo, de agentes anti-cancro tal como descritos acima e apresentados nas Patentes U.S. 5,208,020 e 5,416,064. A presente invenção supre esta necessidade e ainda mais, como será evidente a um perito na técnica através da leitura da seguinte apresentação e dos exemplos.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção proporciona uma estirpe bacteriana, depositada como ATCC PTA-3921, também aqui denominada "PF4-4", que produz quantidades acrescidas de maitansinóides. A estirpe PF4-4 foi obtida através de uma mutação da estirpe parental N-1231 (ATCC 31565) utilizando luz ultravioleta (luz UV), 1-metil-3-nitro-1-nitroso-guanidina (MNNG), e seleccionando-se para uma produção acrescida de maitansinóide.

Assim, numa primeira realização, a invenção proporciona uma estirpe bacteriana mutada (PF4-4) da espécie *Actinosynnema pretiosum* com um número de acesso ATCC PTA-3921. Esta estirpe produz quantidades de ansamitocinas muito mais elevadas do que a estirpe parental.

Esta realização da invenção é capaz de produzir mais do que 500 mg/L de ansamitocina P-3, o que constitui uma melhoria no rendimento de 5- a 10- vezes em comparação com a estirpe parental.

Esta realização é ainda capaz de produzir quantidades substanciais de outras espécies de ansamitocinas, por exemplo ansamitocinas P-2 e P-4. Além disso, as quantidades específicas das espécies de ansamitocinas que são produzidas por esta realização da invenção são capazes de ser manipuladas de forma racional através da escolha da fonte de carbono utilizada para suportar o crescimento.

Esta realização é capaz de proporcionar crescimento numa elevada diversidade de fontes de carbono, e, com a excepção da sua capacidade de produzir quantidades acrescidas de maitansinóides, é substancialmente semelhante à estirpe parental (ATCC 31565) relativamente às suas características morfológicas, físicas e metabólicas.

Numa segunda realização, a invenção compreende um método para a produção de uma ansamitocina, que compreende



cultivar uma estirpe de *Actinosynnema pretiosum* tal como definida na reivindicação 1 num meio de cultura compreendendo uma fonte de carbono adequada.

Assim, um objecto da presente invenção é proporcionar uma estirpe bacteriana que seja capaz de uma produção melhorada de maitansinóide, em que tais maitansinóides são altamente citotóxicos e podem ser usados como agentes terapêuticos, por exemplo, na forma de um conjugado com um componente específico para determinada célula, no tratamento de diversas doenças, incluindo o cancro.

Um segundo objecto da invenção é proporcionar uma estirpe bacteriana que seja capaz de uma produção melhorada de maitansinóide de tal modo que o maitansinóide possa ser produzido em quantidades suficientes para facilitar o desenvolvimento comercial dos referidos agentes terapêuticos.

Um terceiro objecto é proporcionar um método para a produção de ansamitocinas maitansinóides a partir da estirpe PF4-4 através da cultura da referida estirpe num meio de cultura compreendendo uma fonte de carbono adequada. As proporções de ansamitocinas maitansinóides produzidas por este método podem ser predeterminadas pela escolha da fonte de carbono.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

FIG. 1 é um diagrama que ilustra o título de ansamitocina P-3 para 400 re-isolados de ATCC 31565.

FIG. 2 é um diagrama que ilustra um método para a produção de ansamitocina P-3 por fermentação em balão agitado de *Actinosynnema pretiosum*, estirpe mutante PF4-4.

FIG. 3 é um cromatograma de HPLC de uma amostra do extracto de caldo da fermentação de *Actinosynnema pretiosum*, estirpe mutante PF4-4.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção compreende um microrganismo que é uma estirpe bacteriana mutante da espécie *Actinosynnema pretiosum*, designada PF4-4 (ATCC PTA-3921), que é capaz de produzir maitansinóides, incluindo ansamitocinas tais como a ansamitocina P-3 e outras ansamitocinas com rendimentos melhorados em comparação com estirpes previamente conhecidas, incluindo a estirpe parental (ATCC 31565).

A estirpe bacteriana, PF4-4, da presente invenção foi produzida a partir da estirpe parental ATCC 31565 por mutação utilizando luz UV, 1-metil-3-nitro-1-nitroso-guanidina (MNNG) e selecção, para se obter uma estirpe de uma bactéria geneticamente modificada que produz quantidades substancialmente mais elevadas de maitansinóides do que a estirpe parental. Assim, em crescimento fermentativo, PF4-4 é capaz de produzir mais do que 500 mg/L de ansamitocina P-3, que é 5-10 vezes mais do que a quantidade produzida pela estirpe parental sob as mesmas condições.

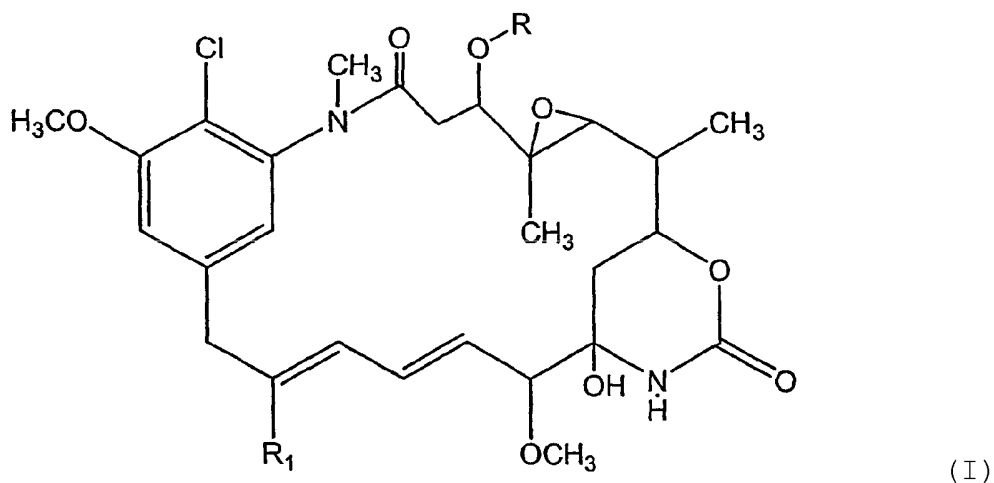
A estirpe *Actinosynnema pretiosum* da presente invenção, aqui PF4-4, foi depositada sob as disposições do Tratado de Budapeste, na American Type Culture Collection, Rockville Maryland, a 11 de Dezembro de 2001, e foi acordado o número de Acesso No. ATCC PTA-3921.

