



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 727**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01) **C12N 1/21** (2006.01)
C12P 17/16 (2006.01) **C07D 313/00** (2006.01)
C07D 413/06 (2006.01) **C07D 417/06** (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05023081 .2**

96 Fecha de presentación : **26.04.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1652926**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Epotilona D cristalina.**

30 Prioridad: **28.04.2000 US 560367**
14.09.2000 US 232696 P
21.12.2000 US 257517 P
03.04.2001 US 825856
03.04.2001 US 825876
13.02.2001 US 269020 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.02.2010

73 Titular/es: **Kosan Biosciences, Inc.**
3832 Bay Center Place
Hayward, California 94545, US

72 Inventor/es: **Arslanian, Robert L.;**
Ashley, Gary;
Frykman, Scott;
Julien, Bryan;
Katz, Leonard;
Khosla, Chaitan;
Lau, Janice;
Licari, Peter J.;
Regentin, Rika;
Santi, Daniel y
Tang, Li

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Epotilona D cristalina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona formas cristalinas de epotilona D y procedimientos para obtener las formas cristalinas. La invención se refiere a los campos de la agricultura, química, química médica, medicina, biología molecular, y farmacología.

10 **Antecedentes de la invención**

Los policétidos constituyen un tipo de compuestos estructuralmente diversos sintetizados, al menos en parte, a partir de dos compuestos que son bloques construcción de unidades de carbono mediante una serie de condensaciones de tipo Claisen y modificaciones posteriores. Los policétidos incluyen antibióticos tales como tetraciclina y eritromicina, agentes anticancerosos tales como las epotilonas y daunomicina, e inmunosupresores tales como FK506, FK520, y rapamicina. Los policétidos se producen naturalmente en muchos tipos de organismos, entre los que se incluyen hongos y bacterias miceliales. Los policétidos se sintetizan *in vivo* mediante las enzimas policétido sintetas denominadas comúnmente como enzimas PKS. Se conocen dos tipos principales de PKS que difieren en su estructura y en la manera en la que sintetizan los policétidos. Estos dos tipos se denominan comúnmente como enzimas PKS de Tipo I o modular y de Tipo II o iterativo (aromático).

Las enzimas PKS modulares son normalmente complejos multiproteína en los que cada proteína contiene múltiples emplazamientos activos, cada uno de los cuales se usa únicamente una vez durante el ensamblaje y la modificación de la cadena de carbono. Las enzimas PKS iterativas son normalmente complejos multiproteína en los que cada proteína contiene únicamente uno o como máximo dos emplazamientos activos, cada uno de los cuales se usa múltiples veces durante el ensamblaje y la modificación de la cadena de carbono. Se han clonado un gran número de genes de las enzimas PKS modulares y aromáticas.

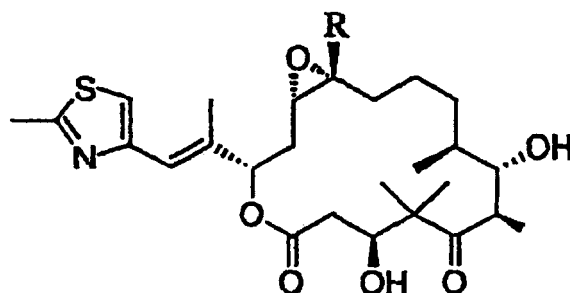
Los genes PKS modulares están compuestos por secuencias de codificación organizadas para codificar un módulo de carga, numerosos módulos extensores, y una región de liberación. Tal como se describe más completamente a continuación, cada una de estas regiones y módulos corresponden a un polipéptido con una o más funciones específicas. En general, el módulo de carga es responsable de la unión del primer bloque de construcción usado para sintetizar el policétido y transferirlo al primer módulo extensor. Los bloques de construcción usados para formar policétidos complejos son normalmente aciltioésteres, más comúnmente acetilo, propionilo, malonilo, metilmalonilo, hidroximalonilo, metoximalonilo, y etilmalonilo CoA. Otros bloques de construcción incluyen aminoácidos y aciltioésteres del tipo de los aminoácidos. Las PKS catalizan la biosíntesis de policétidos mediante repetidas condensaciones decarboxilativas de tipo Claisen entre los bloques de construcción del aciltioéster. Cada módulo es responsable de la unión a un bloque de construcción, llevando a cabo una o más funciones en este bloque de construcción, y de transferir el compuesto resultante al siguiente módulo. El siguiente módulo, a su vez, es responsable de unir el siguiente bloque de construcción y transferir el compuesto en crecimiento al siguiente módulo hasta que se completa la síntesis. En este punto, la región de liberación, a menudo la actividad de una tioesterasa enzimática (TE), rompe el policétido a partir de la PKS.

Los procedimientos recombinantes para manipular genes PKS modulares e iterativos se describen en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.962.290; 5.672.491; 5.712.146; 5.830.750; y 5.843.718; y en las solicitudes de patente PCT N^{os} 98/49315 y 97/02358. Estas y otras patentes describen los vectores de expresión recombinante para la producción heteróloga de policétidos así como los genes PKS recombinantes ensamblados combinando partes de dos o más genes diferentes o agrupaciones de genes que producen policétidos novedosos. Hasta la fecha, se han usado dichos procedimientos para producir policétidos conocidos o novedosos en organismos tales como *Streptomyces*, que producen naturalmente policétidos, y *E. coli* y levaduras, que no producen naturalmente policétidos (véase la Patente de los Estados Unidos N^o 6.033.883). En los últimos huéspedes, la producción de policétidos es dependiente de la expresión heteróloga de una fosfopanteteinil transferasa, que activa las regiones ACP de PKS (véase la publicación PCT N^o 97/13845).

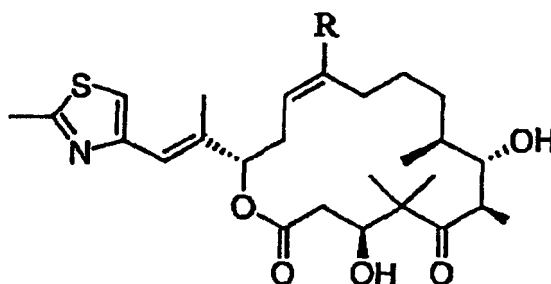
Aunque dichos procedimientos son valiosos y muy útiles, algunos policétidos se expresan sólo con niveles muy bajos en, o son tóxicos para, la célula huésped heteróloga empleada. Como ejemplo, los agentes anticancerosos epotilonas A, B, C y D se produjeron en *Streptomyces* mediante la expresión heteróloga de los genes PKS de la epotilona (Tang y col., 28 de Enero de 2000, Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster, Science, 287: 640-642, y Pub. PCT N^o 00/031247). Las epotilonas A y B se produjeron a menos de aproximadamente 50 a 100 µg/l y parecieron tener un efecto perjudicial sobre las células productoras.

Se identificaron en primer lugar las epotilonas A y B con una actividad antifúngica extraída de la mixobacteria *Sorangium cellulosum* (véanse Gerth y col., 1996, J. Antibiotics 49: 560-563 y la Patente alemana N^o. DE 4138 042) y posteriormente se encontró que tenían actividad en el ensayo de polimerización de la tubulina (véase Bollag y col., 1995, Cancer Res. 55: 2325-2333). Las epotilonas A y B y algunos derivados que se producen de manera natural y sintética se han estudiado desde entonces extensamente como agentes antitumorales potenciales para el tratamiento del cáncer. Las estructuras químicas producidas por la cepa So ce 90 de *Sorangium cellulosum* se descri-

bieron en Hofle y col., 1996, Epothilone A and B - novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: isolation, crystal structure, and conformation in solution, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 (13/14): 1567-1569, Las epotilonas A (R = H) y B (R = CH₃) tienen la estructura que se muestra a continuación y muestran amplia actividad citotóxica contra células eucarióticas y actividad y selectividad evidentes contra las líneas celulares tumorales de mama y colon.



Las contrapartes desoxi de las epotilonas A y B, conocidas también como epotilonas C (R = H) y D (R = CH₃) se han sintetizado químicamente *de novo* pero están también presentes como productos menores en las fermentaciones de *S. cellulosum*. Las epotilonas C y D son menos citotóxicas que las epotilonas A y B; a continuación se muestran sus estructuras.



Se ha descrito otras epotilonas que se producen naturalmente. Estas incluyen las epotilonas E y F, en la que la cadena secundaria de metilo del resto tiazol de las epotilonas A y B se ha hidroxilado para dar como resultado las epotilonas E y F, respectivamente, así como otros muchos compuestos de epotilona (véase la Pub. PCT N°. 99/65913).

Debido al potencial para el uso de las epotilonas como agentes anticancerosos, y debido a los bajos niveles de epotilona producidos por la cepa *S. cellulosum* natural, numerosos equipos de investigación emprendieron el esfuerzo de sintetizar las epotilonas. Tal como se ha señalado anteriormente, este esfuerzo ha sido satisfactorio (véanse Balog y col., 1996, Total synthesis of (-)-epothilone A, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 (23/24): 2801-2803; Su y col., 1997, Total synthesis of (-)-epothilone B: an extension of the Suzuki coupling method and insights into structure-activity relationships of the epothilones, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36 (7): 757-759; Meng y col., 1997, Total syntheses of epothilones A and B, JACS 119 (42): 10073-10092; y Balog y col., 1998, A novel aldol condensation with 2-methyl-4-pentenal and its application to an improved total synthesis of epothilone B, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 37 (19): 2675-2678). A pesar del éxito de estos esfuerzos, la síntesis química de las epotilonas es tediosa, consume tiempo, y es cara. Por tanto, los procedimientos se han caracterizado como no prácticos para el desarrollo farmacéutico a gran escala de cualquier epotilona como agente anticanceroso.

Se han estudiado *in vitro* e *in vivo* numerosos derivados de epotilona, así como las epotilonas A-D (véanse Su y col., 1997, Structure-activity relationships of the epothilones and the first *in vivo* comparison with paclitaxel, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36 (19): 2093-2096; y Chou y col., Agosto de. 1998, Desoxyepothilone B: an efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising *in vivo* profile relative to epothilone B, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95: 9642-9647). Se describen derivados de epotilona adicionales y procedimientos para sintetizar epotilonas y derivados de epotilona en las Pub. PCT N°. 00/23452, 00/00485, 99/67253, 99/67252, 99/65913, 99/54330, 99/54319, 99/54318, 99/43653, 99/43320, 99/42602, 99/40047, 99/27890, 99/07692, 99/02514, 99/01124, 98/25929, 98/22461, 98/08849, y 97/19086; la Patente de los Estados Unidos N°. 5.969.145; y la publicación de patente alemana N°. DE 4138 042.

Subsiste una necesidad de medios económicos para producir no sólo las epotilonas que se producen naturalmente sino también los derivados o precursores de las mismas, así como de nuevos derivados de epotilona con propiedades mejoradas.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a los procedimientos para purificar una epotilona. La epotilona se puede purificar a partir de un caldo de fermentación.

Se puede proporcionar un compuesto de epotilona en forma muy purificada. La epotilona puede tener una pureza superior al 95%. La epotilona puede tener una pureza superior al 99%. La epotilona puede estar en forma cristalina.

La presente invención proporciona epotilona D cristalina. La presente invención proporciona también un procedimiento para obtener epotilona D en forma cristalina que comprende cristalizar la epotilona D a partir de un sistema disolvente binario en el que el agua es el disolvente forzador. Preferiblemente, el sistema disolvente binario es etanol y agua y en esta forma de realización la epotilona D en forma cristalina puede tener una pureza superior al 95%.

Un procedimiento para tratar el cáncer puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de epotilona tal como se describe en el presente documento. Los compuestos y composiciones descritas en el presente documento son también útiles en el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias hiperproliferativas, que incluyen, pero no se limitan a, psoriasis e inflamación.

Estas y otras formas de realización de la invención se describen con más detalle en la siguiente descripción, los ejemplos, y las reivindicaciones que se muestran a continuación.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra el emplazamiento de restricción y los mapas de función de los plásmidos pKOS35-821 y pKOS35-822.

La Figura 2 muestra el emplazamiento de restricción y los mapas de función de los plásmidos pKOS35-154 y pKOS90-22.

La Figura 3 muestra un esquema de un protocolo para introducir los genes PKS de la epotilona y de la enzima de modificación en el cromosoma de una célula huésped de *Myxococcus xanthus* tal como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 4 muestra un mapa de pBeloBACII tal como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 5 muestra el comportamiento de los valores de referencia de la cepa K111-40-1 de *Myxococcus xanthus* en un medio de producción sencillo constituido únicamente por 5 g/l de casitona (una caseína de la digestión pancreática) y 2 g/l de sulfato de magnesio. *Leyenda:* Perfiles de crecimiento (●), producción (■), y generación de amoníaco (▲) para el medio CTS basal en un procedimiento discontinuo; las condiciones del cultivo fueron tales como se describe en Materiales y Procedimientos en el Ejemplo 3.

La Figura 6 muestra el efecto de la resina XAD-16 sobre el rendimiento de la fermentación de la cepa K111-40-1 de *Myxococcus xanthus* en medio de producción CTS. *Leyenda:* Perfiles de crecimiento (●) y producción (■) con la incorporación de 20 g/l de resina XAD-16 en el medio de producción CTS en un procedimiento discontinuo.

La Figura 7 muestra la influencia de la casitona en el crecimiento y el rendimiento del producto. *Leyenda:* Efecto de la concentración de casitona sobre el crecimiento (●), la producción (■), y la productividad específica (▲).

La Figura 8 muestra la influencia de las concentraciones de los elementos traza y oleato de metilo elevadas sobre el crecimiento y el rendimiento del producto. *Leyenda:* Efecto del oleato de metilo (●) y los elementos traza (■) sobre la producción.

La Figura 9A muestra el crecimiento y la producción de la cepa *M. xanthus* en presencia de concentraciones óptimas de oleato de metilo y elementos traza en el procedimiento de fermentación discontinua. Crecimiento exponencial de lo producido durante los primeros dos días tras la inoculación. La producción de epotilona D se inició en el comienzo de la fase estacionaria y cesó cuando se produjo la lisis celular con el agotamiento del oleato de metilo en el día 5. La Figura 9B muestra los cursos de tiempo que corresponden al consumo de oleato de metilo y la generación de amoníaco durante el crecimiento y la producción de la cepa *M. xanthus* en presencia de concentraciones óptimas de oleato de metilo y elementos traza en un procedimiento de fermentación discontinua. *Leyenda:* A.) Perfiles de crecimiento (●) y producción (■) con la adición de concentraciones óptimas de oleato de metilo (7 ml/l) y elementos traza (4 ml/l) en el medio de producción CTS en un procedimiento discontinuo. B.) Cursos de tiempo que corresponden al consumo de oleato de metilo (●) y a la generación de amoníaco (■).

La Figura 10A muestra la influencia del procedimiento discontinuo con alimentación intermitente sobre el crecimiento y la producción de la cepa *M. xanthus*. Leyenda: Perfiles de crecimiento (●) y producción (■) para el procedimiento intermitente de alimentación discontinua en matraces con agitación. Las velocidades de alimentación de la casitona y el oleato de metilo fueron 2 g/l/día y 3 ml/l/día, respectivamente. La Figura 10B muestra las velocidades constantes de consumo de oleato de metilo y la generación de amoniaco durante el curso de la fermentación. Leyenda: Cursos de tiempo que corresponden a la adición total de oleato de metilo en los cultivos (●), el consumo total de oleato de metilo (■), y la generación de amoniaco (▲).

La Figura 11 muestra el perfil de producción para el procedimiento discontinuo con alimentación intermitente en un biorreactor de 5 l. Las velocidades de alimentación de la casitona y el oleato de metilo fueron de 2 g/l/día y de 3 ml/l/día, respectivamente.

La Figura 12A muestra el impacto de las alimentaciones continuas sobre el crecimiento y la producción. Leyenda: Perfiles de crecimiento (●) y producción (■) para el procedimiento discontinuo con alimentación continua en un biorreactor de 5 l. Las velocidades de alimentación de la casitona y el oleato de metilo fueron de 2 g/l/día y de 3 ml/l/día, respectivamente. La Figura 12B muestra el curso de tiempo de la adición y el consumo de oleato de metilo así como la generación de amoniaco durante el procedimiento discontinuo de alimentación continua. Leyenda Cursos de tiempo que corresponden a la adición total de oleato de metilo en los cultivos (●), el consumo total de oleato de metilo (■), y la generación de amoniaco (▲); las condiciones de cultivo fueron tal como se describe en Materiales y Procedimientos.

Descripción detallada de la invención

Se relacionan a continuación las declaraciones con respecto a la presente invención y las definiciones de los términos usados en el presente documento.

Se aplican las definiciones a los términos tal como se usan a lo largo de esta memoria, a no ser que se limiten de otra manera en los ejemplos específicos, tanto individualmente como parte de un grupo más grande.

Están incluidos dentro del alcance de la invención todos los estereoisómeros de los compuestos descritos en el presente documento, tanto los compuestos puros así como sus mezclas. Los enantiómeros individuales, diastéromeros, isómeros geométricos, y sus combinaciones y mezclas están abarcados todos por la presente invención. Además, algunas de las formas cristalinas de los compuestos pueden existir como polimorfos, y como tales se incluyen en la presente invención. Además, algunos de los compuestos pueden formar solvatos con agua (es decir, hidratos) o disolventes orgánicos comunes, y dichos solvatos están abarcados también dentro del alcance de esta invención.

Se incluyen dentro del alcance de la presente invención las formas protegidas de los compuestos inventivos. Se dan a conocer una variedad de grupos protectores, por ejemplo, en T. H. Greene y P.G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Tercera Edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1999), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Por ejemplo, una forma hidroxil protegida de los compuestos inventivos es aquella en la que al menos uno de los grupos hidroxilo está protegido mediante un grupo protector hidroxil. Los grupos protectores de hidroxilo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a tetrahidropiraniol; bencilol; metiltiometilol; etiltiometilol; pivaloilol; fenilsulfonilol; trifenilmetilol, sililo trisustituido tal como trimetil sililo, trietilsililo, tributilsililo, tri-isopropilsililo, t-butildimetilsililo, tri-t-butilsililo, metildifenilsililo, etildifenilsililo, t-butildifenilsililo y similares; acilo y aroilo tal como acetilo, pivaloilobenzoilo, 4-metoxibenzoilo, 4-nitrobenzoilo y acilarilo alifático y similares. Se pueden proteger de manera similar los grupos ceto en los compuestos inventivos.

El término “aislado” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que se entiende “alterado” por la intervención humana a partir de su estado natural. Por ejemplo, si el compuesto se produce en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su entorno original, o ambos. En otras palabras, un compuesto naturalmente presente en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo compuesto, separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, según se emplea el término en el presente documento. El término “aislado” puede significar también un compuesto que está en una preparación que está sustancialmente libre de materiales contaminantes o indeseados. Con respecto a los compuestos que se encuentran en la naturaleza, sustancialmente libre de los materiales con que este compuesto o composición se asocia en su estado natural.

El término “purificado” cuando se refiere a un compuesto significa que el compuesto está en una preparación en la que el compuesto forma un componente principal de la preparación, tal como constituyendo aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más en peso de los componentes de la preparación.

El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento, y lo mas preferible un ser humano que ha sido objeto de tratamiento y/u observación.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se usa en el presente documento, significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que estimula la respuesta biológica o medicinal en un sistema de tejido,

animal o humano que está siendo investigado por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que está siendo tratado.

Se pretende que el término “composición” abarque un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea el resultado, directa o indirectamente, de las combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

La presente invención proporciona formas cristalinas de epotilona D.

Se pueden usar células huéspedes recombinantes del suborden *Cystobacterineae* que contienen vectores de expresión recombinante que codifican genes PKS heterólogos para producir policétidos sintetizados por la enzimas PKS codificadas en dichos vectores. Tal como se usa en el presente documento, el término recombinante se refiere a una célula, compuesto, o composición producida mediante la intervención humana, normalmente mediante manipulación específica y dirigida de un gen o porción del mismo. El suborden *Cystobacterineae* es uno de dos (el otro es *Sorangineae*, que incluye el *Sorangium cellulosum* productor de epotilona) en el orden *Myxococcales*. El suborden *Cystobacterineae* incluye la familia *Myxococcaceae* y la familia *Cystobacteraceae*. La familia *Myxococcaceae* incluye el género *Angiococcus* (es decir, *A. disciformis*), el género *Myxococcus*, y el género *Corallococcus* (es decir, *C. macrosporus*, *C. corralloides*, y *C. exiguus*). La familia *Cystobacteraceae* incluye el género *Cystobacter* (es decir, *C. fuscus*, *C. ferrugineus*, *C. minor*, *C. velatus*, y *C. violaceus*), el género *Melittangium* (es decir, *M. boletus* y *M. lichenicola*), el género *Stigmatella* (es decir, *S. erecta* y *S. aurantiaca*), y el género *Ardiangium* (es decir, *A. gephyra*). Las células huéspedes especialmente preferidas son aquellas que producen un policétido a igual a o mayor de 10 a 20 mg/l, más preferiblemente a igual a o mayor de 100 a 200 mg/l, y lo más preferible a igual a o mayor de 1 a 2 g/l.