A estirpe parental ATCC 31565, a partir da qual é derivada por mutação a estirpe *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 da presente invenção, é por sua vez derivada da estirpe *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31309, tal como apresentado na Patente U.S. 4,292,309 de Higashide et al., atribuída a 29 de Setembro de 1981. Tal como descrito acima, as bactérias desta espécie foram originalmente classificadas e depositadas como *Nocardia* sp., no entanto caracterização subsequente indicou que estas estirpes são membros do género *Actinosynnema* (Hasegawa, T. et al. "Motile Actinomycetes: *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum* sp nov., subsp. nov., and *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum* susp. nov." Int. J. System. Bacteriol. 33(2): 314-320, 1983).

No contexto da presente invenção, o termo "maitansinóide" refere-se à classe de fármacos altamente citotóxicos primeiramente isolados do arbusto do leste de África *Maytenus ovatus*, e inclui ainda: maitansinol e ésteres C-3 do maitansinol que ocorrem naturalmente (Patente U.S. 4,151,042); análogos sintéticos de ésteres C-3 do maitansinol (Kupchan et al., J. Med. Chem. 21:31-37, 1978; Higashide et al., Nature 270:721-722, 1977; Kawai et al., Chem. Farm. Bull. 32: 3441-3451; e Patente U.S.

5,416,064); ésteres C-3 de ácidos carboxílicos simples (Patentes U.S. 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348; e 4,331,598); e ésteres C-3 com derivados da N-metil-L-alanina (Patentes U.S. 4,137,230; 4,260,608; e Kawai et al., Chem. Pharm Bull. 12: 3441, 1984).

No contexto da presente invenção, o termo "ansamitocina" refere-se a vários derivados de antibióticos ansamicina (Hasegawa, T. et al. "Motile Actinomycetes: *Actinosynnema pretosium* subsp. *pretosium* sp nov., subsp. nov., and *Actinosynnema pretosium* subsp. *auranticum* susp. nov." Int. J. System. Bacteriol. 33(2): 314-320, 1983; Tanida et al. "Ansamitocin analogs from a mutant strain of nocardia. I Isolation of the mutant, fermentation and antimicrobial properties." J. Antibiotics 34: 489-495, 1981) representados pela fórmula geral (I) seguinte:



em que R representa, por exemplo, hidrogénio, acetilo, propionilo, isobutirilo, butirilo, isovalerilo, e semelhan-

tes, e em que  $R_1$  representa, por exemplo, metilo, hidroximetilo, e semelhantes.

Distinguem-se três classes principais de ansamitocinas por substituintes diferentes na estrutura do anel: compostos ansamitocina P com um grupo metilo em  $R_1$  (C-14) na fórmula I; compostos ansamitocina PHM com um grupo hidroximetilo em  $R_1$  (C-14) na fórmula I; e compostos ansamitocina PDN com uma estrutura de anel N-desmetilo e um grupo metilo na posição  $R_1$  da fórmula I. Em cada classe existem diferentes membros que se distinguem por diferentes substituintes R (C-3) na fórmula I. Originalmente, as ansamitocinas com um grupo metilo em C-14 foram isoladas a partir da estirpe ATCC 31281 tal como descrito na Patente U.S. 4,162,940.

Especificamente, certas ansamitocinas são aqui designadas pelas abreviaturas dadas como se segue:

P-0 tem R = hidrogénio e  $R_1$  = metilo; também denominado maitansinol

P-1 tem R = acetilo e  $R_1$  = metilo;

P-2 tem R = propionilo e  $R_1$  = metilo;

P-3 tem R = isobutirilo e  $R_1$  = metilo;

P-3' tem R = butirilo e  $R_1$  = metilo;

P-4 tem  $R = \text{isovalerilo}$  e  $R_1 = \text{metilo}$ ;

PHM-0 tem  $R = \text{hidrogénio}$  e  $R_1 = \text{hidroximetilo}$ ;

PHM-1 tem  $R = \text{acetilo}$  e  $R_1 = \text{hidroximetilo}$ ;

PHM-2 tem  $R = \text{propionilo}$  e  $R_1 = \text{hidroximetilo}$ ;

PHM-3 tem  $R = \text{isobutirilo}$  e  $R_1 = \text{hidroximetilo}$ ;

PHM-3' tem  $R = \text{butirilo}$  e  $R_1 = \text{hidroximetilo}$ ;

PHM-4 tem  $R = \text{isovalerilo}$  e  $R_1 = \text{hidroximetilo}$ ;

PND-0 tem  $N\text{-desmetilo}$ ,  $R = \text{hidrogénio}$  e  $R_1 = \text{metilo}$ ;

PND-1 tem  $N\text{-desmetilo}$ ,  $R = \text{acetilo}$  e  $R_1 = \text{metilo}$ ;

PND-2 tem  $N\text{-desmetilo}$ ,  $R = \text{propionilo}$  e  $R_1 = \text{metilo}$ ;

PND-3 tem  $N\text{-desmetilo}$ ,  $R = \text{isobutirilo}$  e  $R_1 = \text{metilo}$ ;

PND-3' tem  $N\text{-desmetilo}$ ,  $R = \text{butirilo}$  e  $R_1 = \text{metilo}$ ; e

PND-4 tem  $N\text{-desmetilo}$ ,  $R = \text{isovalerilo}$  e  $R_1 = \text{metilo}$ .

O termo "ansamitocina" abrange ainda os seus isómeros, incluindo isómeros que ocorrem nas posições C-3, C-4, C-9 e C-10.

**(a) Características Biológicas de *Actinosynnema pretiosum*,  
estirpe mutante PF4-4.**

As características morfológicas e metabólicas da estirpe PF4-4 da presente invenção são similares às aquelas da estirpe parental (ATCC 31565), com a exceção de que a estirpe PF4-4 apresenta uma produção de maitansinóide melhorada. As características morfológicas e metabólicas da estirpe parental são apresentadas na Patente U.S. 4,450,234 de Hasegawa et al., concedida a 22 de Maio de 1984.

**(b) Geração de *Actinosynnema pretiosum*, estirpe mutante  
PF4-4.**

A estirpe PF4-4 é obtida a partir da estirpe parental N-1231, ATCC 31565 através do procedimento seguinte. A produção de ansamitocina P-3 por N-1231 em meio FM4-1 é cerca de 60 mg/L (média de n=400 experiências), tal como apresentado na Tabela 4, que apresenta a produção de ansamitocina P-3 (mg/L) da média de 400 colónias rastreadas individualmente, e de três colónias isoladas da estirpe N-1231 ATCC 31565, tendo a produção de ansamitocina P-3 mais elevada no meio FM4-1. Assim, num rastreio inicial, a estirpe N-1231, ATCC 31565, apresenta uma produção média de ansamitocina P-3 de 60 mg/L, e nenhuma colónia apresenta uma produção superior a 221 mg/L.

TABELA 4

Cultura No. (número de experiências)		ATCC 31565 (n = 400)	15-45 (n = 1)	15-55 (n = 1)	15-64 (n = 1)
Análise por HPLC	P-3 (mg/L)	61 ± 35	195	221	208
Título relativo de P-3		1,00	3,19	3,62	3,41

A estirpe PF4-4 é preferentemente gerada a partir de ATCC 31565 em sete passos consecutivos. Estes sete passos são:

re-isolamento; um primeiro passo de mutagénese; re-isolamento, preferentemente três vezes; mutagénese com UV, e mutagénese com MNNG.

Estes passos são levados a cabo de acordo com procedimentos convencionais conhecidos pelos peritos na técnica, tal como descrito, por exemplo em Jeffrey Miller, 1992: A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Laboratory Press, Woodbury, N.Y.

Re-isolamento. A estirpe N-1231, ATCC 31565 é crescida em placas de agar em meio CM4-1 e observam-se dois fenótipos morfológicos: i.e. colónias amarelas e colónias brancas. São re-isoladas quatrocentas colónias de ambos os tipos e a sua produção de ansamitocina P-3 foi avaliada. A distribuição do teor de ansamitocina P-3 das 400 colónias é apresentada na Figura 1. As colónias brancas apresentam consistentemente títulos de AP-3 mais elevados do que as



colónias amarelas. A comparação dos títulos para a estirpe N-1231, ATCC 31565, e as três colónias com os títulos mais elevados é apresentada na Tabela 4. A Colónia No. 15-55 apresenta o título mais elevado (221 mg/L) e é utilizada no passo subsequente.

Mutagénese UV é descrita detalhadamente no EXEMPLO 1 (abaixo). Resumidamente, esporos de uma cultura em rampa com 8 dias da colónia No.15-55 são recolhidos em água e macerados numa mistura em vórtex. Determina-se o número de unidades formadoras de colónia (ufc) e verifica-se ser tipicamente cerca de  $2 \times 10^9$ . Amostras diluídas em série contendo diferentes números de ufc são então espalhados em placas de agar e expostas a luz UV proveniente de uma lâmpada germicida durante períodos de tempo diferentes. A taxa de morte para uma exposição de 40 segundos a tal luz é tipicamente 99,9%. As placas tratadas durante períodos de tempo variados são incubadas a 28°C durante 5-7 dias e então seleccionam-se colónias e analisam-se para a produção de ansamitocina P-3. A colónia com a produção de ansamitocina P-3 mais elevada é seleccionada para utilização no passo seguinte.

Mutagénese MNNG é descrita em detalhe no EXEMPLO 2 (abaixo). Resumidamente, preparam-se esporos macerados tal como acima, recolhem-se por centrifugação, e são res-suspensos em tampão contendo 100 µg/mL de MNNG. Preferentemente, a reacção de mutagénese é parada após cerca de 30 min através da adição de um excesso de tiosulfato de

sódio e as bactérias são então recolhidas por centrifugação, lavadas, e plaqueadas em placas com agar para determinação da taxa de sobrevivência e para análise posterior.

A Tabela 5 apresenta a genealogia da estirpe PF4-4 e a produção da ansamitocina P-3 (mg/L) por isolados intermédios, tal como analisado por HPLC (ver EXEMPLO 6). Os meios utilizados na Tabela 5 são dados na Tabela 6A. No interior da Tabela 5, a entrada "d/n" representa o tempo de fermentação em dias (d) e o número de culturas testadas (n).