Las células huéspedes pueden ser del género *Myxococcus* o del género *Stigmatella*. Se puede seleccionar la célula huésped entre el grupo constituido por *M. stipitatus*, *M. fulous*, *M. xanthus*, *M. virescens*, *S. erecta*, y *S. aurantiaca*. Las células huéspedes de *Myxococcus* especialmente preferidas son aquellas que producen un policétido a igual a o mayor de 10 a 20 mg/l, más preferiblemente a igual a o mayor de 100 a 200 mg/l, y lo más preferible a igual a o mayor de 1 a 2 g/l. Especialmente preferidas son las células huéspedes de *M. xanthus* que producen a estos niveles. Las células huéspedes de *M. xanthus* que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, la línea celular DZ1 (Campos y col., 1978, J. Mol. Biol. 119: 167-178), la línea celular ATCC 31046 productora de TA, la línea celular DK1219 (Hodgkin y Kaiser, 1979, Mol. Gen. Genet. 171: 177-191), y la línea celular DK1622 (Kaiser, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 76: 5952-5956).

Las células huéspedes que se describen en el presente documento comprenden un vector de expresión de ADN recombinante. Los vectores de ADN recombinante pueden ser capaces de integración cromosómica o replicación extracromosómica en estas células huéspedes. Los vectores comprenden al menos una porción de una secuencia de codificación de PKS y son capaces de dirigir la expresión de una enzima PKS funcional en las células huéspedes. Tal como se usa en el presente documento, el término vector de expresión se refiere a cualquier ácido nucleico que se puede introducir en una célula huésped. Un vector de expresión se puede mantener de manera estable o transitoria en una célula, tanto como parte del ADN cromosómico como de otro ADN en la célula o en cualquier compartimento celular, tal como un vector de replicación en el citoplasma. Un vector de expresión comprende también un gen que sirve para dirigir la síntesis de ARN que se traduce en un polipéptido o se integra en un emplazamiento en el cromosoma de tal manera que se obtiene la expresión génica. Además, los vectores de expresión contienen normalmente elementos funcionales adicionales, tales como genes que confieren resistencia para actuar como marcadores seleccionables y genes reguladores para potenciar la actividad del promotor.

Normalmente, el vector de expresión comprenderá uno o más genes marcadores mediante los cuales se pueden identificar y/o seleccionar las células huéspedes que contienen el vector. Los genes ilustrativos que confieren resistencia a los antibióticos para uso en vectores incluyen los genes que confieren resistencia *ermE* (confiere resistencia a la eritromicina y a la lincomicina), *tsr* (confiere resistencia a la tiostreptona), *aadA* (confiere resistencia a la espectinomicina y a la estreptomycin), *aacC4* (confiere resistencia a la apramicina, kanamicina, gentamicina, geneticina (G418), y a la neomicina), *hyg* (confiere resistencia a la higromicina), y *vph* (confiere resistencia a la viomicina). Los marcadores seleccionables para uso en *Myxococcus xanthus* incluyen los genes que confieren resistencia a la kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, zeocina, espectinomycin, y estreptomycin.

Los diversos componentes de un vector de expresión pueden variar ampliamente, dependiendo del uso pretendido del vector. En particular, los componentes dependen de la(s) célula(s) huésped(es) en las que el vector se va a usar y de la manera en que se pretende que se use(n). Por ejemplo, algunos vectores preferidos de la invención son vectores de integración: los vectores se integran en el ADN cromosómico de la célula huésped. Dichos vectores pueden comprender un emplazamiento de unión a fago o segmentos de ADN complementarios de los segmentos de ADN cromosómico de la célula huésped para dirigir la integración. Además, se puede usar una serie de dichos vectores para construir la agrupación de genes PKS en la célula huésped, comprendiendo cada vector únicamente una porción de la agrupación completa de genes PKS. De esta manera, los vectores de expresión de ADN recombinante pueden comprender únicamente una porción de un gen o agrupación de genes PKS. Se puede usar también la recombinación homóloga para eliminar, interrumpir, o alterar un gen, incluyendo un gen PKS heterólogo introducido anteriormente en la célula huésped.

Están disponibles para el uso una amplia variedad de promotores en los vectores de expresión de *Myxococcus* preferidos. Por ejemplo, el promotor del gen PKS de la epotilona de *Sorangium cellulosum* (véase Pub. PCT N° 00/031247) funciona en las células huéspedes de *M. xanthus*. Se puede usar el promotor del gen PKS de la epotilona para impulsar la expresión de uno o más genes PKS de la epotilona u otro producto del gen PKS en células huéspedes recombinantes. Otro promotor preferido para uso en células huéspedes de *M. xanthus* con el objeto de expresar un PKS recombinante es el promotor del gen *pilA* de *M. xanthus*. Este promotor, así como las dos cepas de *M. xanthus* que expresan niveles elevados de productos génicos de los genes controlados por el promotor *pilA*, una cepa de delección de *pilA* y una cepa de delección de *pilS*, se describen en Wu y Kaiser, Dic. 1997, Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*, J. Bact. 179 (24): 7748-7758. Las células huéspedes de *Myxococcus* recombinante pueden comprender las delecciones de *pilA* y *pilS*. Otro promotor preferido es el promotor dependiente del hambre del gen *sdeK*.

Los vectores de expresión preferidos para uso en la preparación de vectores de expresión recombinante de *Myxococcus xanthus* y las células huéspedes son los plásmidos designados pKOS35-82.1 y pKOS35-822 (Figura 1), son capaces de replicarse en células huéspedes de *E. coli* así como de integrarse en el ADN cromosómico de *M. xanthus*. Los vectores comprenden los genes de unión e integración Mx8 así como el promotor *pilA* con los emplazamientos de reconocimiento del enzima de restricción colocados convenientemente en la dirección 3'. Los dos vectores difieren entre sí meramente en la orientación del promotor *pilA* en el vector y se pueden modificar fácilmente para incluir los genes PKS de la epotilona y del enzima de modificación u otros genes PKS y del enzima de modificación. Se describe en el Ejemplo 1 la construcción de los vectores.

Un procedimiento para producir un policétido en una célula huésped del suborden *Cystobacterineae*, cuyo policétido no se produce naturalmente en dicha célula huésped, puede comprender cultivar la célula huésped transformada con un vector de ADN recombinante en condiciones tales que se exprese el gen PKS codificado en el vector y se produzca dicho policétido. Con este procedimiento, se pueden preparar cualquiera de los diversos miembros de los policétidos producidos por enzimas PKS modulares o iterativos.

Se han clonado un gran número de genes PKS modulares y están inmediatamente disponibles para uso en los vectores y procedimientos descritos en el presente documento. Los policétidos producidos por los enzimas PKS están a menudo modificados adicionalmente por enzimas de modificación de policétidos, denominados también enzimas hechos a medida, que hidroxilan, epoxidan, metilan, y/o glicosilan el producto de policétido del PKS. Se pueden introducir también estos genes en la célula huésped para preparar un policétido modificado de interés.

Para construir cualquier PKS descrito en el presente documento, se puede emplear una técnica, descrita en la Pub. PCT N° 98/27203 y en la Patente de los Estados Unidos N° 6.033.883, en la que diversos genes de los PKS y opcionalmente los genes de uno o más enzimas de modificación de policétidos se dividen en dos o más, a menudo tres, segmentos, y cada segmento se coloca en un vector de expresión separado (véase también la Pub. PCT N° 00/063361). De esta manera, se puede ensamblar y manipular el complemento completo de los genes más fácilmente para la expresión heteróloga, y se puede alterar cada uno de los segmentos del gen, y se pueden combinar diversos segmentos alterados en una célula huésped única para proporcionar un gen PKS recombinante de la invención.

Esta técnica vuelve más eficaz la construcción de grandes bibliotecas de genes PKS recombinantes, los vectores para expresar dichos genes, y las células huéspedes que comprenden dichos vectores. En este y otros contextos, los genes que codifican los PKS deseados pueden sólo estar presentes en dos o más vectores, pero pueden también ordenarse o disponerse diferentemente de los que existen en el organismo productor natural a partir del cual se derivaron los genes.

La célula huésped recombinante puede producir epotilona o un derivado de epotilona (incluyendo epotilona A, B, C, D, E, y F) y compuestos que no se producen naturalmente relacionados estructuralmente con las anteriores (derivados o análogos de epotilona) que son potentes agentes citotóxicos específicos de las células eucarióticas. Estos compuestos tienen aplicación como antifúngicos, agentes quimioterapéuticos para el cáncer, e inmunosupresores, y generalmente para el tratamiento de la inflamación o cualquier enfermedad hiperproliferativa, tal como psoriasis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, y bloqueo de las prótesis endovasculares. Las epotilonas se producen a niveles muy bajos en las células de *Sorangium cellulosum* que se producen naturalmente en las que se han identificado.

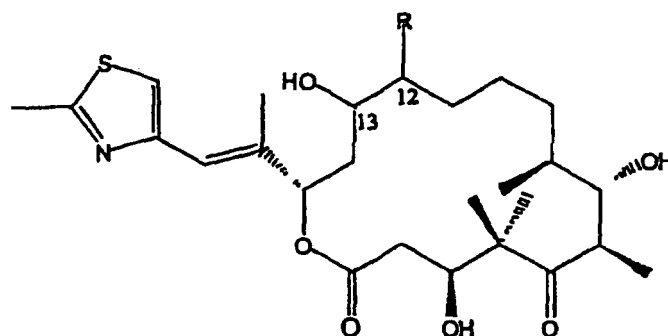
Las células huéspedes descritas en el presente documento pueden producir mezclas menos complejas de epotilonas que las que se producen en las células que producen epotilonas naturalmente. Como ejemplo, algunas células huéspedes pueden producir epotilona D en una mezcla menos compleja de la que produce un *Sorangium cellulosum* que se produce naturalmente, debido a que la epotilona D es un producto principal en el anterior y un producto minoritario en el posterior. Las células de *Sorangium cellulosum* productoras de epotilonas que se producen naturalmente producen normalmente una mezcla de epotilonas A, B, C, D, E, F, y otros productos muy minoritarios, únicamente con las epotilonas A y B como productos mayoritarios. La Tabla 1 siguiente resume las epotilonas producidas en diferentes células huéspedes ilustrativas descritas en el presente documento.

TABLA 1

Tipo celular	Epotilonas producidas	Epotilonas no producidas*
1	A, B, C, D	E, F
2	A, C	B, D, E, F
3	B, D	A, C, E, F
4	A, B	C, D
5	C, D	A, B
6	B	A, C, D, E, F
7	D	A, B, C, E, F
* o producidas sólo como productos minoritarios		

De esta manera, las células huéspedes recombinantes pueden producir únicamente como producto mayoritario sólo una epotilona o derivado de epotilona deseado.

Basándose únicamente en un análisis de las regiones de los PKS de la epotilona, se podría predecir que la enzima PKS cataliza la producción de epotilonas designadas arbitrariamente "G" y "H", las estructuras de las cuales se muestran a continuación:



Epotilonas G (R = H) y H (R = CH₃)

Estos compuestos difieren entre sí en que la epotilona G tiene un hidrógeno en el C-12 y la epotilona H tiene un grupo metilo en esa posición. Se predice que la variación en la posición C-12 procede de la capacidad de la región AT correspondiente (módulo extensor 4) del PKS de unirse tanto a malonil CoA, produciendo hidrógeno, como a metilmalonil CoA, produciendo metilo. Sin embargo, no se han observado las epotilonas G y H en la naturaleza o en las células huéspedes recombinantes descritas en el presente documento. En vez de esto, se cree que los productos del PKS son las epotilonas C y D, que difieren de las epotilonas G y H, respectivamente, por tener un doble enlace C-12 a C-13 y carecer de un sustituyente hidroxilo en C-13. Basándose en la expresión de los genes PKS de la epotilona en las células huéspedes heterólogas y los productos producidos por la alteración genética de aquellos genes, tal como se describe más completamente a continuación, se cree que la reacción de deshidratación que forma el doble enlace C12-C13 en las epotilonas C y D se lleva a cabo por el propio PKS de la epotilona. Las epotilonas A y B se forman a partir de las epotilonas C y D, respectivamente, mediante la epoxidación del doble enlace C-12 a C-13 por el producto del gen *epoK*. Las epotilonas E y F se pueden formar a partir de las epotilonas A y B, respectivamente, mediante la hidroxilación del grupo metilo en C-21 o mediante la incorporación de un hidroximalonil CoA en vez de un malonil CoA por el módulo de carga del PKS de la epotilona, tal como se describe adicionalmente a continuación.

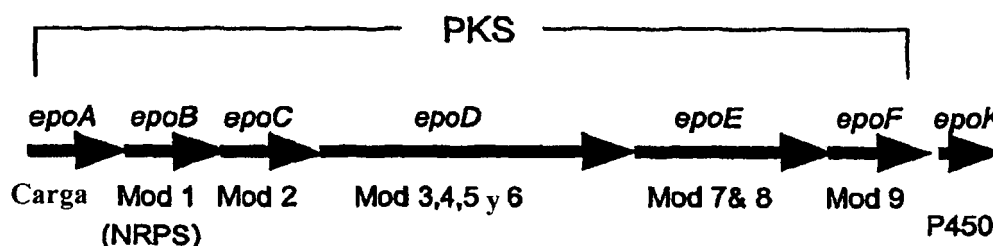
De esta manera, la expresión de los genes PKS de la epotilona y del gen *epoK* en una célula huésped de la invención conduce a la producción de las epotilonas A, B, C, y D. Si no está presente el gen *epoK* o se vuelve inactivo o parcialmente inactivo por mutación, entonces las epotilonas C y D se producen como productos mayoritarios. Si se sustituye la región AT del módulo extensor 4 por una región AT específica de malonil CoA, entonces se producen las epotilonas A y C, y si no existe gen *epoK* funcional, entonces se produce la epotilona C como producto mayoritario si se sustituye la región AT del módulo extensor 4 por una región AT específica de la metilmalonil CoA, entonces se

producen las epotilonas B y D como productos mayores, y si no existe gen *epok* funcional, entonces se produce la epotilona D como producto mayoritario.

El PKS de la epotilona y los genes de la enzima de modificación se clonaron a partir de la cepa SMP44 de *Sorangium cellulosum* que producía la epotilona. Se preparó el ADN total a partir de esta cepa usando el procedimiento descrito por Jaoua y col., 1992, Plasmid 28: 157-165. Se preparó una biblioteca de cósmidos a partir del ADN de *S. cellulosum* en pSupercos (Stratagene). Se aislaron el PKS completo y la agrupación de genes de la enzima de modificación en cuatro clones de cósmidos solapantes (depositados el 17 de Febrero de 1999, bajo los términos del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209 EE.UU., y se asignaron los números de acceso ATCC como sigue: pKOS35-70.1A2 (ATCC 203782), pKOS35-70.4 (ATCC 203781), pKOS35-70.8A3 (ATCC 203783), y pKOS35-79.85 (ATCC 203780)) y se determinó la secuencia de ADN, tal como se describe en la Pub. PCT N° 00/031237, el análisis de la secuencia de ADN desveló una agrupación de genes PKS con un módulo de carga y nueve módulos extensores. En la dirección 3' de la secuencia PKS está un marco de lectura abierto (ORF) designado *epoK*, que muestra una fuerte homología con los genes P450 de la citocromo oxidasa y que codifica la enzima de modificación epotilona epoxidasa.

Los genes PKS se organizan en 6 ORF. Al nivel de polipéptido, el módulo de carga y los módulos extensores 1 (un NRPS), 2, y 9 aparecen en polipéptidos individuales, sus genes correspondientes se designaron *epoA*, *epoB*, *epoC* y *epoF* respectivamente. Los módulos 3, 4, 5, y 6 están contenidos en un polipéptido único cuyo gen se designó *epoD*, y los módulos 7 y 8 están en otro polipéptido cuyo gen se designó *epoE*. La separación entre los ORF sugiere que *epoC*, *epoD*, *epoE* y *epoF* constituyen un operón. Los genes *epoA*, *epoB*, y *epoK* pueden ser también parte de este gran operón, pero existen espacios de aproximadamente 100 pb entre *epoB* y *epoC* y 115 pb entre *epoF* y *epoK* que podrían contener un promotor. Se muestra esquemáticamente a continuación en el esquema 1 la agrupación de genes PKS de la epotilona.

Esquema 1



Inmediatamente en la dirección 3' de *epoK*, el gen P450 de la epoxidasa, es ORF1, que codifica un polipéptido que parece incluir las regiones de expansión de la membrana y puede estar incluido en el transporte de la epotilona. Este ORF está seguido por numerosos ORF que incluyen los genes que pueden codificar las proteínas implicadas en el transporte y la regulación.

Un examen detallado de los módulos muestra una organización y composición consistente con la biosíntesis de la epotilona. La descripción que sigue es a nivel del polipéptido. La secuencia de la región AT en el módulo de carga y en los módulos extensores 3, 4, 5, y 9 muestra similitud con la secuencia consenso de los módulos de carga del malonilo, consistente con la presencia de una cadena secundaria H en el C-14, C-12 (epotilonas A y C), C-10, y C-12, respectivamente, así como el módulo de carga. Las regiones AT en los módulos 2, 6, 7 y 8 semejan la secuencia consenso de las regiones AT que especifican el metilmalonilo, consistente de nuevo con la presencia de cadenas secundarias de metilo en C-16, C-8, C-6, y C-4 respectivamente.

El módulo de carga contiene una región KS en la que el residuo de cisteína normalmente presente en el emplazamiento activo está sustituido por una tirosina. Esta región se designa como KSy y sirve como una decarboxilasa, que es parte de su función normal, pero no puede funcionar como enzima de condensación. De esta manera, se espera que el módulo de carga cargue el malonil CoA, mueva éste al ACP, y lo decarboxile para dar como resultado el residuo de acetilo requerido para la condensación con cisteína. El módulo extensor 1 es la péptido sintetasa no ribosómica que activa la cisteína y cataliza la condensación con acetato en el módulo de carga. La secuencia contiene segmentos muy similares a las regiones de unión a ATP y ATPasa, requeridas para la activación de los aminoácidos, un emplazamiento de fosfo panteteinilación, una región de oxidación, una región de ciclación, y una región de alargamiento. El módulo extensor 2 determina la estructura de la epotilona en C-15.C-17. La presencia de la región DH en el módulo 2 proporciona el resto deshidro C16-17 de la molécula. Las regiones en el módulo 3 son consistentes con la estructura de la epotilona en C-14 y C-15; el OH que proviene de la acción de KR se emplea en la lactonización de la molécula. El módulo extensor 4 controla la estructura en C-12 y C-13 en la que se encuentra un doble enlace en las epotilonas C y D. Aunque la secuencia de la región AT parece semejar aquella que especifica la carga de malonato, puede cargar también metilmalonato, contando por tanto en parte para la mezcla de las epotilonas que se encuentran en los caldos de fermentación de los organismos que se producen naturalmente.

Se encontró una novedad significativa de la matriz esperada de funciones en el módulo extensor 4. Se esperaba que este módulo contuviera una región DH, dirigiendo por tanto la síntesis de las epotilonas C y D como los productos del PKS. El análisis desveló que el espacio entre las regiones AT y KR del módulo 4 no era suficientemente grande para acomodar una región DH funcional. De esta manera, la extensión de la reducción en el módulo 4 parece que no
 5 procede más allá de la cetorreducción de los beta-ceto formados tras la condensación dirigida por el módulo extensor 4. Tal como se muestra en el presente documento, los genes PKS de la epotilona solos son suficientes para conferir a las células huéspedes la capacidad de producir las epotilonas C y D. La producción heteróloga de las epotilonas C y D demuestra que debe existir una función deshidratasa que introduzca el doble enlace. Basándose en la expresión heteróloga de los genes PKS de la epotilona y los productos producidos por los genes PKS de la epotilona alterada, se
 10 cree que la reacción de deshidratación que forma este doble enlace está mediada por la región DH del módulo extensor 5 del PKS de la epotilona y la generación de un precursor dieno conjugado antes de la reducción por la región ER del módulo 5.

Los módulos extensores 5 y 6 tienen cada uno el conjunto completo de regiones de reducción (KR, DH y ER) para
 15 dar como resultado las funciones metileno en C-11 y C-9. Los módulos extensores 7 y 9 tienen regiones KR para dar como resultado los hidroxilos en C-7 y C-3, y el módulo extensor 8 no tiene una región KR funcional, consistente con la presencia del grupo ceto en C-5. El módulo extensor 8 contiene también una región metiltransferasa (MT) que da como resultado la presencia de la función dimetilo geminal en C-4. El módulo extensor 9 tiene también una región
 20 tioesterasa que termina la síntesis del policétido y cataliza el cierre del anillo.

En la siguiente Tabla 2 se resumen los genes, las proteínas, los módulos, y las regiones del PKS de la epotilona.

TABLA 2

Gen	Proteína	Módulos	Regiones Presentes
<i>epoA</i>	EpoA	Carga	KS ^Y mAT ER ACP
<i>epoB</i>	EpoB	1	NRPS, condensación, heterociclación, adenilación, tiolación, PCP
<i>epoC</i>	EpoC	2	KS mmAT DH KR ACP
<i>epoD</i>	EpoD	3-6	KS mAT KR ACP; KS mAT KR ACP; KS mAT DH ER KR ACP; KS mmAT DH ER
			KR ACP
<i>epoE</i>	EpoE	7-8	KSmmATKRACP; KSmmAT MT DH*KR*ACP
<i>epoF</i>	EpoF	9	KS mAT KR DH* ER* ACP TE
NRPS- péptido sintetasa no ribosómica; KS - cetosintasa; mAT - aciltransferasa que 45 especifica malonil CoA; mmAT - aciltransferasa que especifica metilmalonil CoA; DH - 50 deshidratasa, ER - enoilreductasa; KR - cetoeductasa, MT - metiltransferasa, TE tioesterasa; * - región inactiva.			

La inspección de la secuencia ha desvelado el acoplamiento traduccional entre *epoA* y *epoB* (módulo de carga y
 55 el módulo extensor 1 NRPS) y entre *epoC* y *epoD*. Se observan huecos muy pequeños entre *epoD* y *epoE* y *epoE* y *epoF* pero se encuentran huecos que exceden de 100 pb entre *epoB* y *epoC* y *epoF* y *epoK*. Estas regiones intergénicas pueden contener promotores.

De esta manera, el PKS de la epotilona es un complejo multiproteína compuesto por los productos génicos de los
 60 genes *epoA*, *epoB*, *epoC*, *epoD*, *epoE*, y *epoF*. Para conferir a una célula huésped la capacidad de producir epotilonas se proporciona la célula huésped con los genes *epoA*, *epoB*, *epoC*, *epoD*, *epoE*, y *epoF* recombinantes, y opcionalmente otros genes, tales como *epoK*, capaces de expresión en la célula huésped. Las personas expertas en la técnica apreciarán que, aunque la epotilona y otras enzimas PKS pueden ser denominadas como una entidad única en el presente documento, estas enzimas son normalmente proteínas multisubunidad. De esta manera, se puede preparar un
 65 derivado de PKS (un PKS que difiere de un PKS que se produce de manera natural mediante delección o mutación) o un PKS híbrido (un PKS que está compuesto de porciones de dos enzimas PKS diferentes) alterando uno o más genes que codifican una o más de las múltiples proteínas que constituyen el PKS.

La modificación o la confección post PKS de la epotilona incluye múltiples etapas mediadas por múltiples enzimas. Estas enzimas se denominan en el presente documento como enzimas hechas a medida o de modificación. La expresión de los genes PKS de la epotilona *epoA*, *epoB*, *epoC*, *epoD*, *epoE*, y *epoF* en las células huéspedes que no expresan *epoK* conduce a la producción de las epotilonas C y D como productos mayoritarios, que carecen del epóxido en C-12-C13 de las epotilonas A y B, teniendo en vez de éste un doble enlace en C-12-C-13. De esta manera, las epotilonas C y D se convierten en las epotilonas A y B mediante una epoxidasa codificada por el gen *epoK*. Las epotilonas A y B se pueden convertir en las epotilonas E y F mediante un gen de la hidroxilasa, que puede estar codificado por un gen asociado con la agrupación de genes PKS de la epotilona o por otro gen endógeno de *Sorangium cellulosum*. Se pueden formar estos compuestos, alternativamente, cargando al módulo de unión una unidad iniciadora diferente de malonil CoA (tal como hidroximalonil CoA). De esta manera, se puede producir una epotilona o derivado de epotilona modificado según se desea en una célula huésped facilitando la célula huésped con uno o más genes del enzima de modificación recombinante proporcionado por la invención o utilizando una célula huésped que exprese naturalmente (o no exprese) el enzima de modificación y/o proporcionando unidades iniciadoras diferentes del malonil CoA.

Se puede usar una amplia variedad de compuestos de ADN recombinante y células huéspedes para expresar las epotilonas A, B, C, y D que se producen naturalmente y los derivados de las mismas. Las células huéspedes recombinantes pueden producir derivados de epotilona modificados de una manera similar a las epotilonas E y F. Además, se puede convertir cualquier epotilona o derivado de epotilona en el derivado de epotilona E o F correspondiente de acuerdo con los procedimientos descritos en la Pub. PCTP N° 00/039276.

Se pueden hacer crecer y fermentar las células huéspedes descritas en el presente documento en condiciones conocidas en la técnica con objetivos diferentes de los de producir los compuestos. Se pueden aislar los compuestos a partir de los caldos de fermentación de estas células cultivadas y purificarse mediante procedimientos tales como los del Ejemplo 3, a continuación.

Se describen en el presente documento procedimientos para purificar epotilonas a partir de medios de fermentación y para preparar formas cristalinas de la epotilona. En general, el procedimiento de purificación implica la captura de la epotilona sobre resina XAD durante la fermentación, la elución a partir de la resina, la extracción en fase sólida, la cromatografía, y la cristalización. Se describe el procedimiento en detalle en el ejemplo 3, y aunque se prefiere y se ejemplifica el procedimiento para la epotilona D, se puede usar el procedimiento para preparar epotilonas cristalinas en general, incluyendo, pero sin limitarse a otras epotilonas que se producen naturalmente, y análogos de epotilona producidos por las células huéspedes descritas en el presente documento.

Se pueden proporcionar compuestos derivados de epotilona en formas aisladas y purificadas útiles en agricultura, práctica veterinaria, y medicina. Los compuestos pueden ser útiles como fungicidas. Los compuestos pueden ser útiles en la quimioterapia del cáncer. Los compuestos pueden ser útiles para la prevención del crecimiento celular indeseado, incluyendo, pero sin limitarse al tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como inflamación, enfermedad autoinmune, y psoriasis, y para la prevención del crecimiento celular en prótesis endovasculares. Los compuestos pueden ser útiles como inmunosupresores. Los compuestos pueden ser útiles en la fabricación de otro compuesto. Se pueden formular los compuestos en una mezcla o solución para la administración a un ser humano o animal.

Las epotilonas producidas por las células huéspedes descritas en el presente documento, se pueden derivatizar y formular tal como se describe en las publicaciones de patente PCT N°s 93/10121, 97/19086, 98/08849, 98/22461, 98/25929, 99/01124, 99/02514, 99/07692, 99/27890, 99/39694, 99/40047, 99/42602, 99/43320, 99/43653, 99/54318, 99/54319, 99/54330, 99/65913, 99/67252, 99/67253, y 00/00485, y la Patente de los Estados Unidos N° 5.969.145.

Ejemplo 1

Construcción de un vector de expresión de *Myxococcus xanthus*

Se insertó el ADN que proporcionaba la integración y la función de unión del fago Mx8 en pACYC184 comercialmente disponible (New England Biolabs). Se aisló un *MfeI-SmaI* de 2360 pb a partir del plásmido pPLH343, descrito en Salmi y col., Feb. 1998, J. Bact. 180 (3): 614-621, y se ligó en el fragmento de restricción *EcoRI-XmnI* del plásmido PACYC184. El ADN circular formado de esta manera tuvo ~ 6 kb de tamaño y se le denominó plásmido pKOS35-77.

El plásmido pKOS35-77 sirve como un plásmido conveniente para expresar los genes PKS recombinantes bajo el control del promotor del gen PKS de la epotilona. En una forma de realización ilustrativa, se insertó el gen PKS de la epotilona completo con su promotor homólogo en uno o más fragmentos del plásmido para dar como resultado un vector de expresión.

Se pueden proporcionar vectores de expresión en los que los genes PKS recombinantes de la invención están bajo el control de un promotor de *Myxococcus xanthus*. Para construir un vector ilustrativo, se aisló el promotor del gen *pilA* de *M. xanthus* como un producto de la amplificación de la PCR. Se mezcló el plásmido pSWU357, que comprende el promotor del gen *pilA* y se describe en Wu y Kaiser, Dic. 1997, J. Bact. 179(24): 7748-7758, con los cebadores de la PCR Seq1 y los cebadores Mxpil1:

Seq1: 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGC-3'; y Mxpil1: 5'-TTAATTAAGAGAAGGTTGCAACGGGGGGC-3', y se amplificó usando las condiciones normalizadas de la PCR para dar un fragmento de ~ 800 pb.

ES 2 332 727 T3

Este fragmento se rompió con la enzima de restricción *KpnI* y se ligó en el fragmento de restricción *KpnI-EcoRV* del plásmido pLitmus 28 comercialmente disponible (New England Biolabs) El ADN circular resultante se designó plásmido pKOS35-71B.

Se aisló el promotor del gen *pilA* del plásmido pKOS35-71B como un fragmento de restricción *EcoRV-SnaBI* y se ligó con el fragmento de restricción *MscI* grande del plásmido pKOS35-77 para dar como resultado un ADN circular de ~ 6,8 kb de tamaño. Debido a que el fragmento de ~ 800 pb podría insertarse en una cualquiera de dos orientaciones, la ligadura produjo dos plásmidos del mismo tamaño, que se designaron como plásmidos pKOS35-82.1 y pKOS35-82.2. En la Figura 1 se presentan el emplazamiento de restricción y los mapas de función de estos plásmidos.

Los plásmidos pKOS35-82.1 y pKOS35-82.2 sirven como materiales de partida convenientes para los vectores en los que se coloca el gen PKS recombinante bajo el control del promotor del gen *pilA* de *Myxococcus xanthus*. Estos plásmidos comprenden una única secuencia de reconocimiento del enzima de restricción *PacI* colocada inmediatamente en la dirección 3' del emplazamiento de inicio de la transcripción del promotor. En una forma de realización ilustrativa, el gen PKS de la epitolona completa sin su promotor homólogo se inserta en uno o más fragmentos en los plásmidos en el emplazamiento *PacI* para dar como resultado los vectores de expresión.

Se muestra a continuación la secuencia del promotor *pilA* en estos plásmidos.

```
CGACGCAGGTGAAGCTGCTTCGTGTGCTCCAGGAGCGGAAGGTGAAGCCG
GTCGGCAGCGCCGCGGAGATTCCCTTCCAGGCGCGTGTTCATCGCGGCAAC
GAACCGGCGGCTCGAAGCCGAAGTAAAGGCCGGACGCTTTCGTGAGGACC
TCTTCTACCGGCTCAACGTCATCACGTTGGAGCTGCCTCCACTGCGCGAGC
GTTCCGGCGACGTGTGCTGCTGGCGAACTACTTCCTGTCCAGACTGTCCGG
AGGAGTTGGGGCGACCCGGTCTGCGTTTCTCCCCCGAGACACTGGGGCTAT
TGGAGCGCTATCCCTTCCCAGGCAACGTGCGGCAGCTGCAGAACATGGTG
GAGCGGGCCGCGACCCGTGTCGGATTACAGACCTCCTGGGGCCCTCCACGCTT
CCACCCGCGAGTGCGGGGCGATACAGACCCCGCCGTGCGTCCCGTGGAGGG
CAGTGAGCCAGGGCTGGTGGCGGGCTTCAACCTGGAGCGGCATCTCGACG
ACAGCGAGCGGCGCTATCTCGTCGCGGCGATGAAGCAGGCCGGGGGCGTG
AAGACCCGTGCTGCGGAGTTGCTGGGCCCTTCGTTCCGTTTCATTCCGCTACC
GGTTGGCCAAGCATGGGCTGACGGATGACTTGGAGCCCGGGAGCGCTTCG
GATGCGTAGGCTGATCGACAGTTATCGTCAGCGTCACTGCCGAATTTGTC
AGCCCTGGACCCATCCTCGCCGAGGGGATTGTTCCAAGCCTTGAGAATTGG
GGGGCTTGGAGTGCGCACCTGGGTTGGCATGCGTAGTGCTAATCCCATCCG
CGGGCGCAGTGCCCCCGTTGCAACCTTCTCTTAATTAA
```

Para preparar células huéspedes de *Myxococcus xanthus*, se hacen crecer células de *M. xanthus* en medios CYE (Campos y Zusman, 1975, Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3': 5'-cyclic AMP, ADP, and nutrition, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 518-522) en un Klett de 100 a 30°C a 300 rpm. Se lleva a cabo el resto del protocolo a 25°C a no ser que se indique otra cosa. A continuación se aglomeraron las células mediante centrifugación (8000 rpm durante 10 min. en un rotor SS34 o SA600) y se volvieron a suspender en agua desionizada. Se aglomeraron las células de nuevo y se volvieron a suspender en 1/100º del volumen original.

Se electroporó el ADN (uno de dos µl) en las células en una cubeta de 0,1 cm a temperatura ambiente a 400 ohm, 25 µFD, 0,65 V con una constante de tiempo en el intervalo de 8,8-9,4. El ADN está libre de sales y se volvió a suspender en agua destilada y desionizada o se dializó en una membrana de Tipo VS de 0,025 µm. Para electroporaciones con eficiencia baja, el ADN se dializó por manchas y la excrecencia se llevó a CYE. Inmediatamente después de la electroporación, se añadió 1 ml de CYE, y se combinaron las células en la cubeta con 1,5 ml más de CYE añadido anteriormente a un matraz Erlenmeyer de 50 ml (volumen total 25 ml). Se hicieron crecer las células durante cuatro

a ocho horas (o durante la noche) a 30 a 32°C a 300 rpm para permitir la expresión de un marcador seleccionable. A continuación se plaquearon las células en agar blando CYE sobre placas con selección. Con la kanamicina como marcador seleccionable, los rendimientos normales son de 10^3 a 10^5 por μg de ADN. Con estreptomicina como marcador seleccionable, ésta se incluye en la parte superior del agar, debido a que se une al agar.

Con este procedimiento, se electroporaron los vectores de expresión de ADN recombinante en células huéspedes de *Myxococcus* que expresaban los PKS recombinantes y producen la epotilona, derivados de la epotilona, y por tanto otros policétidos codificados.

Ejemplo 2

Integración cromosómica y un cromosoma artificial bacteriano (BAC) para la expresión de epotilona en Myxococcus xanthus

Para expresar los genes PKS de la epotilona y de los genes de la enzima de modificación en un huésped heterólogo para producir epotilonas mediante fermentación, se empleó *Myxococcus xanthus*, que está estrechamente relacionado con *Sorangium cellulosum* y para el cual están disponibles numerosos vectores de clonación. *M. xanthus* y *S. cellulosum* son mixobacterias, y por tanto manera comparten elementos comunes de expresión génica, control traduccional, y modificación postraduccional. Se ha desarrollado *M. xanthus* para la clonación y la expresión génica: se puede introducir el ADN mediante electroporación, y están disponibles numerosos vectores y marcadores genéticos para la introducción de ADN extraño, incluyendo aquellos que permiten su inserción estable en el cromosoma. Se puede hacer crecer *M. xanthus* con relativa facilidad en medios complejos en fermentadores y, si se requiere, se puede someter a manipulaciones para aumentar la expresión génica.

Para introducir la agrupación de genes de la epotilona en *Myxococcus xanthus* se puede construir la agrupación de la epotilona en el cromosoma usando recombinación homóloga para ensamblar la agrupación completa de genes. Alternativamente, se puede clonar la agrupación completa de genes de la epotilona en un cromosoma artificial bacteriano (BAC) y moverse a continuación a *M. xanthus* para la integración en el cromosoma.

Para ensamblar la agrupación de genes a partir de los cósmidos pKOS35-70-1A2, y pKOS35-79.85, se introdujeron en *Myxococcus xanthus* regiones pequeñas (~ 2 kb o mayores) de homología procedentes de estos cósmidos para proporcionar emplazamientos de recombinación de piezas mayores de la agrupación de genes. Tal como se muestra en la Figura 2, se crearon los plásmidos pKOS35-154 y pKOS90-22 para introducir estos emplazamientos de recombinación. En la Figura 3 se muestra la estrategia para ensamblar la agrupación de genes de la epotilona en el cromosoma de *M. xanthus*. Inicialmente, se escoge un emplazamiento neutro en el cromosoma bacteriano que no perturbe ningún gen o unidad transcripcional. Una de dichas regiones está en la dirección 3' del gen *devS*, que se ha demostrado que no afecta el crecimiento o el desarrollo de *M. xanthus*. El primer plásmido, pKOS35-154, se linealiza con *DraI* y se electropora en *M. xanthus*. Este plásmido contiene dos regiones del locus *dev* que flanquean dos fragmentos de la agrupación de genes de la epotilona. Insertado entre las regiones del gen *epo* está un casete compuesto de un marcador de resistencia a la kanamicina y el gen *galk* de *E. coli*. Véase Ueki y col., 1996, Gene 183: 153-157. La resistencia a la kanamicina surge en colonias si se recombina el ADN en la región *dev* mediante una doble recombinación usando la secuencia *dev* como regiones de homología.

Esta cepa, K35-159, contiene regiones pequeñas (~ 2,5 kb) de la agrupación de genes de la epotilona que permitirán la recombinación de pKOS35-79.85. Puesto que los marcadores de la resistencia en pKOS35-79.85 son los mismos que en K35-159, se transpuso un transposón de tetraciclina en el cósmido, y se seleccionaron los cósmidos que contenían el transposón insertado en el marcador de kanamicina. Este cósmido, pKOS90-23, se electroporó en K35-159, y se seleccionaron las colonias resistentes a la oxitetraciclina para crear la cepa k35-174. Para eliminar las regiones no deseadas del cósmido y dejar sólo los genes de la epotilona, se plaquearon células en placas de CYE que contenían galactosa al 1%. La presencia del gen *galk* hace a las células sensibles a la galactosa al 1%. Las colonias resistentes a la galactosa de k35-174 representan las células que han perdido el marcador *galk* por recombinación o por una mutación en el gen *galk*. Si se produce el episodio de recombinación, entonces la cepa resistente a la galactosa es sensible a la kanamicina y a la oxitetraciclina. Se verificaron las cepas sensibles a ambos antibióticos mediante el análisis de transferencia Southern. Se identificó la cepa correcta y se designó K35-176 y contiene la agrupación de genes de la epotilona del módulo 7 de 4680 pb en la dirección 3' del codón de detención de *epoK*.

Para introducir del módulos 1 al módulo 7, se repitió el procedimiento anterior una vez más. Se linealizó el plásmido pKOS90-22 con *DraI* y se electroporó en K35-176 para crear k111-13.2. Se electroporó esta cepa con la versión resistente a la tetraciclina de pKOS35-70.1A2, pKOS90-38, y se seleccionaron las colonias resistentes a la oxitetraciclina. Esto crea la cepa K111-13.23. Se seleccionaron los recombinantes que tenía ahora la agrupación completa de genes de la epotilona para la resistencia a la galactosa al 1%. Esto dio como resultado los clones K111-32.25, K111-32.26, y K111-32.35. Se depositó la cepa K111-32.25 el 14 de abril de 2000, en la American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU., de acuerdo con el Tratado de Budapest y está disponible con el N° de acceso PTA-1700. Esta cepa contiene todos los genes de la epotilona y su(s) promotor(es).

Se llevó a cabo la fermentación inoculando las cepas en 5 ml de CYE (10 g de casitona, 5 g de extracto de levadura, y 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro) en un matraz de 50 ml y se hicieron crecer durante la noche hasta que el cultivo estuvo en fase de crecimiento semilogarítmica. Se pulverizó una alícuota de 100 μl sobre una placa de CTS, y se incubó la

placa a 32°C durante 4 a 5 días. Para extraer las epotilonas, se maceraron el agar y las células de la placa, se colocaron en un tubo cónico de 50 ml, y se añadió acetona para rellenar el tubo. Se incubó la solución con agitador de vaivén durante 4 a 5 horas, se evaporó la acetona, y se extrajo el líquido restante dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. Se eliminó el agua del extracto de acetato de etilo añadiendo sulfato de magnesio. Se filtró el sulfato de magnesio, y se evaporó el líquido hasta sequedad. Se volvieron a suspender las epotilonas en 200 µl de acetonitrilo y se analizaron mediante LC/MS. El análisis demostró que la cepa producía las epotilonas A y B, con la epotilona B presente a aproximadamente 0,1 mg/l en el cultivo, y la epotilona A a niveles 5 a 10 veces inferiores.