Meio	→ ATOC 31565	→ re-i 15-55	→ UV 48-315	→ re-i 77-72	→ re-i 106-22	→ re-i 128-18	→ UV 15-447	MNG PF 4-4
FM 27-44	55 ρ 16 (n = 30)	143 ρ 15 (8 d/n = 10)	220 (8 d/n = 1)					
FM 112-37	48 ρ 15 (n = 10)				331 ρ 24 (8 d/n = 5)	382 (8 d/n = 1)		
FM 112-37	49 ρ 14 (n = 10)				305 ρ 13 (8 d/n = 10)	435 (8 d/n = 1)		
FM 4-4	64 ρ 26 (n = 5)					153 (6 d/n = 1)	268 (6 d/n = 1)	
FM 4-7	152 ρ 33 (n = 6)					325 ρ 12 (6 d/n = 6)	401 ρ 8 (6 d/n = 6)	
FM 4-6	187 ρ 24 (n = 10)						369 ρ 16 (6 d/n = 4)	

**(c) Produção de maitansinóides a partir de *Actinosynnema pretiosum* estirpe PF4-4**

O crescimento da estirpe bacteriana PF4-4 é levado a cabo sob condições controladas e pode utilizar uma diversidade de meios e condições. Por exemplo, a estirpe

PF4-4 pode ser crescida em condições semelhantes a com um meio semelhante aos descritos para ATCC 31565 ou ATCC 31281 nas Patentes U.S. concedidas 4,137,230; 4,162,940; 4,331,598; 4,356,265; 4,450,234; e tal como descrito em Hatano et al., Agric. Biol. Chem. 48, 1721-1729, 1984. Assim, a estirpe tolera uma grande variedade de fontes de carbono, o que também suporta a produção de maitansinóides por fermentação. São dados exemplos de meios de cultura nas Tabelas 6A e 6B. A Tabela 6A apresenta meios que suportam o crescimento de PF4-4 e que são utilizados na Tabela 5. A Tabela 6B apresenta outros meios adequados para a propagação e/ou o crescimento de PF4-4.

Um meio preferido para a produção de maitansinóides a partir da estirpe PF4-4 é representado no diagrama de fluxo da Figura 2 e é ainda descrito no EXEMPLO 3 (abaixo).

TABELA 6A As entradas de composição são em % (p/v). A esterilização foi a 121°C durante 20 minutos.

	FM 27-44	FM 112-37	FM 4-4	FM 4-6	FM 4-7
Dextrina (Lodex-5)	6	6	5	5	5
Maltose (Difco)	4	4	2	2	2
Proflo (Traders)			2,0	2,5	2,75
Farinha de Soja (ADM)	1,5	2,0			
Pharmamedia (Traders)	0,5				
CSP (Roquette)	0,5	0,5	0,5	0,15	0,15
Levedura Seca (Difco)	0,25				
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Wako)	0,05				

(continuação)

	FM 27-44	FM 112-37	FM 4-4	FM 4-6	FM 4-7
CaCO <sub>3</sub> (Hayashi)			0,5	0,5	0,6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Wako)		0,05			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Wako)	0,05	0,04			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Wako)		0,05	0,06	0,06	0,06
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Wako)	0,5	0,5			
NaHCO <sub>3</sub> (Wako)		0,2			
Zeólito	0,1				
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Wako)	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0002				
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Baker)	0,001			0,0005	0,0005
Ácido nicotínico	0,0002				
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0002				
Isobutanol <sup>1</sup> (Tedoa)	0,1	0,5	0,5	0,3	0,3
SAG471 (Witco)		0	0,06	0,04	0,04
pH	6,8	6,8	6,8	7,2	7,35
<sup>1</sup> Adicionado em último lugar					

TABELA 6B Meios Relacionados

Cultura em rampa e em placa, Agar CM4-1

(% p/v)

Extracto de Levedura (Difco)	0,3
Extracto de Malte (Difco)	0,3
Soytone (Difco)	0,5
Glicerol (Difco)	1,0
Bacto Agar (Difco)	2,0

Ajustar o pH a 6,5 antes da esterilização

Esterilização: 121°C, 20 minutos

Meio de inóculo, VM4-1

	(%, p/v)
Amido solúvel (BDH)	2,0
Glucose (Shuling)	1,0
Farinha de Soja (ADM)	1,0
CSP (Roquette)	0,5
Soytone (Difco)	0,5
NaCl (Wako)	0,3
CaCO <sub>3</sub> (Hayashi)	0,5
Soytone (Difco)	0,5

pH: 6,5

Esterilização: 121°C, 20 minutos

Análise de ansamitocinas

Nas Patentes U.S. 4,331,598 e 4,450,234, a estirpe parental ATCC 31565 é apresentada como produzindo duas classes de ansamitocinas que se distinguem pela presença de um grupo metilo ou hidroximetilo em C-14 (ver fórmula I). Para ambas as classes, são produzidas várias ansamitocinas diferentes que diferem na sua respectiva cadeia lateral acilo ligada ao grupo hidroxilo C-3, e relativamente a se C-14 suporta um grupo metilo ou hidroximetilo (ou, em estudos subsequentes, N-desmetilo). A nomenclatura aqui utilizada para os compostos permutados é definida acima com referência à fórmula (I).

A ansamitocina P-3 é o produto principal de PF4-4 e a estirpe parental ATCC 31565, sob certas condições de crescimento. Se as bactérias são crescidas na presença de valina ou de ácido isobutírico (ver Patente U.S. 4,228,239) ou álcool isobutílico ou isobutaldeído (ver Patente U.S. 4,356,265), estão presentes em pequenas quantidades outros compostos ansamitocina.