Se puede usar también esta cepa para producir epotilonas en cultivo líquido. Se inoculó un matraz que contenía CYE con una cepa que producía epotilona. El siguiente día, mientras que las células estaban en fase de crecimiento semilogarítmica, se añadió un inóculo al 5% a un matraz que contenía CMM al 0,5% (casitona al 0,5%, MgSO₄·7H₂O, MOPS 10 mM pH 7,6) junto con 1 mg/ml de serina, alanina, y glicina y piruvato de sodio al 0,1%. Se puede añadir el piruvato de sodio al 0,5% para aumentar la producción de epotilona B pero produce una disminución en la relación de epotilona B a epotilona A. Se hace crecer el cultivo a 30°C durante 60-72 horas. Incubaciones más largas dan como resultado una disminución en los títulos de las epotilonas. Para recuperar las epotilonas, se centrifugaron los cultivos a 10.000 rpm durante 10 minutos en un rotor SS34. Se extrajeron los sobrenadantes dos veces con acetato de etilo y se evaporaron rotatoriamente ("rotaevaporaron") hasta sequedad. Los cultivos líquidos produjeron 2 a 3 mg/l de epotilonas A y B, con relaciones similares a las observadas con los cultivos en placa. Si se añadió XAD (0,5-2%) al cultivo, se observaron las epotilonas C y D, con la epotilona D presente a 0,1 mg/l y la epotilona C presente a niveles 5 a 10 veces inferiores.

Para clonar la agrupación completa de genes como un fragmento, se construyó una biblioteca de cromosomas artificiales bacterianos (BAC). En primer lugar, se incluyeron células SMP44 en agarosa y se lisaron con el kit de inserción del ADN genómico de BIO-RAD. Se digirieron parcialmente las inserciones de ADN con el enzima de restricción tal como Sau3AI o HindIII, y se sometieron a electroforesis en un gel FIGE o CHEF. Se aislaron los fragmentos de ADN electroeluyendo el ADN a partir de la agarosa o usando gelasa para degradar la agarosa. El procedimiento de selección para aislar los fragmentos es la electroelución, tal como se describe en Strong y col., 1997, Nucleic Acids Res. 19: 3959-3961. Se ligó el ADN en el BAC (pBeloBACII) roto con el enzima apropiado. En la Figura 4 se muestra un mapa de pBeloBACII).

Se electroporó el ADN en células DH10B mediante el procedimiento de Sheng y col., 1995, Nucleic Acids Res. 23: 1990-1996, para crear una biblioteca genómica de *Sorangium cellulosum*. Se rastrearon las colonias usando una sonda procedente de la región NRPS de la agrupación de la epotilona. Se puntearon los clones positivos y se aisló el ADN para el análisis de la restricción para confirmar la presencia de la agrupación completa de genes. Se designó este clon positivo pKOS35-178.

Para crear una cepa que se pueda usar para introducir pKOS35-178, se construyó un plásmido, PKOS35-164, que contenía las regiones de homología que estaban en la dirección 5' y en la dirección 3' de la agrupación de genes de la epotilona flanqueada por el locus *dev* y que contenían el casete *galk* de resistencia a la kanamicina, análogo a los plásmidos pKOS90-22 y pKOS35-154. Se linealizó este plásmido con *DraI* y se electroporó en *Myxococcus xanthus*, de acuerdo con el procedimiento de Kafeshi y col., 1995, Mol. Microbiol. 15: 483-494, para crear K35-183. Se puede introducir el plásmido pKOS35-178 en K35-183 mediante electroporación o mediante transducción con el bacteriófago P1, y se seleccionaron las colonias resistentes al cloranfenicol. Se puede construir, alternativamente, una versión de pKOS35-178 que contenga el origen de transferencia conjugativa de pRP4 para la transferencia del ADN de *E. coli* a K35-183. Se preparó este plásmido en primer lugar construyendo un transposón que contenía la región *oriT* de RP4 y el marcador de resistencia a la tetraciclina de pACYC184 y transponiendo a continuación el transposón *in vitro* o *in vivo* sobre pKOS35-178. Se transformó este plásmido en S171 y se conjugó en *M. xanthus*. Se hizo crecer esta cepa, K35-190, en presencia de galactosa al 1% para seleccionar el segundo episodio de recombinación. Esta cepa contiene todos los genes de la epotilona así como todos los promotores potenciales. Se fermentó esta cepa y se ensayó para la producción de las epotilonas A y B.

Alternativamente, se puede recombinar el transposón en el BAC usando tanto el plásmido sensible a la temperatura peak705 o pKO3 como transponiendo el transposón sobre cualquiera de pMAK705 o pKO3 seleccionados para los plásmidos tetR y camS; se llevó a cabo la recombinación tal como se describe en Hamilton y col., Sep. 1989, J. Bact. 171 (9): 4617-4622 y Link y col., Oct 1997, J. Bact. 179 (20): 6228-6237.

Además de integrar pKOS35-178 en el locus *dev*, se puede integrar también en un emplazamiento de unión al fago usando las funciones de integración de los microfagos Mx8 o Mx9. Se construyó un transposón que contenía los genes de la integración en el emplazamiento *att* de cualquiera de Mx8 o Mx9 junto con el gen de la tetraciclina de pACYC184. Versiones alternativas de este transposón pueden tener sólo el emplazamiento de unión. En esta versión, se suministraron a continuación los genes de la integración en trans mediante electroporación simultánea de un plásmido que contenía el gen de la integrasa o que tenía la proteína de la integrasa expresada en la cepa electroporada de cualquier promotor constitutivo, tal como el promotor *mgl* (véase Magrini y col., Jul. 1999, J. Bact. 181 (13): 4062-4070). Una vez se construyó el transposón, se transpuso sobre pKOS35-178 para crear pKOS35-191. Se introdujo este plásmido en *Myxococcus xanthus* tal como se describe anteriormente. Esta cepa contiene todos los genes de la epotilona así como todos los promotores potenciales. Se fermentó esta cepa y se ensayó para la producción de las epotilonas A y B. Alternativamente, se puede transponer una cepa que contiene el emplazamiento *att* y la región *oriT* sobre el BAC y conjugar el BAC resultante en *M. xanthus*.

Una vez se han establecido los genes de la epotilona en una cepa de *Myxococcus xanthus*, se puede llevar a cabo la manipulación de cualquier parte de la agrupación de genes, tal como el cambio de promotores o el cambio de módulo, usando el casete de resistencia a la kanamicina y de *galk*, tal como se describe a continuación. Se hicieron crecer los cultivos de *Myxococcus xanthus* que contenían los genes *epo* en numerosos medios y se examinaron para la producción de epotilonas. Si los niveles de producción de epotilonas (en particular B o D) son bajos, entonces los clones que producían *M. xanthus* se sometieron a los medios de desarrollo y a la mutación basada en la mejora de la cepa, tal como se describe en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 3

Procedimientos para la producción y purificación de epotilonas

A. Optimización de la producción heteróloga de epotilona D en *Myxococcus xanthus*

Se mejoró en 140 veces la producción heteróloga de epotilona D en *Myxococcus xanthus* a partir de un título inicial de 0,16 mg/l con la incorporación de una resina adsorbente, la identificación de una fuente de carbono adecuada, y la implementación de un procedimiento de alimentación discontinua.

Para reducir la degradación de la epotilona D en el medio basal, se añadió XAD-16 (20 g/l) para estabilizar el producto extracelular. Esto facilitó mucho su recuperación y potenció el rendimiento tres veces. Se evaluó también el uso de aceites como fuente de carbono para el crecimiento celular y la formación del producto. A partir de una selección de diversos aceites, el oleato de metilo demostró tener el mayor impacto. A la concentración óptima de 7 ml/l en un procedimiento discontinuo, se aumentó la densidad celular máxima desde 0,4 g de peso celular en seco (DCW) hasta 2 g de DCW/l. el rendimiento del producto dependió de la presencia de elementos traza en el medio de producción. Con un suplemento exógeno de metales traza en el medio basal, se potenció ocho veces el título del pico de la epotilona D, demostrándose el papel significativo de los iones metálicos en el metabolismo celular y en la biosíntesis de la epotilona. Para aumentar adicionalmente el rendimiento del producto, se empleó un procedimiento continuo de alimentación discontinua para promover una densidad celular mayor y para mantener un periodo de producción extendido. Los cultivos optimizados mediante alimentación discontinua dieron como resultado consistentemente una densidad celular de 7 g de DCW/l y un título promedio de producción de 23 mg/l.

Las epotilonas son metabolitos secundarios que se producen naturalmente por diversas cepas de la mixobacteria *Sorangium cellulosum* (Gerth y col., 1996; Gerth y col., 2001; las referencias citadas en este ejemplo se relacionan al final de esta sección). Son potentes inhibidores de la despolimerización de los microtúbulos, con un mecanismo de acción similar al del fármaco anticanceroso Taxol (Bollag y col., 1995). Su efecto citotóxico contra múltiples líneas celulares tumorales resistentes a fármacos que expresan la glicoproteína P las vuelve potenciales compuestos terapéuticos con gran valor comercial (Su y col., 1997; Kowalski y col., 1997). Su solubilidad en agua comparativamente elevada facilita también su formulación para la evaluación clínica.

Las epotilonas A y B son los productos mayoritarios de la fermentación del huésped natural (Gerth y col., 1996). El núcleo macrocíclico de estas moléculas de policétidos está formado por sucesivas condensaciones descarboxilativas de unidades de acetato y propionato (Gerth y col., 2000). Las epotilonas A y B difieren en un grupo metilo único en la posición C-12 de su esqueleto de carbono. La variación estructural es el resultado de la incorporación de un acetato en el ensamblaje de la epotilona A y un propionato en el de la epotilona B. Las epotilonas C y D son intermedios en la ruta biosintética de las epotilonas A y B, respectivamente (Tang y col., 2000; Molnár y col., 2000). Se excretan como productos minoritarios durante el procedimiento de fermentación, con un rendimiento combinado de aproximadamente 0,4 mg/l. Puesto que los estudios preliminares *in vivo* desvelaron que la epotilona D era el más prometedor de los cuatro compuestos como fármaco antitumoral (Chou y col., 1998), es de considerable interés producir esta molécula a gran escala.

Se ha secuenciado la agrupación de genes responsable de la biosíntesis de las epotilonas (Tang y col., 2000; Molnár y col., 2000) y se ha usado para producir estos compuestos en *Myxococcus xanthus*, un huésped microbiano estrechamente relacionado con *S. cellulosum* pero más adecuado para la manipulación genética. Para acelerar la producción de epotilona D, se construyó un mutante de delección de esta cepa recombinante (descrito en el Ejemplo 4, a continuación) para inactivar la epoxidasa de P450 que cataliza la conversión de las epotilonas C y D a las epotilonas A y B, respectivamente (Tang y col., 2000). Esta alteración genética promovió eficazmente la secreción de las epotilonas C y D como únicos productos de la fermentación de *M. xanthus*, con una relación de epotilona D a C de 4 a 1. El mutante resultante ofrece una ventaja distintiva sobre el huésped natural en la recuperación y la purificación del producto deseado en este ejemplo, se describen mejoras en la composición de los medios y la estrategia de fermentación que dan como resultado un aumento de 140 veces en la producción de epotilona D en *M. xanthus*.

Se han usado resinas adsorbentes en las fermentaciones de mixobacterias para la captura continua de moléculas biológicamente activas producidas en bajas cantidades (Reichenbach y Höfle, 1993).

Para facilitar el aislamiento de la epotilona D, se añadió la resina hidrofóbica XAD-16 al medio de cultivo. Debido a que el producto de la unión se puede eluir fácilmente a partir de la resina con un disolvente apropiado, se simplificó mucho su recuperación. Además, el uso de XAD-16 minimizó la degradación de la epotilona durante la estabilización del producto.

Se ha cultivado tradicionalmente *Myxococcus xanthus* en medios constituidos principalmente por hidrolizados enzimáticos de caseína, tales como peptona o casitona, dependiendo de aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno (Reichenbach y Dworkin 1991). En consecuencia, se acumula amoníaco en el caldo de fermentación como resultado de la degradación de los aminoácidos. Gerth y col., (1986) demostraron que una concentración de amoníaco extracelular de 35-42 mM en un cultivo de *Myxococcus virescens* correspondió a una concentración sorprendentemente elevada de amoníaco de 80-140 mM en el interior de las células. Más importantemente, se demostró que mediante la eliminación continua del amoníaco en exceso por debajo de 8 mM con un procedimiento de membrana *in situ*, la masa celular y la producción de metabolitos secundarios aumentaron drásticamente (Hecht y col., 1990). Debido a la generación de niveles elevados de amoníaco se especuló que, si se trataba de un inhibidor del crecimiento de *M. xanthus* y de la producción de epotilona D, sería deseable una fuente de carbono alternativa para reducir el consumo de aminoácidos.

Aunque se requirió un procedimiento de adaptación, se identificó el oleato de metilo entre una extensa selección de diferentes aceites como un sustrato que se puede metabolizar por *M. xanthus*. Con la adición de una solución exógena de elementos traza al medio de crecimiento, se potenció 8 veces la producción de epotilona D, con un rendimiento de 3,3 mg/l en una fermentación discontinua sencilla. Para optimizar el procedimiento adicionalmente, se adoptó una solución de alimentación discontinua usando alimentos intermitentes o continuos de casitona y oleato de metilo para prolongar la fase de producción de las células. Se informa en este ejemplo de una comparación de los resultados obtenidos con las dos diferentes estrategias de alimentación.

20 *Materiales y procedimientos*

Preparación del inóculo

Para la producción de epotilona D en medios de cultivo sin oleato de metilo, se inoculó 1 ml de células congeladas de la cepa K11-40.1 de *Myxococcus xanthus* en glicerol al 20% en 3 ml de medio CYE constituido por 10 g/l de casitona (Difco), 5 g/l de extracto de levadura (Difco) 1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y HEPES 50 mM, pH 7,6 en un tubo de cultivo de vidrio de 50 ml. La solución tampón de HEPES se valoró hasta pH 7,6 con hidróxido de potasio. Se incubaron las células a 30°C y 175 rpm en un agitador rotatorio durante 3 días. A continuación se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio CYE y se hicieron crecer durante 2 días en las mismas condiciones. El cultivo sembrado resultante se usó para inocular matraces de producción de 50 ml con un tamaño del inóculo del 5% (v/v).

Para el cultivo de *M. xanthus* en medios que contenían oleato de metilo, las células tuvieron que adaptarse al crecimiento en presencia del aceite. Se inoculó un vial de siembra de células congeladas en 3 ml de medio CYE que se suplementó con 3 μl de oleato de metilo (Emerest 2301) (Cognis corp.). Se hicieron crecer las células en un tubo de cultivo de vidrio durante 2-6 días a 30°C y 175 rpm hasta que el cultivo fue suficientemente denso bajo un microscopio. A continuación se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio CYE-MOM constituido por 10 g/l de casitona (Difco), 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 ml/l de oleato de metilo, y HEPES 50 mM, pH 7,6. Después de 2 días de crecimiento, se congelaron las células y se almacenaron a -80°C como alícuotas de 1 ml en glicerol al 20% (v/v).

Para la producción de epotilona D en los medios que contenían oleato de metilo, se inoculó 1 ml de células congeladas adaptadas al aceite en 3 ml de medio CYE-MOM en un tubo de cultivo de vidrio. Se incubaron las células a 30°C y 175 rpm durante 2 días y se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio CYE-MOM. El cultivo de la siembra resultante se hizo crecer durante 2 días en las mismas condiciones y se usó para inocular matraces de producción de 50 ml a un tamaño del inóculo del 5% (v/v).

En la preparación del inóculo para fermentaciones de 5 l, se transfirieron 25 ml del cultivo de la siembra adaptada a aceite en un matraz Fernbach de 28 l que contenía 475 ml de medio CYE-MOM. Se hicieron crecer las células a 30°C y 175 rpm durante 2 días- posteriormente, se inocularon 250 ml de este cultivo de la siembra secundaria en el interior de fermentadores de 5 l que contenían 4,75 l de medio de producción para dar como resultado una concentración final del inóculo del 5% (v/v).

55 *Producción en matraz con agitación*

Se prepararon cultivos discontinuos de K111-40-1 de *M. xanthus* en ausencia de oleato de metilo como sigue. Se autoclavó un gramo de resina XAD-16 (Rohm y Haas) a 121°C durante 30 min en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 5 ml de agua desionizada. A continuación se eliminó el agua en exceso del matraz y se añadieron 50 ml de medio CTS constituido por 5 g/l de casitona, 2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y HEPES 50 mM, pH 7,6. Debido al autoclavado de la resina adsorbente en presencia del medio de producción condujo a la unión de los nutrientes esenciales requeridos por las células, la resina y los componentes del medio se esterilizaron por separado. Se inocularon los matraces de producción con 2,5 ml del cultivo de siembra y se incubaron a 30°C y 175 rpm durante 6 días.

Se prepararon cultivos discontinuos en presencia de oleato de metilo tal como se describe anteriormente. Además se suplementó el medio de producción con 7 ml/l de oleato de metilo de una disolución de elementos traza esterilizada mediante filtro que estaba compuesta por 10 ml/l de H_2SO_4 concentrado, 14,6 g/l de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/l de ZnCl_2 , 1,0 g/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,43 g/l de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,31 g/l de H_3BO_3 , 0,24 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y 0,24 g/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

ES 2 332 727 T3

A continuación se inocularon los matraces de producción con 25 ml de cultivo de siembra adaptado a aceite y se hicieron crecer a 30°C y 175 rpm durante 5 días.

Se prepararon cultivos de alimentación discontinua con alimentaciones intermitentes de casitona y oleato de metilo como sigue. Se autoclavó un gramo de resina XAD-16 a 121°C durante 30 min en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 5 ml de agua desionizada. Tras la esterilización, se eliminó el exceso de agua del matraz, y 50 ml de medio CTS suplementado con 2 ml/l de oleato de metilo, se añadieron 4 ml/l de disolución de elementos traza, y HEPES 50 mM, pH 7,6. Se inocularon los matraces de producción con 2,5 ml del cultivo de siembra adaptado a aceite y se incubaron a 30°C y 175 rpm. Dos días después de la inoculación, se añadieron 2 g/l de casitona y 3 ml/l de oleato de metilo al medio de cultivo a intervalos de 24 h. se preparó la alimentación de casitona como una solución concentrada 100 g/l. Se hicieron crecer los cultivos durante 10-12 días hasta que se observó una lisis celular sustancial.

Todos los cultivos de producción se hicieron crecer a escala de 500 ml en matraces Fernbach de 28 l en las mismas condiciones de crecimiento.

Producción en fermentador

Se prepararon fermentaciones mediante alimentación discontinua a una escala de 5 l con alimentaciones intermitente o continua de casitona y oleato de metilo como sigue. Se autoclavaron veinte gramos por litro de XAD-16 y 2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 121°C durante 30 min en un fermentador de 5 l (B. Braun) con 4,75 l de agua desionizada. Tras la esterilización, se añadieron una disolución de casitona concentrada (150 g/l), oleato de metilo, y elementos traza al biorreactor asépticamente hasta conseguir una concentración final de casitona, oleato de metilo y elementos traza de 5 g/l, 2 ml/l, y 4 ml/l, respectivamente. A continuación se inoculó el medio con 250 ml del cultivo de siembra adaptado al aceite. Se llevó a cabo la fermentación a 30°C con una velocidad de aireación de 0,4-0,5 v/v/m y una velocidad inicial de agitación de 400 rpm. Se controló el oxígeno disuelto al 50% de saturación mediante una cascada de agitadores entre 400-700 rpm. Se mantuvo el pH del cultivo a 7,4 mediante la adición automatizada de KOH 2,5 N y H_2SO_4 2,5 M. Veinticuatro horas después de la inoculación, se añadieron la casitona (150 g/l) y el oleato de metilo al medio de producción a una velocidad de alimentación de 2 g/l/día de casitona y ml/l/día de oleato de metilo. Se dosificaron las alimentaciones tanto como un bolo único cada 24 h como continuamente con bombas peristálticas (W. Maxlow). Se dejaron crecer las células durante 10-12 días hasta que se señaló una lisis celular considerable.

Cuantificación de la epotilona

Antes del uso de la resina XAD-16 en las fermentaciones, se muestreó 1 ml del caldo de cultivo procedente de los matraces o biorreactores de producción y se centrifugó a 13.000 g durante 10 min. Se llevó a cabo la cuantificación de los productos de la epotilona en el sobrenadante usando un HPLC 1090 de Hewlett Packard con detección UV a 250 nm. Se inyectaron 500 microlitros del sobrenadante a través de una columna de oclusión de 4,6 x 10 mm (Inertsil, ODS-3, 5 μm). A continuación se llevó a cabo una extracción en línea a un caudal de 1 ml/min con un lavado con un 100% de agua durante 0,5 min, seguido por un gradiente de acetonitrilo al 50% durante 1,5 min. Se desvió el eluyente para lavar durante los dos primeros minutos y se pasó por una columna de separación más larga (4,6 x 150 mm, Inertsil, ODS-3, 5 μm), a partir de entonces. Se llevó a cabo la separación de las epotilonas C y D con un gradiente del 50% al 100% de acetonitrilo durante 8 min, seguido por un lavado con acetonitrilo al 100% durante 3 min. En estas condiciones, la epotilona C eluyó a los 9,4 minutos y la epotilona D eluyó a los 9,8 minutos.

Con el uso de la resina XAD-16, se muestrearon 5-50 ml del caldo de cultivo bien mezclado procedente de los matraces o biorreactores de producción. Después que sedimentara la resina por gravedad, se decantó el caldo de cultivo. Se lavó la resina con 5-50 ml de agua y se dejó sedimentar de nuevo por gravedad. Se retiró completamente la mezcla acuosa, y los productos de la epotilona procedentes de la resina se extrajeron con metanol al 100%. La cantidad de disolvente usado fue equivalente al 50% del volumen de la muestra. Se llevó a cabo la cuantificación de las epotilonas C y D mediante el análisis por HPLC con detección UV a 250 nm. Se inyectaron cincuenta microlitros del extracto de metanol a través de dos columnas de oclusión de 4,6 x 10 mm (Inertsil, ODS-3, 5 μm) y una columna más larga de 4,6 x 150 mm (Inertsil, ODS-3, 5 μm). El procedimiento de ensayo fue isocrático, eluyendo con 60% de acetonitrilo y 40% de agua durante 18 min a un caudal de 1 ml/min. En estas condiciones, se detectó la epotilona C a los 10,3 minutos y se detectó la epotilona D a los 13,0 minutos. Se prepararon patrones usando la epotilona D purificada.

Determinación del crecimiento celular

Se vigiló el crecimiento celular en ausencia de oleato de metilo midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm. Se diluyeron las muestras con agua hasta que los valores de DO fueron menores de 0,4. Debido a que la adición de oleato de metilo al medio de cultivo da como resultado la formación de una emulsión que tiene una fuerte absorbancia a 600 nm, se determinó el crecimiento celular en presencia de oleato de metilo mediante el peso celular en seco (DCW). Se centrifugaron cuarenta mililitros del medio de cultivo a 4200 g durante 20 min en tubos de ensayo previamente pesados. A continuación se lavaron los aglomerados con 40 ml de agua y se secaron durante 2 días a 80°C antes de pesarse.

Determinación de amoniaco

Se clarificó un mililitro de caldo de fermentación mediante centrifugación a 13.000 g durante 5 min. A continuación se usó el sobrenadante para el análisis del amoniaco con el kit de ensayo del amoniaco (Sigma). Se diluyeron las muestras 20-100 veces con agua hasta que las concentraciones finales fueron menores de 880 μ M.

Determinación de oleato de metilo

El oleato de metilo residual en 1 ml de caldo de fermentación se extrajo con 5 ml de acetonitrilo. Se sometió a vortización la mezcla y se clarificó mediante centrifugación a 4200 g durante 20 min. Se llevó a cabo la cuantificación del oleato de metilo mediante el análisis por HPLC con detección UV a 210 nm. Se inyectaron cincuenta microlitros del sobrenadante a través de dos columnas de oclusión de 4,6 x 10 mm (Inertsil, ODS-3, 5 μ m) y una columna más larga de 4,6 x 150 mm (Inertsil, ODS-3, 5 μ m). Se lavó la columna con acetonitrilo-agua (1:1) durante 2 min a un caudal de 1 ml/min. A continuación se eluyó con un gradiente del 50% al 100% de acetonitrilo durante 24 min., seguido por un lavado con acetonitrilo al 100% durante 5 min. Debido a la heterogeneidad de las longitudes de la cadena de carbono del oleato de metilo comercial, se eluyó este compuesto como dos picos principales que se detectaron a los 25,3 minutos y a los 27,1 minutos. Se cuantificó la unión del oleato de metilo con la resina XAD-16 procedente del extracto de metanol usando el mismo procedimiento HPLC. Se prepararon patrones de oleato de metilo en acetonitrilo al 83,3%. Se calculó el consumo de oleato de metilo por las células como (oleato de metilo total añadido) - (oleato de metilo residual en el medio) - (oleato de metilo unido a la resina).

Resultados

Se cultivó inicialmente la cepa K111-40-1 de *Myxococcus xanthus* en un procedimiento de fermentación discontinuo con un medio de producción sencillo constituido únicamente por 5 g/l de casitona (una caseína de la digestión pancreática) y 2 g/l de sulfato de magnesio. En la Figura 5 se muestra el comportamiento de los valores de referencia de las células.

La densidad celular máxima y la producción de epotilona D se alcanzaron tres días después de la inoculación a una DO_{600} de 1,6 y un título correspondiente de 0,16 mg/l. La densidad celular y el rendimiento del producto disminuyeron sustancialmente a partir de este momento. Junto con el consumo de casitona por las células se detectó también una acumulación gradual de amonio en el medio de producción. La concentración final de amoniaco se aproximó a 20 mM al final del día 5 de fermentación.

Efecto de XAD-16 sobre la estabilidad del producto

Para evitar la rápida degradación de la epotilona D, se añadió la resina adsorbente hidrofóbica, XAD-16, al medio de producción para unirse y estabilizar el producto excretado. XAD-16 es una resina poliaromática que se había usado previamente por Gerth y col (1996) para el aislamiento de las epotilonas A y B a partir de las fermentaciones del productor bacteriano, *Sorangium cellulosum* So ce 90. Tal como se muestra en la Figura 6, la presencia de la resina adsorbente no afecta el crecimiento de las células. Sin embargo, ésta redujo eficazmente la pérdida de epotilona D en el caldo de fermentación, lo que condujo a una potenciación de 3 veces en la recuperación de este producto.

Medios de desarrollo

En un esfuerzo por desarrollar un medio que pueda soportar una mayor densidad celular y producción de epotilona, se evaluó la influencia de la casitona en el crecimiento y el rendimiento del producto variando su concentración desde 1 g/l hasta 40 g/l en el medio de producción. Aunque se estimuló el crecimiento celular aumentando las concentraciones de casitona, la productividad específica de las células declinó significativamente, tal como se muestra en la Figura 7. La concentración óptima de casitona para la producción de epotilona D aumentó a 5 g/l, con concentraciones mayores que dieron como resultado títulos disminuidos.

Debido a que se limitaron las mejoras de los medios con el uso de la casitona, se evaluaron sustratos alternativos como suplementos para el medio basal de producción. A partir de una selección detallada de diferentes aceites, se identificó el oleato de metilo como una fuente de carbono que promovió un mayor aumento en la producción de epotilona D, tal como se resume en la Tabla 3.

TABLA 3

Aceite (7 ml)	Producción de epotilona D respecto del control sin suplementos de aceite (%)
Oleato de metilo	780
Oleato de etilo	740
Aceite de coco	610
Manteca	470
Oleato de propilo	420
Aceite de sésamo	380
Trioleato de glicerol	370
Aceite de ensalada	360
Aceite de girasol	330
Aceite de soja	290
Heptadecanoato de metilo	190
Sin aceite (control)	100
Nonadecanoato de metilo	96
Pelargonato de metilo	40
Aceite de semillas de colza	40

Sin embargo, la adición directa de oleato de metilo al medio de producción dio como resultado una lisis celular prematura. Por tanto, los cultivos de siembra se hicieron crecer en presencia de oleato de metilo antes de las fermentaciones de producción. De manera interesante, este procedimiento de adaptación volvió las células menos susceptibles a la lisis. Tal como se muestra en la Tabla 4 (mejoras en el crecimiento y la producción en comparación con el comportamiento de los valores de referencia en el Medio CTS en la fermentación discontinua), se alcanzaron una concentración punta de biomasa de 211 g/l y un título de la epotilona D de 3,3 mg/l con una concentración de oleato de metilo de 7 ml/l y una concentración de elementos traza de 4 ml/l.

TABLA 4

Condiciones de fermentación	Densidad celular máxima (g DCW/l)	Producción máxima de Epotilona D (mg/l)
Medio CTS sin XAD-16 en procedimiento discontinuo	0,44 ± 0,04	0,16 ± 0,03
Medio CTS con XAD-16 en procedimiento discontinuo	0,44 ± 0,04	0,45 ± 0,09
Medio CTS con 7 ml/l de oleato de metilo en procedimiento discontinuo	1,2 ± 0,1	0,12 ± 0,02
Medio CTS con 7 ml/l de oleato de metilo y 4 ml/l de elementos traza en procedimiento discontinuo	2,1 ± 0,2	3,3 ± 0,7
Procedimiento intermitente de alimentación discontinua	6,3 ± 0,6	9,8 ± 2,0
Procedimiento continuo de alimentación discontinua	7,3 ± 0,7	23 ± 4,6

No se observaron mejoras adicionales en el título a concentraciones mayores de oleato de metilo, tal como se muestra en la Figura 8.

Además de demostrar la importancia del oleato de metilo sobre el crecimiento y la producción celular, el gráfico anterior enfatiza también la importancia de los elementos traza en el medio de producción. Anticipando que los nutrientes administrados por la casitona pueden no ser suficientes para un crecimiento celular vigoroso, se añadió una adición exógena de metales traza en conjunción con el oleato de metilo. Sorprendentemente, se encontró que este suplemento era esencial para la potenciación del crecimiento y la producción. En su ausencia, la concentración máxima de biomasa y el título de la epotilona D fueron sólo de 1,2 g/l y 0,12 mg/l, respectivamente. Este título bajo fue comparable al obtenido con el medio basal.

Desarrollo de la alimentación discontinua

En presencia de concentraciones óptimas de oleato de metilo y elementos traza en un procedimiento de fermentación discontinua, se produjo el crecimiento exponencial de la cepa de *M. xanthus* durante los primeros dos días después de la inoculación. La producción de epotilona D se inició al comienzo de la fase estacionaria y cesó cuando se produjo la lisis celular con la disminución del oleato de metilo en el día 5, tal como se muestra en las Figuras 9A y 9B. Se muestran también los cursos temporales para el consumo de oleato de metilo y la generación de amoníaco. La concentración de amoníaco en el medio de producción fue < 4 mM a lo largo del curso de la fermentación.

Para extender el periodo de producción de las células en los cultivos del matraz, se añadieron al medio casitona y oleato de metilo una vez al día a una velocidad de 2 g/l/día y 3 ml/l/día, respectivamente. Las alimentaciones del sustrato se iniciaron 48 h después de la inoculación, y las células crecieron exponencialmente durante tres días a partir de este momento. Tal como se muestra en la Figura 10A, la concentración de biomasa comenzó a estabilizarse en el día 5 y alcanzó un máximo a 6,3 g/l en el día 10. De nuevo, la producción de epotilona D coincidió con la fase estacionaria del crecimiento, y alcanzó un rendimiento final de 9,8 mg/l al final del día 12. Tal como se muestra en la Figura 10B, el consumo de oleato de metilo y la generación de amoníaco aumentaron a velocidades constantes durante el curso de la fermentación.

El oleato de metilo se agotó a la misma velocidad que se alimentaba en el biorreactor, y el amoníaco se acumuló a una velocidad de 3,2 mM/día. Velocidades de alimentación inferiores de la casitona o del oleato de metilo redujeron mucho el título de la epotilona D, mientras que velocidades de alimentación mayores condujeron a la lisis prematura de las células antes de que se alcanzara una producción significativa.

Para ensayar la efectividad del procedimiento de alimentación discontinua a gran escala, se añadieron casitona y oleato de metilo intermitentemente a intervalos de 24 h a una fermentación de 5 l en un biorreactor. Tal como se muestra en la Figura 11, la curva de producción resultante semejó estrechamente que para los cultivos de los matraces. Las alimentaciones del sustrato se iniciaron 24 h después de la inoculación, y la producción de epotilona se inició en el día 4. Se obtuvo un valor punta de epotilona D de 9,2 mg/l diez días después de la inoculación.

Para evaluar el impacto de una estrategia de alimentación más refinada sobre el crecimiento y la producción, se dosificaron continuamente alimentaciones dobles al biorreactor. Tal como se ilustra en la Figura 12A, la implementación de la alimentación continua no afecta al crecimiento de las células, pero éstas aumentaron su productividad en casi tres veces. Se alcanzó un valor final de epotilona D de 27 mg/l 10 días después de la inoculación. Tal como se muestra en la Figura 12B, el oleato de metilo se consumió a la misma velocidad que se añadía en el medio de producción, y se liberó amoníaco a una velocidad estacionaria de 6,4 mM/día durante el curso de la fermentación.

Discusión

Aunque se ha conseguido recientemente la síntesis de la epotilona D (Harris y col., 1999; Meng y col., 1998; Sinha y col., 1998), el complejo procedimiento en 20 etapas no es un procedimiento económicamente viable para la producción a gran escala del compuesto. Mientras que la producción inicial dio como resultado 0,16 mg/l de epotilona D en la cepa de *Myxococcus xanthus*, los procedimientos de fermentación mejorada de la invención aumentaron sustancialmente el nivel de producción a 23 mg/l.

Una de las barreras principales para alcanzar un valor mayor de epotilona D fue la rápida degradación del producto en el caldo de fermentación. Se alivió este problema con la incorporación de una resina adsorbente al medio de cultivo. La adición de XAD-16 no afectó el crecimiento de las células pero minimizó la pérdida del producto excretado y aumentó su recuperación e tres veces.

Otro obstáculo para potenciar el rendimiento de la producción es la mejora limitada en la valoración con el uso de casitona como fuente primaria de carbono y nitrógeno. Aunque se estimuló el crecimiento de la cepa de *M. xanthus* aumentando las concentraciones de casitona, a una concentración que excedía los 5 g/l dio como resultado una disminución drástica en la valoración. Se ha demostrado anteriormente este efecto inhibitor en la producción de metabolitos secundario a concentraciones elevadas de peptona o casitona en otras diversas fermentaciones mixobacterianas y se ha atribuido a la acumulación de amoníaco en el medio de cultivo.

Debido a que *M. xanthus* es incapaz de metabolizar polisacáridos y azúcares (Reichenbach y Dworkin, 1991), se examinó su capacidad para utilizar aceites como fuente de carbono. Los aceites son sustratos de carbono atractivos, debido a que la oxidación de los ácidos grasos no sólo puede servir como una fuente de energía para las células, sino que la formación de acetil-CoA como producto de degradación puede proporcionar también precursores para la biosíntesis de la epotilona. La adición de aceites a la fermentación de *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, y *Streptomyces hygroscopicus* ha demostrado potenciar la producción de moléculas de policétidos, tales como eritromicina, tilosina y el inmunoregulador L-683590, respectivamente (Mirjalili y col., 1999; Choi y col., 1998; Junker y col., 1998).

A partir de una selección de diferentes aceites, se identificó el oleato de metilo como el candidato que conducía a la promoción del crecimiento celular y a la producción de epotilonas D. Se observaron sólo estas mejoras, sin embargo, con la adición simultánea de metales traza en el medio de producción. La mera adición de oleato de metilo a 7 ml/l aumentó la densidad celular máxima desde 0,4 g de DCW/l a 1,2 g de DCW/l, pero la producción permaneció al nivel de los valores de referencia. Con el suplemento exógeno de 4 ml/l de elementos traza, la concentración punta de biomasa aumentó a 2,1 g de DCW/l, y se estimuló el valor de la epotilona D desde 0,45 mg/l a 3,3 mg/l. Estos hallazgos indican que los componentes nutricionales deficientes en casitona pueden ser importantes para el crecimiento de *M. xanthus* y la formación de epotilonas.

Con el establecimiento de concentraciones óptimas de oleato de metilo y elementos traza para un procedimiento discontinuo, se realizaron esfuerzos para desarrollar una estrategia de alimentación para mantener un crecimiento celular vigoroso y para prolongar el periodo de producción. Se evaluaron alimentaciones intermitentes y continuas de casitona y oleato de metilo a velocidades constantes, y ambos procedimientos dieron como resultado mejoras similares en los perfiles de crecimiento. Con alimentaciones óptimas de los dos sustratos, se obtuvieron densidades celulares máximas de aproximadamente 6,8 g de DCW/l. En ambos casos, se agotó el oleato de metilo a medida que se añadía éste al medio de fermentación.

En contraste con el crecimiento celular y el consumo de oleato de metilo, la producción de epotilona y la generación de amoniaco se vieron muy influenciadas por la elección de la estrategia de alimentación. En el cultivo continuo con alimentación discontinua, se obtuvo un valor punta de epotilona D de 23 mg/l. este fue cerca de 2,5 veces el valor obtenido para el cultivo intermitente con alimentación discontinua. Con las alimentaciones continuas, la velocidad a la cual se liberó el amoniaco por las células fue también dos veces más alta, lo que sugiere una velocidad mayor de consumo de casitona. A la vez, estos resultados indican que los valores más bajos asociados con el procedimiento intermitente de alimentación discontinua se pueden haber producido por la represión del catabolito y no por la acumulación de amoniaco. Además, ello sugiere que la productividad de la cepa de *M. xanthus* es sensible a la cantidad de sustratos presentes en el medio de cultivo y puede ser máxima en condiciones que limitan el sustrato. Esto es también consistente con la observación de que el aumento en la concentración de casitona en el medio de producción da como resultado mayores densidades celulares pero valoraciones más bajas.

Comparando los cultivos discontinuos con el medio basal, los cultivos continuos de alimentación discontinua dieron como resultado un aumento de 17 veces en la densidad celular y un aumento de 140 veces en la valoración. Se ha escalado este procedimiento desde 5 l a 1000 l y muestra llevarse a cabo equivalentemente, los resultados que se muestran para la producción de epotilona D a escala de fabricación demuestran que se puede usar *M. xanthus* como huésped para la producción de diferentes moléculas biológicamente activas a partir de las mixobacterias.

Referencias

Bollag y col. 1995. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* 55: 2325-2333.

Choi y col. 1998. Effects of rapeseed oil on activity of methylmalonyl-CoA carboxyltransferase in culture of *Streptomyces fradiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:902-906.

Chou y col. 1998. Desoxyepothilone B: An efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising *in vivo* profile relative to epothilone B. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 95: 9642-9647.

Gerth y col. 1996. Epothilons A and B: Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria) - production, physico-chemical, and biological properties. *J Antibiot* (Tokio) 49: 560-563.

Gerth y col. 2000. Studies on the biosynthesis of epothilones: the biosynthetic origin of the carbon skeleton. *J Antibiot* (Tokyo) 53: 1373-1377.

Gerth y col. 2001. Studies on the biosynthesis of epothilones: The PKS and epothilone C/D monooxygenase. *J Antibiot* (Tokio) 54: 144-148.

Harris y col. 1999. New chemical synthesis of the promising cancer chemotherapeutic agent 12,13-desoxyepothilone B: Discovery of a surprising long-range effect on the diastereoselectivity of an aldol condensation. *J Am Chem Soc* 121: 7050-7062.

Hecht y col. 1990. Hollow fiber supported gas membrane for in situ removal of ammonium during an antibiotic fermentation. *Biotechnol Bioeng* 35: 1042-1050.

Junker y col. 1998. Use of soybean oil and ammonium sulfate additions to optimize secondary metabolite production. *Biotechnol Bioeng* 60: 580-588.

Kowalski y col. 1997. Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulina and in cells resistant to paclitaxel. *J Biol Chem* 272: 2534-41.

Meng y col. 1997. Remote effects in macrolide formation through ring-forming olefin metathesis: An application to the synthesis of fully active epothilone congeners. *J Am Chem Soc* 119: 2733-2734.

Mirjalili y col. 1999. The effect of rapeseed oil uptake on the production of erythromycin and triketide lactone by *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotechnol Prog* 15: 911-918.

Molnár y col. 2000. The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol* 7: 97-109.

Reichenbach y col. The Prokaryotes II Eds. New York: Springer-Verlag. p 3417-3487.

Reichenbach y col. 1993. Production of Bioactive Secondary Metabolites. In: Dworkin M, Kaiser D, editor. Myxobacteria II. Washington, DC: *American Society for Microbiology*. p 347-397.

Sinha y col. 1998. The antibody catalysis route to the total synthesis of epothilones. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 95: 14603-14608.

Su y col. 1997. Structure-activity relationships of the epothilones and the first *in vivo* comparison with paclitaxel. *Angew Chem Int Ed Engl* 36: 2093-2096.

Tang y col. 2000. Cloning and heterologous expression. Se incubó este cultivooof the epothilone gene cluster. *Science* 287: 640-642.