Quando a estirpe PF4-4 é crescida em diferentes meios de fermentações (designados FM na Tabela 6), todos os quais contêm álcool isobutílico, a ansamitocina P-3 é a ansamitocina produzida em predominância. Os meios de fermentação são diluídos com etanol ou acetonitrilo, agitados em vórtex, depois centrifugados e o sobrenadante testado relativamente ao teor em ansamitocina P-3.

As ansatomicinas são preferentemente fraccionadas e analisadas por cromatografia líquida de elevada eficiência (hplc) de fase reversa, mas pode ser utilizada qualquer técnica adequada, tal como, por exemplo, MALDI-TOF ou cromatografia em camada fina. Num método utilizando HPLC, os caldos de fermentação são extraídos com solventes orgânicos, tais como acetato de etilo, cloreto de metileno, ou clorofórmio, e o teor de P-3 no solvente orgânico é determinado por hplc de fase reversa tal como descrito no EXEMPLO 6.

## EXEMPLOS

A invenção será agora ilustrada por referência a exemplos não limitativos.

## EXEMPLO 1

**Mutagénesse por UV**

Recolheram-se esporos de uma preparação em rampa com 8 dias da colônia No. 15-55 através da lavagem da rampa [dimensão da rampa: tubo de 2,3 x 18 cm cheio com 16-18 mL de agar CM4-1 (para composição, ver Tabela 6b)] com 10 mL de água. Colocaram-se cinco mL da água com os esporos em suspensão num tubo com tampa de rosca (tamanho: 1,1 x 11 cm) contendo 10 esferas de vidro de 2,0 mm de diâmetro para maceração. O tubo foi agitado num vórtex durante cinco minutos e a suspensão de esporos macerados foi então diluída em série numa solução aquosa de Tween 60 a 0,1% nas diluições  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$ . (A suspensão macerada contém tipicamente  $2 \times 10^9$  ufc). De cada diluição, plaqueia-se 0,1 mL da suspensão numa placa de agar CM4-1 (9,5 cm de diâmetro), que foi exposta a uma fonte de luz UV germicida adequada: a placa de agar aberta foi colocada sob uma lâmpada germicida de 15 W a cerca de uma distância de 20 cm e exposta durante 20-40 segundos à luz UV. (A taxa de morte para uma exposição de 40 segundos era cerca de 99,9%). As placas expostas foram cultivadas a 28°C durante 5-7 dias, e foram então transferidas colônias isoladas para outra placa

de agar CM4-1 e crescidas em grelhas de 16 colónias por placa. As colónias foram então escolhidas para avaliação suplementar.

## EXEMPLO 2

### **Mutagénesse MNNG**

Recolheram-se esporos de uma preparação em rampa com 8 dias através da lavagem da rampa (dimensão da rampa: tubo de 2,3 x 18 cm cheio com 16-18 mL de agar CM4-1) com 10 mL de água. Colocaram-se cinco mL da água com os esporos em suspensão num tubo com tampa de rosca (tamanho: 1,1 x 11 cm) contendo 10 esferas de vidro de 2,0 mm de diâmetro para maceração. O tubo foi agitado num vórtex durante cinco minutos e os esporos foram recolhidos por centrifugação a 2100 x g durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 4 mL de tampão de ácido maléico tris a 0,05 M estéril, pH 8,0 contendo (p/v) 0,1% de sulfato de amónio, 0,01% de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,005% de cloreto de cálcio di-hidratado, 0,00025% de sulfato ferroso hepta-hidratado, e 100 µg de MNNG. A suspensão foi agitada sob vórtex durante 30 min, a reacção foi parada pela adição de 3 mL de uma solução saturada de tiosulfato de sódio. Os esporos foram recolhidos por centrifugação, depois ressuscitado em 5 mL de água. Esta suspensão foi usada para selecção e uma diluição apropriada foi esfregada numa placa de agar CM4-1 para determinar a taxa de sobrevivência.



## EXEMPLO 3

**Fermentação em balão agitado para produzir ansamitocina a partir de PF4-4.**

Uma cultura PF4-4 armazenada, por exemplo uma cultura liofilizada ou congelada, foi crescida em placas de agar CM4-1 a 28°C durante 5-7 dias. Depois transferiram-se colônias isoladas para uma segunda placa de agar CM4-1 com grelha (tipicamente, transferiram-se 16 colônias para uma placa com um diâmetro de 9,5 cm), e a placa foi incubada a 28°C durante 7 dias, período durante o qual cresceram colônias com um diâmetro de 6-15 mm. Macerou-se então uma única colônia através da agitação com vórtex durante 10 minutos num tubo fechado contendo dez esferas de vidro com um diâmetro de 2 mm e 2 mL de água. Parte da suspensão da colônia (0,5 mL) foi então transferida para um balão de cultura de 250 mL contendo 30 mL de meio de preparação de inóculo, VM4-1 (para composição, ver a Tabela 6b). O balão de inóculo foi incubado num agitador orbital (220 rpm, órbita de 70 mm) a 28°C durante 48 horas, após o que se transferiu 1 mL da suspensão crescida de inóculo para um balão de cultura de 250 mL contendo 20 mL de meio de fermentação FM4-4. O balão de fermentação foi incubado sob as mesmas condições que o balão de inóculo durante 6 dias, após o que a produção de ansamitocina foi testada tal como descrito no EXEMPLO 6 e verificou-se ser 268 mg/L.

Podem ser utilizados meios de fermentação diferentes. Exemplos de meios de cultura preferidos e dos níveis de produção de ansamitocina P-3 correspondentes são listados na Tabela 5 e as composições dos meios de cultura são apresentados na Tabela 6a.