C. Producción de epotilona D

Matraces

Se descongeló un vial de la cepa K111-40-1 (descrita en el ejemplo 4) y se transfirieron los contenidos en 3 ml de los medios de siembra CYE en un tubo de vidrio. Se incubó este cultivo durante 72 ± 12 horas a 30°C , seguido por el subcultivo de 3 ml de este tubo de cultivo en 50 ml de medios CYE en el interior de un matraz Erlenmeyer con deflectores. Se incubó este matraz CYE durante 24 ± 8 horas a 30°C , y se usaron 2,56 ml de esta siembra (5% v/v) para inocular los matraces de producción de epotilona (50 ml de medios 1 x gluten de trigo en 250 ml del matraz Erlenmeyer con deflectores). A continuación se incubaron estos matraces a 30°C durante 48 ± 12 horas con un pH de los medios comenzando en 7,4.

Fermentadores

Se usó una expansión de inóculo similar de K111-40-1 tal como se describe anteriormente, con la etapa adicional de que se subcultivaron 25 ml de la siembra de 50 ml de CYE en 500 ml de CYE. 250 ml de esta siembra secundaria se usaron para inocular un fermentador de 5 l que contenía 4,5 l de CT5-TA con una alimentación diaria de 1 g/l de piruvato de sodio. Los puntos de ajuste de los parámetros del procedimiento son: pH - 7,4; agitación - 400 rpm, velocidad de pulverizado - 0,15 wm. Estos parámetros fueron suficientes para mantener el OD a más de un 80% de saturación. Se facilitó el control del pH mediante la adición de ácido sulfúrico 2,5 N e hidróxido de sodio a los cultivos. Se consiguieron valores punta de la epotilona a las 36 ± 8 horas. El valor punta de la epotilona C es de 0,5 mg/l, y el valor punta de la epotilona D es de 1,6 mg/l.

ES 2 332 727 T3

La tabla 5 es un resumen de los medios que se usaron y de sus respectivos componentes.

TABLA 5

Medio de siembra CYE	Componentes	Concentración
	Casitona (Difco)	10 g/l
	Extracto de levaduras (Difco)	5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (EM Science)	1 g/l
	Tampón HEPES	50 mM
Medios de producción CTS-TA	Componentes	Concentración
	Casitona (Difco)	5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (EM Science)	2 g/l
	L-alanina, L-serina, glicina	1 mg/l
	Tampón HEPES	50 mM
Medios de producción 1 x gluten de trigo	Componentes	Concentración
	Gluten de trigo (Sigma)	5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (EM Science)	2 g/l
	Tampón HEPES	50 mM

Los medios de siembra CYE y los medios de producción CTS-TA se esterilizaron mediante autoclavado auto esterilizado durante 30 minutos a 121°C. los medios de producción de gluten de trigo se esterilizaron mediante autoclavado durante 45 minutos a 121°C.

D. Producción de epotilona C y D a partir de *Myxococcus xanthus*

Se puede usar un procedimiento de fermentación para las cepas de *Myxococcus*, incluyendo, pero sin limitarse a *M. xanthus* K111-40-1 en el que los medios de fermentación proporcionan fuentes de carbono que se pueden utilizar sin generación de amoníaco. La fuente de carbono puede ser un aceite, tal como oleato de metilo. En los ensayos de matraces con agitación con una variedad de relaciones de alimentación, estos procedimientos dieron como resultado la producción de las epotilonas C y D, predominantemente la epotilona D, a niveles que oscilaban entre 15 y 25 mg/l, tal como se describe a continuación.

Cultivo en siembra

Se usó un vial congelado de 1 ml de células de *M. xanthus* K111-40-1 que se habían hecho crecer en 50 ml de medio CYE con 2 ml/l de oleato de metilo para inocular 3 ml de medio CYE recién preparado con 1 ml/l de oleato de metilo en un tubo de vidrio estéril. Se incubó el tubo a 30°C en un agitador a 250 RPM durante 24 horas. A continuación se transfirió el inóculo del tubo de vidrio a un matraz de 250 ml sin deflectores que contenía 50 ml de medio CYE recién preparado con 2 ml/l de oleato de metilo. Se incubó el matraz a 30°C en un agitador a 250 RPM durante 48 horas.

Matraz de producción

Se esterilizó 1 g de Amberlite XAD-16 en un matraz de 250 ml sin deflectores autoclavando a 121°C durante 30 min. A continuación se añadieron al matraz 50 ml de medios de producción estériles. Se inoculó el matraz con un 5% (v/v) del cultivo de siembra y se colocó en un incubador con agitación que trabajaba a 250 RPM y 30°C. Se inició una alimentación de 2 g/l/día de oleato de metilo estéril dos días después del momento de la inoculación, y se inició una alimentación de 2 g/l/día de casitona un día después del momento de la inoculación.

Extracción del producto

Después de 14 días, se transfirió la resina XAD del matraz de producción a un tubo de centrifuga de 50 ml. Se decantó el medio en exceso del tubo sin eliminar ninguna resina. A continuación se lavó la resina XAD con 25 ml de

ES 2 332 727 T3

agua y se dejó sedimentar. Se decantó el agua del tubo sin eliminar ninguna resina, y se añadieron al tubo 20 ml de metanol. Se colocó el tubo de centrifuga en un agitador a 175 RPM durante 20-30 minutos para extraer los productos de la epotilona procedentes de la resina. Se transfirieron los extractos de metanol a un nuevo tubo de centrifuga para el almacenamiento y el análisis LC/MS.

La tabla 6 es un resumen de los medios que se usaron y de sus respectivos componentes.

TABLA 6

Medios CYE	Componentes	Concentración
	Casitona (Difco)	10 g/l
	Extracto de levaduras (Difco)	5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (EM Science)	1 g/l
Medios de producción	Componentes	Concentración
	Casitona (Difco)	5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (EM Science)	2 g/l
Añadido a los medio de producción tras el autoclavado		
	Disolución de elementos traza x 1000	4 ml/l
	Oleato de metilo	2 ml/l

Se esterilizaron los medios CYE y los medios de producción mediante autoclavado autoesterilizado durante 30 minutos a 121°C. La disolución de elementos traza se esterilizó por filtración; el oleato de metilo se autoclavó por separado.

La disolución de elementos traza se preparó combinando todos los componentes de la Tabla 7, añadiendo 10 ml/l de H₂SO₄ concentrado y llevando el volumen final a 1 l.

TABLA 7

Solución de elementos traza x 1000	Componentes	Concentración
	FeCl ₃	8,6 g/l
	ZaCl ₂	2,0 g/l
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,0 g/l
	GuCl ₂ ·2H ₂ O	0,43 g/l
	H ₃ BO ₃	0,31 g/l
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,24 g/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,24 g/l

La solución resultante se esterilizó por filtración.

E. Fermentación, Producción, y Purificación de Epotilonas procedentes de *Myxococcus xanthus*

Descripción de las cepas de *M. xanthus*

La cepa K111-25-1 es la cepa productora de la epotilona B, que produce también la epotilona A. La cepa K111-40-1 es la cepa productora de la epotilona D, que produce también la epotilona C.

ES 2 332 727 T3

Mantenimiento de M. xanthus en placas

La cepas de *M. xanthus* se mantuvieron en placas de agar CYE (véase la Tabla 8 para la composición de la placa). Las colonias aparecen aproximadamente 3 días después del repicado en las placas. Las placas se incubaron a 32°C para el nivel deseado de crecimiento y a continuación se almacenaron a temperatura ambiente durante hasta 3 semanas (el almacenamiento a 4°C en las placas puede matar las células).

TABLA 8

Placas de agar CYE	Componentes	Concentración
	Caseína hidrolizada (digestión pancreática)	10 g/l
	Extracto de levaduras	5 g/l
	Agar	15 g/l
	MgSO ₄	1 g/l
	Solución tampón MOPS 1 M (pH 7,6)	10 ml/l
* Los lotes de 1 l de medios de agar se autoclavarón durante 45 minutos, a continuación se vertieron en placas petri		

Adaptación al aceite de M. xanthus para el depósito celular

La transferencia de una colonia no adaptada a aceite a partir de una placa de CYE o un vial congelado de células a un tubo de cultivo de vidrio de 50 ml que contenía 3 ml de medios de siembra CYE y una gota de oleato de metilo procedente de una pipeta Allow de 100 µl permitió a las células crecer durante 2-6 días (30°C, 175 rpm) hasta que el cultivo apareció denso bajo un microscopio. Iniciar varios tubos de inicio (5-7) en paralelo, ya que estas células, no siempre se adaptan bien al aceite.

Procedimiento de depósito celular (Depósito Celular Maestro)

Iniciar un tubo de cultivo adaptado a aceite tal como se ha descrito anteriormente. Cuando el tubo de cultivo está suficientemente denso (DO = 5+/- 1), transferir el contenido completo del tubo a un matraz estéril de 250 ml con agitación conteniendo 50 ml de medio de siembra CYE-MOM (véase la Tabla siguiente para la composición de los medios). Después de 48 ± 12 horas de crecimiento en un incubador con agitación (30°C) (30°C, 175 rpm), transferir 5 ml de este cultivo de siembra a 100 ml de CYE-MOM en un matraz de 500 ml con agitación. Dejar crecer este cultivo durante 1 día en un incubador con agitación (30°C, 175 rpm). Comprobar microscópicamente que el cultivo muestra un crecimiento apropiado y ausencia de contaminación.

Combinar 80 ml de este cultivo de siembra y 24 ml de glicerol estéril al 90% en un matraz estéril de 250 ml con agitación. Girar la mezcla vigorosamente, y una alícuota de 1 ml de esta mezcla en 100 crioviales premarcados estériles. Congelar lentamente los viales colocándolos en un congelador a -80°C.

Procedimiento de depósito celular (Depósito celular de Trabajo)

Inicializar un tubo de cultivo descongelando uno de los viales del depósito celular maestro producido tal como se describe anteriormente a temperatura ambiente, depositando a continuación sus contenidos completos en un tubo de vidrio que contiene 3 ml de medio de siembra CYE-MOM, cuando este tubo de cultivo está suficientemente denso (DO = 5 +/- 1), transferir los contenidos completos del tubo en un matraz de 250 ml estéril con agitación que contiene 50 ml de medio de siembra CYE-MOM. Después de 48 ± 12 horas de crecimiento (a 30°C, 175 rpm), transferir 5 ml de este cultivo de siembra en 100 ml de CYE-MOM en un matraz de 500 ml con agitación. Dejar a éste crecer durante 1 día (30°C, 175 rpm). Comprobar microscópicamente el crecimiento y la contaminación.

Combinar 80 ml de este cultivo de siembra y 24 ml de glicerol estéril al 90% en un matraz estéril de 250 ml con agitación. Girar la mezcla vigorosamente, y una alícuota de 1 ml de esta mezcla en 100 crioviales premarcados estériles. Congelar lentamente los viales colocándolos en un congelador a -80°C.

Composición de los medios de siembra

Se usaron los mismos medios de siembra tal como se describe en la Tabla 9 para el depósito celular y la expansión de los viales del depósito celular hasta cualquier volumen requerido.

TABLA 9

Medio de siembra CYE-MOM*	Componentes	Concentración
	Caseína hidrolizada (digestión pancreática) – Difco	10 g/l
	Extracto de levaduras – Difco	5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O - EM Science	1 g/l
	Oleato de metilo - Cognis	2 ml/l
* Nota: el oleato de metilo se añade después de los otros ingredientes, ya que forma una emulsión en la casitona y no se mezcla completamente con los otros componentes.		

Escalado de los inóculos para fermentaciones de 5 l y 1000 l en matraz con agitación

Descongelar un vial congelado del depósito celular de trabajo de las células adaptadas a oleato de metilo. Transferir los contenidos completos del vial a un tubo de cultivo, conteniendo 3 ml de los medios de siembra CYE-MOM. Colocar el tubo en un agitador (30°C, 175 rpm), y hacer crecer durante 48 ± 24 horas. Transferir los contenidos completos del tubo de cultivo a un matraz de 250 ml con agitación conteniendo los medios de siembra CYE-MOM. Colocar el matraz en un agitador (30°C, 175 rpm) y hacer crecer durante 48 ± 24 horas. Para usar en experimentos de matraces con agitación, expandir esta siembra subcultivando 10 ml de este cultivo en 5 nuevos matraces de siembra con 40 ml de CYE-MOM recién preparado. Incubar los matraces de siembra en un agitador (30°C, 175 rpm) durante 24 ± 12 horas para usar como un inóculo para el volumen del matraz (30-100 ml) de los cultivos de producción. Inocular los matraces de producción al 4,5% del volumen inicial combinado (medios de siembra y de producción).

Para preparar las siembras para fermentaciones a pequeña escala (5-10 l), subcultivar el contenido completo de uno de estos matraces de siembra de 50 ml en matraces Fernbach estériles de 28 l conteniendo 500 ml de CYE-MOM. Incubar este matraz Fernbach en un agitador (30°C, 175 rpm) durante 48 ± 24 horas para usar como inóculo del fermentador. Inocular la fermentación de producción a aproximadamente un 5% del volumen inicial combinado.

Se requirió expansión de siembra adicional para las fermentaciones a gran escala (1000 l). Aquí, se usó 1 l de la siembra en matraz Fernbach para inocular (5% en volumen) un fermentador de siembra de 10 l que contenía 9 l de CYE-MOM. Se controló el pH del fermentador a 7,4 mediante la adición de hidróxido de potasio 2,5 N y ácido sulfúrico 2,5 N, se ajustó la temperatura a 30°C. El oxígeno disuelto se mantuvo a o por encima del 50% de saturación poniendo en cascada la velocidad de agitación entre 400-700 rpm. La velocidad inicial de agitación se ajustó a 400 rpm, y la velocidad de pulverización se mantuvo a 0,1 v/v/m. Después de 24 ± 12 horas de crecimiento en el fermentador de 10 l, se transfirió el cultivo completo en un fermentador de 150 l que contenía 90 l de CYE-MOM. El pH se controló una vez más a 7,4 con hidróxido de potasio 2,5 N y ácido sulfúrico 2,5 N. Se ajustó la temperatura a 30°C. El oxígeno disuelto se mantuvo a o por encima del 50% de saturación poniendo en cascada la velocidad de agitación entre 400-700 rpm, Se ajustó la velocidad inicial de agitación a 400 rpm, y la velocidad de pulverización se mantuvo a 0,1 v/v/m.

Preparación de la resina XAD-16 para las fermentaciones

Transferir la cantidad requerida de resina XAD-16 (Rohms & Haas) en un contenedor seguro de metanol con un volumen mínimo de 3 veces el peso de la resina XAD-16 (es decir, 12 kg de resina requieren un contenedor de al menos 3,6 l). Lavar la resina vigorosamente con metanol al 100% para eliminar cualquier monómero presente en la resina virgen. Añadir dos veces la cantidad de metanol en litros referida al el peso de la resina en kilogramos (es decir, 6 litros de metanol para 3 kilogramos de XAD-16). Mezclar la suspensión de metanol y XAD durante 5 minutos para eliminar cualquier monómero presente en la XAD-16. Agitar la suspensión suavemente mezclando a la vez para minimizar la fragmentación de la resina. Detener la mezcla, y dejar que sedimente la resina por gravedad durante no menos de 15 minutos. Drenar el metanol del contenedor, dejando una capa de 0,5 a 1 pulgada (1,25 a 2,5 cm) de metanol por encima del lecho de XAD. Transferir la XAD y el metanol del contenedor de mezcla a una columna Amicon A250. Unir el soporte superior del lecho a la columna y cerrar herméticamente el soporte del lecho volviendo a ajustar el mando del cierre hermético en la dirección de las agujas del reloj. Lavar la XAD en la columna con no menos de 5 volúmenes de columna de metanol a 300 ± 50 cm/h. recoger el flujo de metanol a través del receptáculo de lavado del disolvente. Lavar la XAD en la columna con no menos de 109 volúmenes de columna de agua desionizada a 300 ± 50 cm/h.

ES 2 332 727 T3

En la Tabla 10 se describe la composición de los medios de producción de epotilona.

TABLA 10

Medios de producción CTS-MOMP	Componentes	Concentración
	Casitona (Difco)	5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (EM Science)	2 g/l
	XAD-16	20 g/l
Añadido tras el autoclavado		
	Solución de elementos traza 1000x	4 ml/l
	Oleato de metilo	2 ml/l
* Nota: el oleato de metilo se añade después de los otros ingredientes, ya que forma una emulsión en la casitona y no se mezcla completamente con los otros componentes. La disolución de elementos traza es tal como se describe en la Tabla 7		

Preparación y fermentación de la producción de epotilona a escala Flosk (50 ml)

Autoclavar 1 g de XAD-16 en un matraz de 250 ml con agitación con suficiente agua desionizada (~ 3 ml) para cubrir la resina. Se esterilizaron los matraces autoclavando durante 30 minutos a 121°C. Añadir asepticamente los siguientes componentes de los medios al matraz: 50 ml del medio de producción CTS-MOM y 2,5 ml de tampón HEPES 1 M (valorado hasta un pH de 7,6 con hidróxido de potasio). Inocular los cultivos con 2,5 ml del matraz de siembra CYE (4,5% inóculo volumen/volumen). Incubar los matraces de producción en un agitador a 30°C y 175 rpm.

Iniciar las alimentaciones de casitona y oleato de metilo 24 ± 6 horas tras la inoculación. En este momento, y cada 24 ± 6 horas a partir de este momento, alimentar 1 ml de una solución de 100 g/l de casitona y 150 µl de oleato de metilo. Continuar este régimen de alimentación durante hasta 13 días tras la alimentación inicial, o hasta que se observación de células que comenzaban la lisis (día 11-14). Para determinar la cinética de la producción de epotilona, se puede muestrear una muestra representativa de 5 ml de caldo de fermentación y XAD bien mezclados. Adicionalmente, se puede tomar diariamente una pequeña muestra (0,25-0,5 ml) de caldo sin la XAD para comprobar visualmente el estatus de crecimiento del cultivo. Cuando se observó la lisis celular masiva, debería cosecharse el resto del volumen del cultivo.

Preparación y fermentación de la producción de epotilona a escala de 5 l

Se combinaron 100 g de XAD y 8 g de MgSO₄·7H₂O con 3,9 l de agua desionizada, y se esterilizaron (30 minutos, 121°C) en un biorreactor B-Braun de 5 l. se bombeó un volumen suficiente (133 ml) de una solución preesterilizada de casitona/agua desionizada (150 g/l) en forma aseptica hasta alcanzar una concentración final de casitona de 5 g/l en el fermentador. Se alcanzó una concentración inicial de oleato de metilo de 2 ml/l mediante la adición de 10 ml de este aceite. Finalmente, se añadieron 16 ml de solución preesterilizada de elementos traza asepticamente antes de la inoculación. A continuación se inoculó el fermentador con 200 ml del cultivo de siembra CYE (4,8% volumen/volumen) y se permitió crecer durante 24 ± 6 horas. En este momento, se iniciaron las alimentaciones de casitona (2 g/l/día, alimentación continua) y oleato de metilo (3 ml/l/total diario, alimentación semicontinua cada 90 minutos). Se mantuvo constante el caudal de aire en el biorreactor a 0,4-0,5 vvm (el volumen de la fermentación aumenta a medida que progresan las alimentaciones produce esta variación). Se controló la concentración de oxígeno disuelto al 50% de saturación mediante una cascada de agitación (400-700 rpm). Se estableció el 100% de saturación del punto de calibración del oxígeno disuelto ajustando la agitación inicial a 400 rpm, y el caudal de aire inicial a 0,5 vvm. Se mantuvo el punto de ajuste del pH de 7,4 mediante la adición automatizada de H₂SO₄ 2,5 N y KOH 25 N. la producción de epotilona continuó durante 11-14 días tras la inoculación, se cosechó el biorreactor cuando la lisis celular es aparente en las muestras de caldo y la demanda de oxígeno (tal como se indicó mediante la velocidad de agitación) disminuye bruscamente. Las valoraciones de la epotilona D aumentan a 18-25 mg/l en este procedimiento de fermentación.

Preparación y fermentación de la producción de epotilona a escala de 1000 l

Se preparó el fermentador de 1000 l para la producción de epotilona como sigue. Se esterilizaron 600 l de agua y 18 l (115.574 kg) de XAD-16 (45 minutos, 121°C) en el fermentador. Se esterilizaron mediante filtración los metales traza y MgSO₄ (mediante un filtro de cápsula con membrana de polietersulfona de 0,2 micrómetros preesterilizada) directamente en el recipiente de fermentación. Se añadieron 2,9 l de la disolución de elementos traza así como una cantidad suficiente de una solución concentrada de MgSO₄ (hasta una concentración final de 2 g/l en el fermentador) a

ES 2 332 727 T3

través del mismo filtro de cápsula- se esterilizaron aproximadamente 200 l de una mezcla de 117 g/l de casitona y 175 ml/l de oleato de metilo en un tanque de alimentación de 260 l. Se añadieron aproximadamente 32 l de esta mezcla estéril al fermentador de 1000 l. Se filtró agua en el recipiente (mediante el mismo filtro de cápsula) hasta alcanzar un volumen final de 710 l. La agitación fue de 100 rpm. Se mantuvo la contrapresión a 100-300 mbar. Cuando el oxígeno disuelto (OD) alcanzó el 50% tras la inoculación, se aumentó la agitación a 150 rpm. Cuando el OD alcanzó de nuevo el 50% se aumentó la agitación a 200 rpm. Se controló el OD al 50% de saturación poniendo en cascada el caudal de aire (0 Lpm - 240 Lpm). Se mantuvo el punto de ajuste del pH a 7,4 mediante la adición automatizada de KOH 25 M y H₂SO₄ 25 N. se inoculó el fermentador con 38 l de la siembra procedente del fermentador de 150 l (5% volumen/volumen).