#### EXEMPLO 4

##### **Preparação de culturas PF4-4 congeladas para armazenamento de longa duração.**

Preparou-se uma suspensão de colónia macerada em 2 mL de água tal como descrito no EXEMPLO 3, depois inoculou-se 0,2 mL da suspensão numa cultura em rampa (dimensão da rampa: 2,3 x 18 cm cheia com 16-18 mL de agar CM4-1) e incubou-se a 28°C durante 7 dias. A rampa foi lavada com 10 mL de solução criogénica (10% de glicerol e 5% de lactose em água), a qual foi então submetida ao procedimento de maceração descrito acima. A suspensão macerada foi dividida em alíquotas (1,5 mL) em criotubos e congelada a 75°C ou em azoto líquido.

#### EXEMPLO 5

##### **Preparação de bactérias PF4-4 liofilizadas para armazenamento de longa duração.**

Uma cultura em rampa de 8 dias (dimensão da rampa: 2,3 x 18 cm cheia com 16-18 mL de agar CM4-1) foi raspada para 3 mL de uma solução de leite desnatado (5%

(p/v) de leite desnatado em pó em água). A suspensão foi então macerada num tubo fechado contendo dez esferas de vidro com um diâmetro de 2 mm por agitação em vórtex durante 5 min. Distribuíram-se alíquotas de 0,5 mL em tubos e liofilizou-se. Cada tubo continha preferentemente cerca de  $1,2 \times 10^8$  ufc.

#### EXEMPLO 8

##### **Análise de ansamitocina P-3 no caldo de fermentação**

Transferiu-se caldo de fermentação (0,25 mL) para um tubo com tampa de rosca contendo etanol (4,75 mL). (Alternativamente, misturou-se 0,25 mL do meio de fermentação completo com 2,25 mL de etanol). A solução foi agitada em vórtex durante dez minutos e depois centrifugada a  $2100 \times g$  durante dez minutos. O sobrenadante foi removido e submetido a análise por hplc de fase reversa. Preferentemente, utilizou-se uma coluna Symmetry Sheild C8 (3,6 x 150 mm). A fase móvel foi preferentemente água/acetonitrilo/metanol a uma razão (v/v) de 55/35/10 e foi preferentemente utilizada a um caudal de 1,0 mL/min. A cromatografia foi monitorizada medindo a absorção UV a 252 nm. Um cromatograma típico de hplc de um extracto de caldo é apresentado na Figura 3, na qual a ansamitocina P-3 elui a cerca de 12,2 minutos após a injeção.

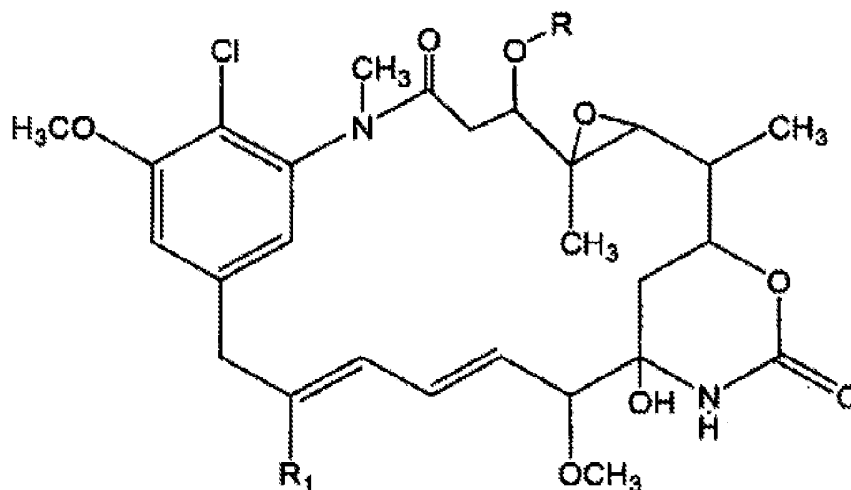
Lisboa, 30 de Setembro de 2010

### REIVINDICAÇÕES

1. A estirpe *Actinosynnema pretiosum* com um número de acesso ATCC PTA-3921.

2. Um método para a produção de uma ansamitocina, compreendendo a cultura de uma estirpe *Actinosynnema pretiosum* tal como definida na reivindicação 1 num meio de cultura compreendendo uma fonte de carbono adequada.

3. O método da reivindicação 2, em que a referida ansamitocina é uma ou mais ansamitocinas de fórmula (I) ou os seus isómeros:



em que R é seleccionado do grupo que consiste em hidrogénio, acetilo, propionilo, isobutirilo, butirilo, e isovalerilo, e R<sub>1</sub> é seleccionado do grupo que consiste em metilo e hidroximetilo.

4. O método a reivindicação 2, em que a ansamitocina é ansamitocina P-3.

5. O método da reivindicação 2, em que a referida ansamitocina é predominantemente ansamitocina P-3 e a referida fonte de carbono compreende uma ou mais fontes de carbono seleccionadas do grupo que consiste em valina, ácido isobutírico, álcool isobutílico, e isobutaldeído.

Lisboa, 30 de Setembro de 2010

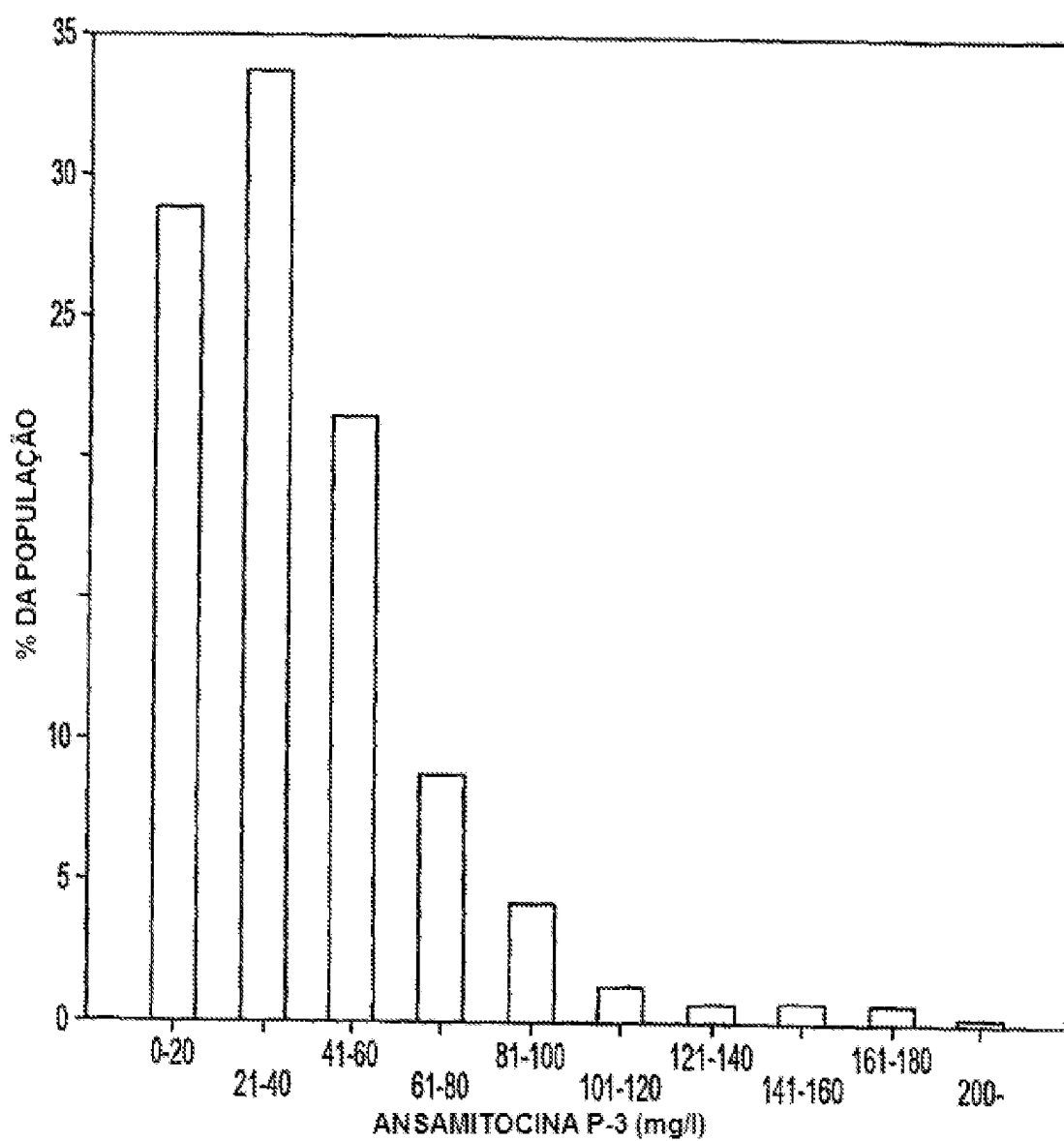


FIG. 1

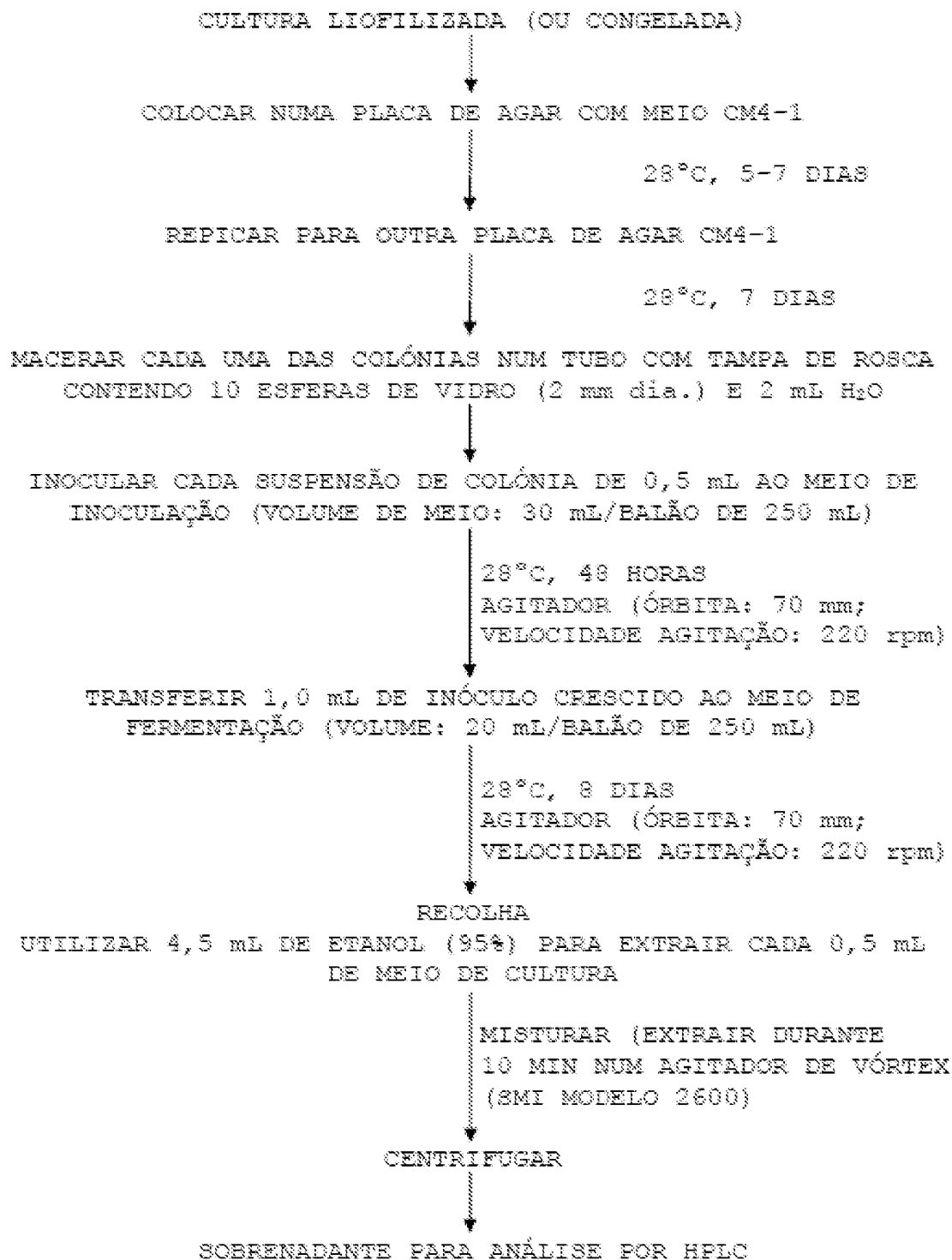
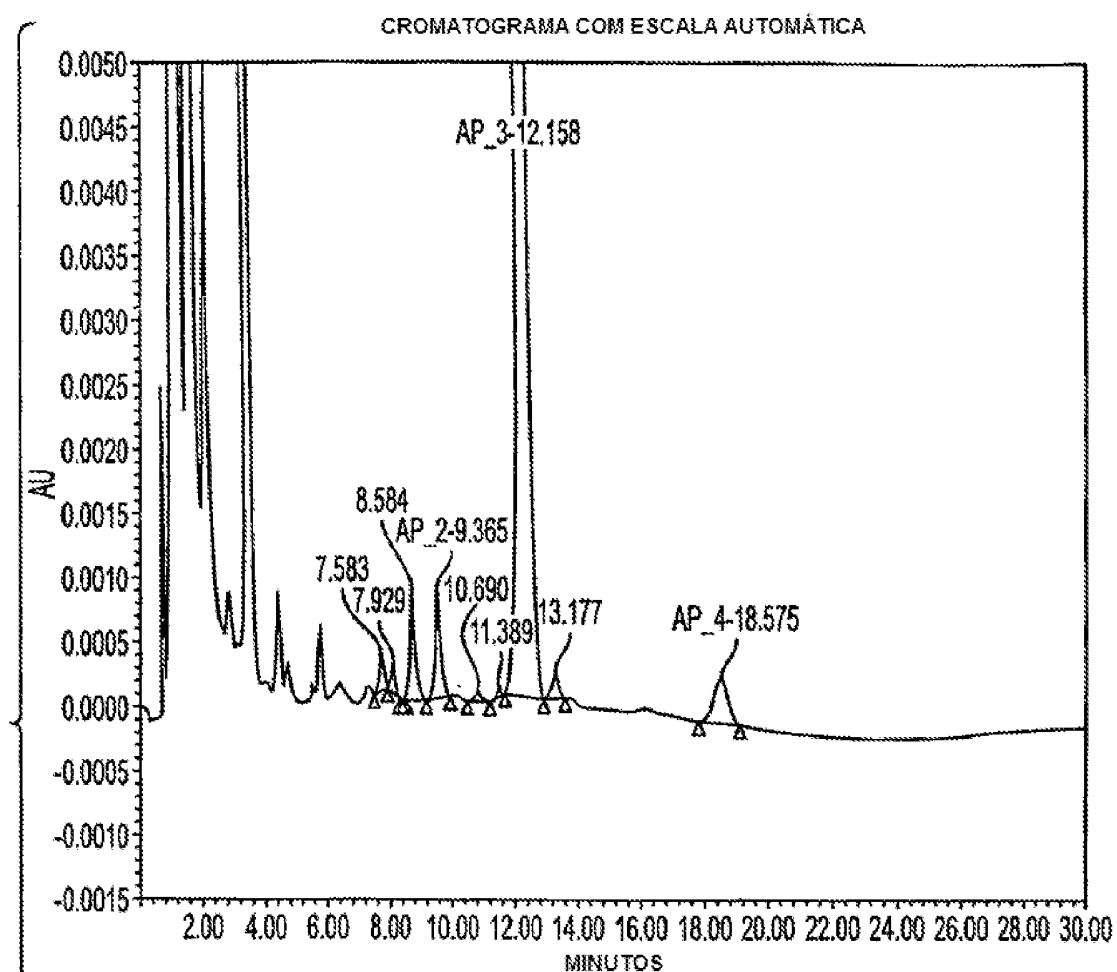


FIG. 2



NOME DA AMOSTRA PF4-4

G4\_AP-3

	AMOSTRA	COMPONENTE	TR	ÁREA	ALTURA	QUANTIDADE
1	PF4-4		7.583	2809	251	
2	PF4-4		7.929	2168	178	
3	PF4-4		8.584	11415	818	
4	PF4-4	AP_2	9.365	12486	785	14.062
5	PF4-4		10.690	1354	71	
6	PF4-4		11.389	821	56	
7	PF4-4	AP_3	12.158	345473	17000	389.092
8	PF4-4		13.177	3001	160	
9	PF4-4	AP_4	18.575	10938	357	12.319

FIG. 3