La adición de 0,570 l/hora de la solución de alimentación de casitona - oleato de metilo comenzó después que el OD alcanzara el 50% (por la segunda vez, aproximadamente 10 ± 5 horas tras la inoculación) y continuó hasta que se cosechó el fermentador. Se cosechó el biorreactor 10 días después de la inoculación. Se determinó que los valores finales de la epotilona D eran aproximadamente 20 ± 5 mg/l.

Procedimiento de muestreo de la fermentación

Para los experimentos cinéticos en matraces, se muestrearon 5-50 ml de caldo y resina XAD mezclada vigorosamente con una pipeta de 25 ml y se depositaron en un tubo cónico de 10 o 50 ml. Para las muestras del biorreactor, se depositaron una muestra de 50 ml del caldo mixto y la resina en un tubo cónico de 50 ml. Se permitió al tubo cónico asentarse durante 10 minutos para permitir sedimentar la XAD en la parte inferior del tubo. Se puede decantar el caldo en este momento de la resina XAD. Si la XAD no sedimenta, se puede entonces eliminar el caldo usando una pipeta de 10-25 ml.

Extracción de metanol de la resina XAD para la cuantificación del valor de la epotilona

Después que la resina XAD ha sedimentado por gravedad en la parte inferior del tubo de la muestra (como para el procedimiento de muestreo), todo el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo cónico de 50 ml. Lavar la resina XAD una vez añadiendo agua hasta la marca de 50 ml, mezclar vigorosamente mediante inversión, y dejar que la resina XAD sedimente de nuevo por gravedad. Decantar la mezcla acuosa del tubo, sin verter la XAD. Se pueden eliminar los últimos pocos ml de agua usando una pipeta manual de 1 ml con la punta apoyada en la base del tubo. Añadir metanol al tubo hasta el punto de 25 ml, y tapar el tubo. Colocar el tubo cónico horizontalmente en un agitador durante 30 minutos (a 20-30°C) para extraer vigorosamente toda la epotilona de la resina XAD.

Procedimiento HPLC para la cuantificación de la epotilona

Se llevó a cabo el análisis de las epotilonas C y D usando un HPLC 1090 de Hewlett Packard con detección UV a 250 nm. Se inyectó la solución extraída en metanol de la resina XAD (50 µl) a través de dos columnas de oclusión de 4,6 x 10 mm (Inertsil, C18 DO 53, 5 µm), y una columna más larga del mismo material para la separación cromatográfica (4,6 x 150 mm). El procedimiento fue isocrático con 60% de acetonitrilo y 40% de agua durante un ciclo de 18 minutos. Con este procedimiento, la epotilona D eluyó a los 13 minutos y la epotilona C eluyó a los 10,3 minutos. Se prepararon patrones usando la epotilona D purificada a partir del caldo de fermentación.

Procedimiento del peso celular seco para la curva de crecimiento

Ajustar la temperatura en una centrífuga RC5B de Sorvall (con el soporte SH-3000 del rotor) a 20°C. Pesar un tubo cónico de 50 ml que ha estado en el horno a 80°C durante al menos un día. Registrar el peso de la tara y la identificación de la muestra de la fermentación en el lateral del tubo. Verter o pipetear 40 ml de caldo (no conteniendo XAD) en el tubo tarado. Hacer girar el tubo cónico a 4700 RPM (4200 g) durante 30 minutos. Tras la sedimentación, eliminar por vertido el sobrenadante, y volver a suspender el aglomerado celular en 40 ml de agua desionizada para lavar el aglomerado. Hacer girar el tubo de nuevo (4200 g, 30 minutos). Decantar el sobrenadante, y colocar el tubo en un horno de secado a 80°C durante al menos 2 días. Pesar el tubo, y registrar el peso final del tubo. A continuación se puede calcular el peso celular seco (DCW) mediante la siguiente ecuación:

$$DCW \text{ (g/l)} = (\text{peso final del tubo (g)} - \text{peso de la tara del tubo (g)}) / 0,04 \text{ l}$$

Determinación de la concentración de ión amonio

Se ensayó de manera rutinaria la concentración de amoniaco en el caldo de fermentación en las fermentaciones de la epotilona. Se clarificó un mililitro del caldo de fermentación mediante centrifugación en una microcentrífuga (5 minutos, 12000 rpm). Se usó un kit de ensayo del amoniaco (Nº de catálogo 171-UV) para la cuantificación, con el caldo de fermentación en lugar del plasma sanguíneo descrito en el protocolo del kit. Como el intervalo de respuesta lineal de este ensayo colorimétrico es sólo de 0,01176-0,882 mmoles/l, las muestras de fermentación clarificadas se diluyen normalmente 20-100 veces en agua desionizada para ensayar las concentraciones de amonio dentro de este intervalo.

Determinación de la concentración residual de oleato de metilo

Se puede estimar la cantidad de oleato de metilo residual presente en el caldo de fermentación extrayendo muestras del caldo de fermentación con metanol, y haciendo avanzar las muestras de caldo extraídas en un HPLC. Se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de oleato de metilo usando un HPLC 1090 de Hewlett Packard con detección UV a 210 nm. Se extrajeron las muestras de caldo completo (1-4 ml) con un volumen equivalente de metanol y se centrifugaron a 12.000 g para sedimentar cualquier componente insoluble. Se inyectó el sobrenadante clarificado (50 μ l) en una columna de extracción de 4,6 x 10 mm (Inertsil C18 ODS3, 5 μ m), se lavó con acetonitrilo al 50% durante 2 minutos, a continuación se eluyó sobre la columna principal (4,6 x 150 mm, misma fase estacionaria y caudal) con un gradiente de 24 minutos comenzando a acetonitrilo al 50% y terminando a acetonitrilo al 100%. Se mantuvo el flujo de la columna al 100% durante 5 minutos. Debido a su naturaleza heterogénea, el oleato de metilo eluye en forma de numerosos picos diseminados, en vez de un compuesto único puro. Sin embargo, aproximadamente de un 64-67% de los extraíbles totales de oleato de metilo aparecen en dos picos primarios que eluyen a $25,3 \pm 0,2$ y $27,1 \pm 0,2$ minutos, respectivamente. Se pueden estimar el oleato de metilo en las muestras de la fermentación extraídas en metanol cuantificando el sumatorio de las áreas de estos dos picos, calibrándolas frente al sumatorio de las áreas de estos dos picos en patrones de oleato de metilo preparado en una solución de agua/metanol al 50%.

Purificación y cristalización de la Epotilona D

La presente invención proporciona un procedimiento de purificación de la epotilona D y preparaciones muy purificadas de epotilona D, más concretamente, epotilona D en forma cristalina. Las ventajas del presente procedimiento incluyen etapas iniciales de purificación que requieren sólo alcohol (tal como metanol) y agua, lo que permite un uso eficaz de los productos combinados y minimiza la necesidad de etapas de evaporación que exigen tiempo y mucha mano de obra. El presente procedimiento requiere únicamente una única etapa de evaporación, que requiere la evaporación de 1 l de etanol por cada 10-15 g de epotilona. En el procedimiento, se usó una columna empaquetada con resina sintética de poliestireno-divinilbenceno tal como HP20SS para eliminar las impurezas polares y lipofílicas. Esta columna genera un producto intermedio que contiene un 10% de epotilonas y elimina la necesidad de extracciones líquido/líquido que usan disolventes tanto inflamables como tóxicos.

Otra mejora se refiere al uso de una resina C18 con una distribución de partículas de 40-60 micrómetros, tal como Bakerbond C18, que permite el uso de columnas y bombas de presión baja (menos de 50 psi, $3,45 \times 10^5$ N/m²), lo que reduce el coste significativamente. El material de partida para la etapa de cromatografía C18 es la solución cargada en un disolvente de carga diluido. El disolvente es suficientemente débil de tal manera que las epotilonas se pegan a la parte superior de la columna en una banda estrecha, muy concentrada, lo que permite a la columna trabajar bien con carga pesada (2-5 g de epotilona/l de resina). Debido a que la carga típica de la columna es 1 g/l o menos, y la cromatografía es usualmente la etapa más cara en la purificación, esta mejora da como resultado ahorros de costes significativos. Además, el presente procedimiento permite el uso de un alcohol, tal como metanol, en vez de acetonitrilo en la etapa de la cromatografía. La combinación que contiene la epotilona está cristalizada a partir de un sistema disolvente binario para proporcionar la epotilona en forma cristalina.

El procedimiento de purificación, en una forma de realización, está constituido por las siguientes etapas y materiales. La resina XAD en el caldo de fermentación se (1) recoge en una cesta de filtración, y (2) se eluye para proporcionar un extracto de XAD, que se (3) diluye con agua, y (4) se pasa a través de una columna HP20SS para proporcionar el combinado de HP20SS. El combinado de HP20SS se (5) diluye con agua, y (6) se somete a cromatografía C18 para proporcionar un combinado de epotilona, que se (7) diluye con agua, y (8) se somete a un intercambio de disolventes para proporcionar un combinado de epotilona concentrada. El combinado de epotilona concentrada se (9) somete a filtración con carbón activo, (10) se evapora, y (11) se cristaliza para proporcionar el material muy purificado.

Se aislaron un total de 11 g de epotilona D y se purificaron hasta un polvo cristalino de color blanco a partir de dos lotes de fermentación de 1000 l de *Myxococcus xanthus* (1031001K y 1117001K). La pureza del producto final fue > 959b, y la recuperación de la epotilona D fue del 71%.

ES 2 332 727 T3

La tabla 11 resume los Procedimientos HPLC usados durante la purificación.

TABLA 11

Procedimiento Epo1		
	Columna	Inertsil ODS3, 5µm, 4,6 x 150 mm
	Caudal	1 ml/min
	Horno de la columna	50° C
	Tiempo de duración	está minutos
	Detección	UV a 250 nm
	Gradiente	0 min, 60:40 ACN/H ₂ O 12 min; 100:0 ACN/H ₂ O 12,1 min; 60:40 ACN/H ₂ O
Procedimiento Epo78		
	Columna	Inertsil ODS3, 5µm, 4,6 x 150 mm
	Caudal	1 ml/min
	Horno de la columna	5 minutos
	Tiempo de duración	UV a 250 nm
	Gradiente	0 min, 78:22 ACN/H ₂ O

Los materiales usados en esta sección son como sigue. La resina HP20SS se adquirió de Mitsubishi. La resina C18 se adquirió de Bakerbond y el metanol se adquirió de Fisher Bulk (56 gal, 252 litros). Se usó agua desionizada.

Lote de fermentación 1031001K

Etapas 1

Elución de XAD (K125-173)

Se filtraron diecisiete litros (17 l) de resina XAD-16 procedente del cultivo de fermentación usando una unidad de filtración Mainstream con una cesta de captura de trece litros y 150 µm. La resina XAD capturada se empaquetó en una columna Amicon VA250 y se lavó con 65 l (3,8 volúmenes de columna) de agua a 1,0 l/min. A continuación se eluyó el producto de la epotilona D de la resina usando 230 l de metanol al 80% en agua.

Etapas 2

Extracción en fase sólida (K125-175)

Se añadieron setenta y siete litros (77) al producto combinado de la etapa 1 (230 l) para diluir el disolvente de carga en metanol al 60% en agua. Se mezcló la suspensión resultante (307 l) y se cargó sobre una columna Amicon VA180 empaquetada con 5 l de resina HP20SS que se había equilibrado anteriormente con 5 volúmenes de columna de metanol al 60%. El caudal de carga fue de 1 l/min. Tras la carga, se lavó la columna con 13 l de metanol al 60% y se eluyó con 77 l de metanol al 75% a un caudal de 325 ml/min. Se recogieron treinta y una fracciones de 2,5 l. Se encontró que las fracciones 10-26 (42,5 l) contenían la epotilona D, y estas fracciones se combinaron entre sí.

Etapas 3

Cromatografía (K125-179)

Se evaporó el producto combinado de la etapa 2 hasta un aceite usando dos rotavapores de 20 l. Durante la evaporación fue necesario añadir etanol con el fin de minimizar el espumado. Se volvió a suspender el material seco en 1,0 l de metanol y se diluyó con 0,67 l de agua para preparar 1,67 l de una solución de metanol al 60%. Se cargó la solución resultante sobre una columna de cromatografía C18 de 1 l (55 x 4,8 cm) que se había equilibrado anteriormente con 3 volúmenes de columna de metanol al 60%. El caudal de carga tuvo un promedio de 64 ml/min. Se lavó la columna cargada con un litro de metanol al 60%, y se llevó a cabo la elución del producto de la epotilona D isocráticamente usando metanol al 70% a un caudal de 33 ml/min. Se recogieron un total de 27 fracciones, conteniendo la primera fracción 3,8 l en volumen. Esto fue seguido por tres fracciones de 500 ml y veintitrés fracciones de 250 ml. Se tomaron las fracciones 5-20 como el mejor combinado (K125-179-D) que contenía 4,8 g de epotilona D. las fracciones 3-4 (K125-

ES 2 332 727 T3

179-C) contenían 1,4 g de epotilona D. debido a que este combinado contenía también elevadas concentraciones de epotilona C, se dejó de lado para elaboración adicional (Etapa 3b).

Etapa 4

Cromatografía (K119-153)

Las fracciones de epotilona D que contenían también concentraciones importantes del análogo C se volvieron a cromatografiar en resina C18 como sigue. Una columna de 2,5 x 50 cm se empaquetó con resina C18, se lavó con 1 l de resina, metanol al 100%, y se equilibró con 1 l de metanol al 55% en agua a un caudal de 20 ml/min. La caída de presión fue de 125 psi ($8,62 \times 10^6$ N/m²). El material de partida (K125-179-C, 1040 ml) se diluyó con 260 ml de agua de manera que la disolución de carga contenía un 55% de metanol en agua. La disolución resultante (1300 ml) se introdujo sobre la resina, y se hicieron pasar a través de la columna 250 ml adicionales de metanol al 55%. La columna se eluyó por vez primera con 5 l de metanol al 65%, seguido por 3 l de metanol al 70% en agua. Durante la elución con metanol al 65%, se recogieron un total de cuarenta y ocho fracciones de 100 ml. Tras cambiar a un 70% de metanol, se recogieron un total de diez fracciones de 250 ml. La mejor combinación de epotilona D (K119-153-D), fue la constituida por las fracciones 50-58, conteniendo 1,0 g del producto deseado.

Etapa 5a

Cristalización (K119-158)

El material de partida para esta etapa fue una combinación de productos de cromatografía procedentes de las etapas 3 y 4. Inicialmente, se añadieron 120 ml de etanol a 7,9 g de sólidos conteniendo 5,5 g de epotilona D. Con suave mezclado, los sólidos se disolvieron completamente, y la disolución se transfirió a un matraz de 400 ml que se había colocado en una placa agitadora en una campana de humos. Se añadió una barrita agitadora de 1" (2,54 cm), y la disolución se agitó rápidamente. Entre tanto, se añadieron lentamente 100 ml de agua durante un periodo de aproximadamente 5 minutos. Cuando se observó la formación de cristales blancos pequeños, la disolución se agitó durante 15 minutos más hasta que la disolución se espesó con sólidos blancos. A continuación se retiró el matraz de la placa agitadora, se cubrió con papel de aluminio, y se colocó en una nevera (2°C) durante 12 horas. Los sólidos blancos se filtraron usando papel de filtro Whatman n° 50, y no se realizaron más lavados sobre esta primera cosecha. Los sólidos se colocaron en un cristizador y se secaron en un horno de vacío (40°C a 15 mbar) durante 1 hora. Posteriormente, el material se retiró del horno, se convirtió en partículas más finas, y se secó en el horno de vacío durante otras cuatro horas. El de cristalización produjo 3,41 g de sólidos color crema. Se usó el procedimiento HPLC de Epo1 para determinar la pureza cromatográfica del producto final. Los resultados del HPLC, junto con los correspondientes datos de RMN ¹H y ¹³C, todos confirmaron que el material seco contenía >95% de epotilona D. La recuperación de esta primera cosecha fue del 58%.

Etapa 5b

Cristalización (K119-167)

El material de partida para esta etapa fue el licor madre evaporado procedente de la etapa 5a. Inicialmente, se añadieron 70 ml de etanol y 30 ml de agua a 3,4 g de sólidos conteniendo 21 g de epotilona D. Esta disolución transparente se transfirió a un matraz, y se añadió 1 g de carbón activo decolorante. La mezcla se agitó en un medio ajustado durante 10 min. y a continuación se filtró usando un papel de filtro Whatman n° 50. El carbón activo se lavó con dos alícuotas de 10 ml alícuotas de etanol y se filtró de nuevo. El filtrado combinado se llevó a sequedad en un rotavapor, y los sólidos se volvieron a suspender en 50 ml de etanol. A continuación, la disolución resultante se colocó en un matraz de 250 ml, y con buena agitación, se añadieron lentamente 50 ml de agua. Para estimular la formación de cristales, se añadió a la mezcla una pequeña cantidad de cristales semilla (1 mg). Después de varios minutos de agitación, se observó la formación de sólidos blancos adicionales. Se estableció una corriente de nitrógeno para que burbujeara suavemente sobre la mezcla mientras continuaba la agitación. Tras 15 minutos, se colocó el matraz en la nevera a 2°C durante 36 horas. La mezcla se filtró usando un papel de filtro Whatman n° 50 para recoger los cristales, y se usaron 7 ml adicionales de etanol:agua 50:50 para lavar los cristales. Los cristales se secaron posteriormente en el horno de vacío durante 4 horas. Esta etapa de cristalización produjo 1,46 g de cristales blancos, que contienen >95% de epotilona D.

Lote de Fermentación 1117001K

Etapa 1

Elución de XAD (K125-182)

Se filtraron diecisiete litros (17 l) de resina XAD-16 procedentes del cultivo de fermentación usando una unidad de filtración Mainstream con una cesta de recogida de trece litros de 150 µm. La resina XAD capturada se empaquetó en una columna Amicon VA250 y se lavó con 58 l (3,4 volúmenes de columna) de agua a 1,0 l/min. El producto de epotilona D se eluyó a continuación de la resina usando 170 l de metanol al 80% en agua. Durante el lavado con agua y el primer volumen de columna de elución, la contrapresión en la columna aumentó estacionariamente hasta

ES 2 332 727 T3

por encima de 3 bares con un caudal final inferior a 300 ml/min. Por tanto, la resina XAD se retiró de la columna y se volvió a empaquetar en una columna Amicon VA250 alternativa. Tras el intercambio, la contrapresión descendió por debajo de 1 bar y el caudal se mantuvo a 1,0 l/min. Se recogió una única fracción de 170-l en un recipiente de acero inoxidable de 600 l. Basándose en el análisis por HPLC se encontró que la combinación de producto de la etapa 1 contenía 8,4 g de epotilona D.

Etapa 2

Extracción en fase sólida (K145-150)

Se añadieron cincuenta y siete litros (57 l) de agua a la combinación de producto de la etapa 1 (170 l) para diluir la carga de disolvente a metanol al 60% en agua. La suspensión resultante (227 l) se agitó con un mezclador de cabeza luminosa y se introdujo en una columna empaquetada Amicon VA180 con 6,5 l de resina HP20SS que se había equilibrado previamente con 5 volúmenes de columna de metanol al 60%. El caudal de carga fue de 1 l/min. Tras la introducción la columna se lavó con 16 l de metanol al 60% y se eluyó con 84 l de metanol al 75% con un caudal de 300 ml/min. Se recogieron siete fracciones con volúmenes de 18 l, 6 l, 6 l, 6 l, 36 l, 6 l, y 6 l, respectivamente. Las fracciones 4 y 5, que contenían un total de 8,8 g de epotilona D, se combinaron entre sí.

Etapa 3

Cromatografía (K145-160)

La combinación de producto de la etapa 2 se evaporó hasta un aceite usando dos rotavapores de 20 l. Para minimizar el espumado durante el procedimiento de evaporación, se añadieron 10 l de etanol a la mezcla. El material seco se volvió a suspender en 28 l de metanol y se diluyó con 3,4 l de agua para fabricar 6,2 l de una disolución de metanol al 45%. La disolución resultante se bombeó a una columna de cromatografía C18 de 1 l (55 x 4,8 cm) que se había equilibrado previamente con 5 volúmenes de columna de metanol al 45%. El caudal de carga fue de 100 ml/min en promedio. La columna cargada se lavó con un litro de metanol al 60%, el producto de epotilona D se eluyó de la resina usando un gradiente en etapas con un caudal de 100 ml/min. La columna se eluyó con 5 l de metanol al 55%, 11,5 l de metanol al 60%, y 13,5 l de metanol al 65%. Durante la elución con metanol al 55%, se recogieron un total de diez fracciones de 500 ml. Tras cambiar a metanol al 60%, se recogieron un total de veintitrés fracciones de 500 ml. Durante la elución final con metanol al 65%, se recogieron once fracciones de 500 ml seguido por ocho fracciones de 1 l. La mejor combinación de epotilona D pool (K145-160-D), constituida por las fracciones 28-50, contenía 8,3 g del producto deseado. Las fracciones 26-27 (K145-160-C), que estaban contaminadas con 0,4 g de epotilona C, contenían 0,2 g de epotilona D. Todas estas 25 fracciones se combinaron entre sí.

Para diluir la combinación de producto hasta un 40% de metanol en agua, se añadieron 9,5 l de agua a 15,8 l de la disolución de carga. La disolución resultante se bombeó a continuación a una columna de cromatografía C18 de 700 (9x10 cm) ml que se había equilibrado previamente con 4 volúmenes de columna de metanol al 40%. El caudal de carga promedio fue de 360 ml/min. La columna cargada se lavó con un litro de metanol al 40% y el producto de epotilona D se eluyó de la resina con 3,75 l de etanol al 100%. El eluyente se evaporó hasta sequedad usando un rotavapor. Los sólidos se volvieron a suspender en 100 ml de acetona, y el material no disuelto se eliminó por filtración de la solución usando un papel de filtro Whatman nº2. Las partículas filtradas se lavaron con se lavó con 115 ml adicionales de acetona y se filtraron una vez más. Tras la extracción de la acetona, se añadieron al filtrado combinado 2 g de carbón activo decolorante. La mezcla se agitó en un medio de ajuste durante 1 hora y se filtró usando un papel de filtro Whatman nº 50. El carbón activo se lavó con 180 ml de etanol y se filtró de nuevo. Los filtrados se combinaron entre sí y se rotaevaporaron hasta sequedad.

Etapa 4

Cromatografía (K119-174)

El material seco de la etapa 3 se resuspendió en 5,0 l de metanol al 50% en agua y se introdujo en una columna de cromatografía C18 de 1 l (55 x 4,8 cm) que se había equilibrado previamente con 3 volúmenes de columna de metanol al 50%. El caudal de carga fue de 80 ml/min en promedio. La columna posteriormente se lavó con un litro de metanol al 50%, y el producto de epotilona D se eluyó isocráticamente de la resina usando metanol al 70% con el mismo caudal. Se recogieron un total de 48 fracciones, conteniendo las primeras 47 fracciones 240 ml y conteniendo la última fracción 1 l. Las fracciones 25-48 se tomaron como la mejor combinación (K119-174-D) conteniendo 7,4 g de epotilona D. Las fracciones 21-24 (K119-174-C) contenían 1,1 g de epotilona D. Puesto que esta combinación también contenía elevadas concentraciones de epotilona C, se dejó de lado para volver elaboración posterior.

Etapa 5

Cristalización (K119-177)

Para realizar un intercambio de disolvente antes de la etapa de cristalización, se añadieron 3,9 l de agua a 6,4 l de la mejor combinación de epotilona D (K119-174-D) procedente de la etapa 5 para diluir la disolución de carga a un 40% de metanol en agua. La disolución resultante se introdujo a continuación en una columna de cromatografía C18 de

ES 2 332 727 T3

200 ml C18 cromatografía (2,5 x 10 cm) que se había equilibrado previamente con 3 volúmenes de columna de metanol al 40%. La columna cargada se lavó con 200 ml de metanol al 40%, y el producto de epotilona D se eluyó de la resina con 1 l de etanol al 100%. El eluyente se evaporó hasta sequedad usando un rotavapor, y los sólidos se volvieron a suspender en 150 ml de etanol al 100%. La disolución transparente se transfirió a un matraz, y con buena agitación, se añadieron 175 ml de agua lentamente. También se añadió a la disolución un pequeño cristal semilla (1 mg) para estimular la formación de cristales. Cuando se observó la formación de cristales blancos pequeños, la disolución se agitó durante 15 minutos más hasta que la disolución se espesó con sólidos blancos. A continuación se retiró el matraz de la placa agitadora, se tapó con papel de aluminio, y se colocó en una nevera (2°C) durante 12 horas. Los sólidos blancos se filtraron usando papel de filtro Whatman n° 50, y no se realizaron más lavados sobre esta primera cosecha. Los sólidos se colocaron en un cristalizador y se secaron en un horno de vacío (40°C a 15 mbar) durante 6 horas. El procedimiento de cristalización produjo 6,2 g de sólidos blancos, que contenían >95% de epotilona D. La recuperación de esta primera cosecha fue del 74%.

Resultados

La recuperación de la epotilona D del lote 1031001K fue de 4,8 g de material cristalino con una pureza de aproximadamente 97,5-98,8%. La recuperación de la epotilona D del lote 1117001K fue de 6,2 g de material cristalino con una pureza de aproximadamente 97,7%. El perfil de impurezas de estos lotes se muestra en la Tabla 12.

TABLA 12

Lote 1031001K	Etapas	Producto	Epo C	Epo490	Epo D
	2	SPE	23	4	74
	3-4	Total Crom	0,7	0,7	90,6
	5a	Cristalización	1,0	1,0	97,5
	5b	Cristalización	0,7	0,5	98,8
Lote 1117001K	Etapas	Producto	Epo C	Epo490	Epo D
	2	SPE	18	2	60
	3	C18 Crom.	52	1,6	81,4
	4	C18Crom.	1,6	1,8	96,6
	5	Cristalización	0,8	1,4	97,7

“Epo490” es un compuesto novedoso de epotilona de la invención, la 10,11-dehidro-epotilona D, producida por las células huésped *Myxococcus*.

Esta metodología de purificación surge de los esfuerzos de las modificaciones de escalado realizadas sobre el procedimiento de purificación de la epotilona D para acomodar el uso de oleato de metilo en el medio de fermentación. La elución del producto de epotilona D a partir de la resina XAD se llevó a cabo de una manera directa. En lugar de usar metanol al 100%, se usaron 10 volúmenes de columna de metanol al 80% para eluir el producto de las perlas de la columna. Durante la etapa de elución de XAD, se notó que la presencia de células lisadas en el caldo de fermentación podía contribuir al taponamiento de las columnas de purificación. La cosecha del lote de fermentación 103100-1K se realizó antes de que hubiera tenido lugar una lisis celular significativa. El lote de fermentación 111700-1K se cosechó únicamente después de haberse producido una lisis celular considerable. Sin embargo, durante el procedimiento de elución, se observaron únicamente en el último lote una elevada contrapresión y un caudal bajo. Por tanto, es posible que las células lisadas de este lote puedan haberse agregado y posteriormente ensuciado el filtro de columna.

Estos lotes de purificación demuestran que epotilona D es estable a temperatura ambiente en metanol al 80% durante al menos un día. Basándose en análisis mediante HPLC, no se puede detectar la degradación del producto en estas condiciones. Este hallazgo permite el almacenamiento del producto combinado de 170 l procedente de la etapa de elución de XAD en un recipiente de acero inoxidable de 600 l durante toda la noche sin refrigeración. Para mejorar adicionalmente el procedimiento, se empleó una columna de intercambio de disolvente que consume mucho menos tiempo y mano de obra que el uso de un rotavapor en la concentración del volumen de la combinación de productos. Por tanto, se puede sustituir la rotoevaporación a gran escala por una etapa de intercambio de disolvente.

Aunque queda una cantidad significativa de aceite unido a la resina durante la etapa de elución de XAD, seguía estando presente una cantidad mensurable en el eluyente. Incluso después de la extracción en fase sólida de HP20SS, las gotas de aceite eran claramente visibles en la combinación de producto y demostró ser problemática durante la cromatografía con la C18. Para un rendimiento óptimo de la cromatografía, la concentración de epotilona D en la disolución de carga debe mantenerse por debajo de 2 g/l. A concentraciones más elevadas, el material de partida tiene tendencia a desprender el aceite de la columna.

La cristalización no fue posible cuando se alimentó material que contenía más de un 3% bien de epotilona C o de epo490. Éste fue el caso durante la purificación de 1117001K. La primera etapa de la cromatografía dio un producto que contenía un 5% de epotilona C. Tras numerosos intentos, no se consiguió la cristalización de este material. Sin embargo, llevando este material a una segunda etapa de cromatografía redujo la epotilona C al 1% generó un material de alimentación que cristalizó fácilmente.

Ejemplo 4

Construcción de una cepa de Myxococcus con un gen epoK no funcional

Se construyó la cepa K111-40-1 a partir de la cepa K111-32.25 mediante inactivación insercional del gen *epoK*. Para construir este mutante *epoK*, se insertó un casete de resistencia a la kanamicina en el gen *epoK*. Esto se llevó a cabo aislando el fragmento de 4879 bp procedente de pKOS35-79,85, que contiene *epoK*, y ligándolo en el emplazamiento *NotI* de pBluescriptSKII+. Este plásmido, pKOS35-83,5, se rompió parcialmente con *ScaI*, y el fragmento de 7,4 kb se ligó con el fragmento de 1,5 kb de *EcoRI*-*BamHI* conteniendo el gen de resistencia a la kanamicina procedente de pBJ180-2, que tiene los extremos del ADN enromados con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, para dar el plásmido pKOS90-55. Finalmente, el fragmento de ~400 bp RP4 oriT procedente de pBJ183 se ligó en los emplazamientos *XbaI* y *EcoRI* para crear pKOS90-63. Este plásmido se linealizó con *DraI* y se electroporó en la cepa K111-32.25 de *Myxococcus xanthus*, y se seleccionaron transformantes para proporcionar la cepa K111-40.1 de *M. xanthus*. La cepa K111-40.1 se depositó de acuerdo con el Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209, EEUU el 21 de Nov. de 2000, y está disponible con el número de acceso N° PTA-2712.

Para crear una mutación *epoK* sin marca, el pKOS35-83,5 se rompió con *SauI* y los fragmentos de 2,9 kb y 4,3 kb se unieron entre sí. Este plásmido, pKOS90-101, tiene una delección en el marco en *epoK*. A continuación, el fragmento de 3 kb *BamHI* y *NdeI* procedente de KG2, que tiene los extremos del ADN enromados con el fragmento Klenow de la polimerasa I y contiene los genes de resistencia a la kanamicina y *galK*, se ligó en el emplazamiento *DraI* de pKOS90-101 para crear pKOS90-105. Este plásmido se electroporó en K111-32.25 y se seleccionaron los electroporantes con resistencia a la kanamicina. Para sustituir la copia de tipo natural de *epoK* con la delección, el segundo episodio de recombinación se seleccionó por crecimiento en placas de galactosa. Estas colonias resistentes a la galactosa se ensayaron para la producción de epotilona C y D, y una cepa productora se designó como K111-72,4,4 y se depositó de acuerdo con el Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209, EEUU el 21 de Nov. de 2000, y está disponible con el número de acceso N° PTA-2713.

REIVINDICACIONES

1. Epotilona D cristalina.

5

2. Procedimiento para obtener epotilona D en forma cristalina que comprende cristalizar epotilona D a partir de un sistema disolvente binario en el que el agua es el disolvente forzador.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sistema disolvente binario es etanol y agua.

10

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la epotilona D en forma cristalina tiene una pureza superior al 95%.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

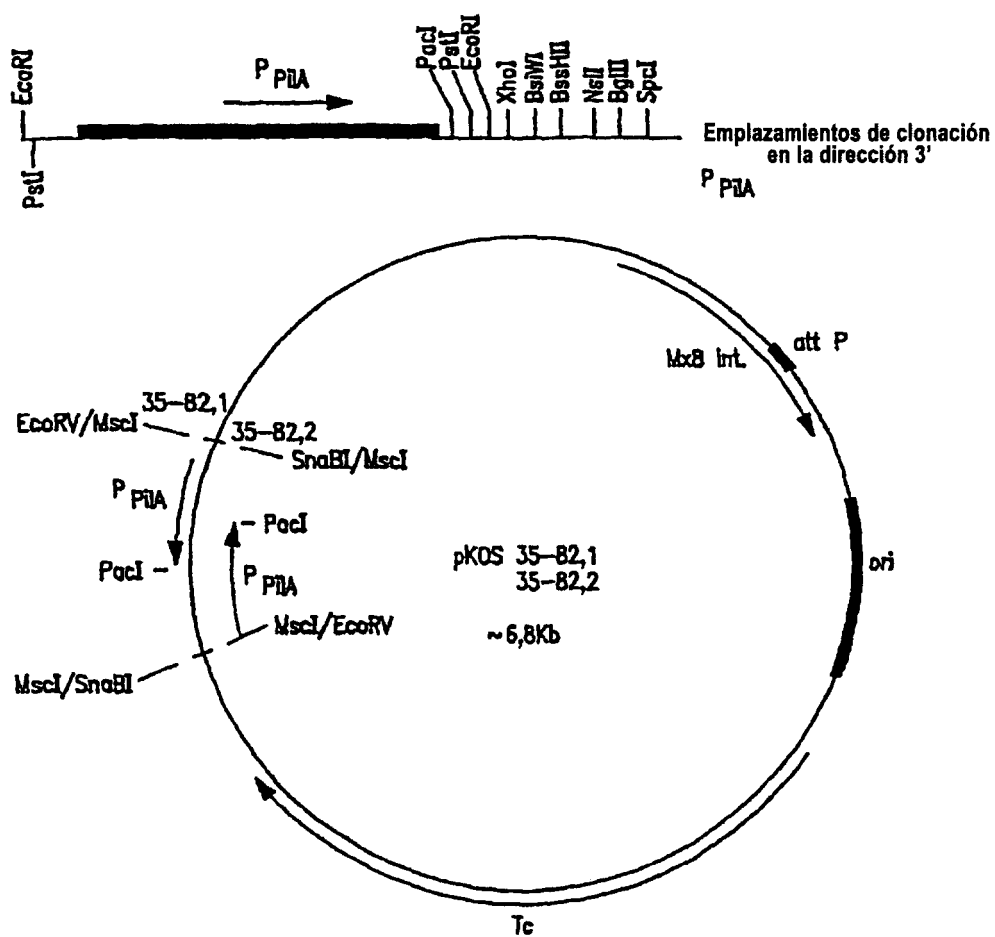


FIGURA 1

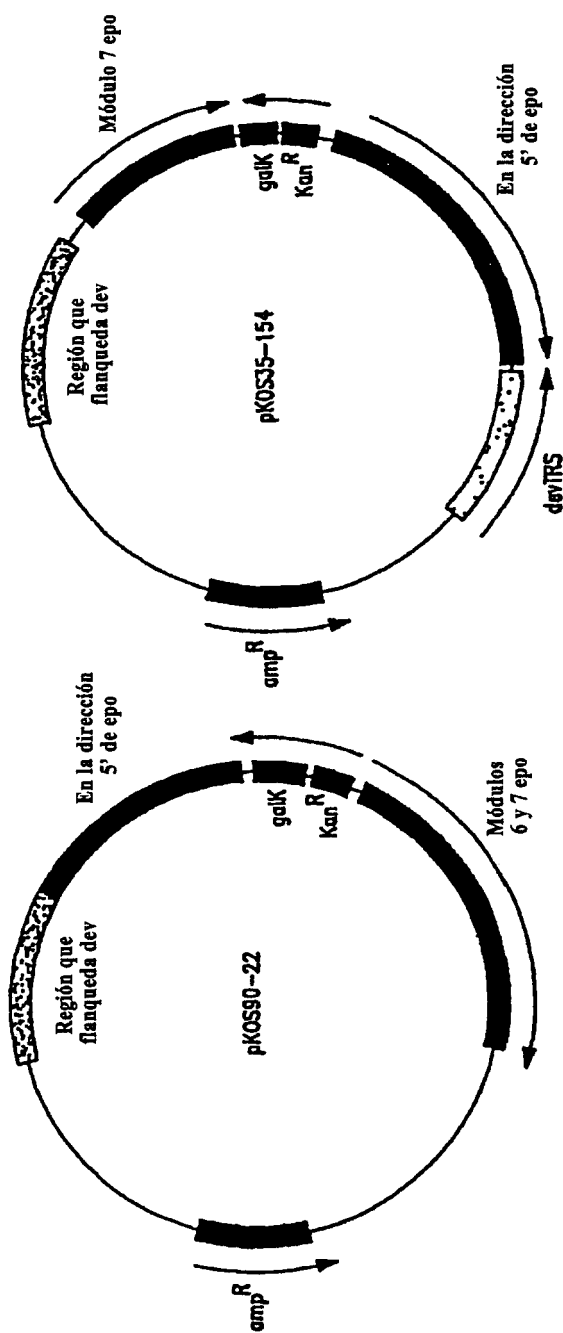


FIGURA 2

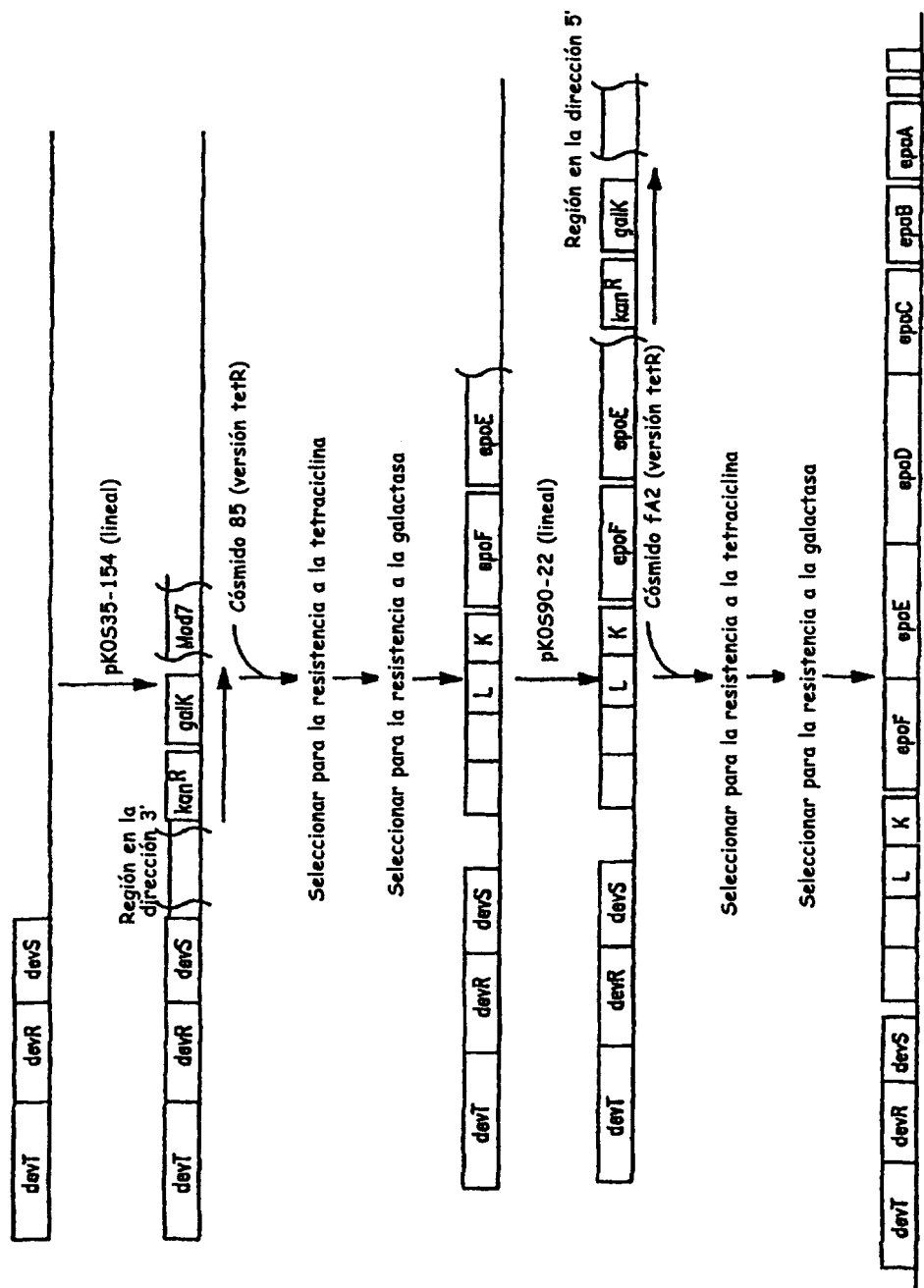


FIGURA 3

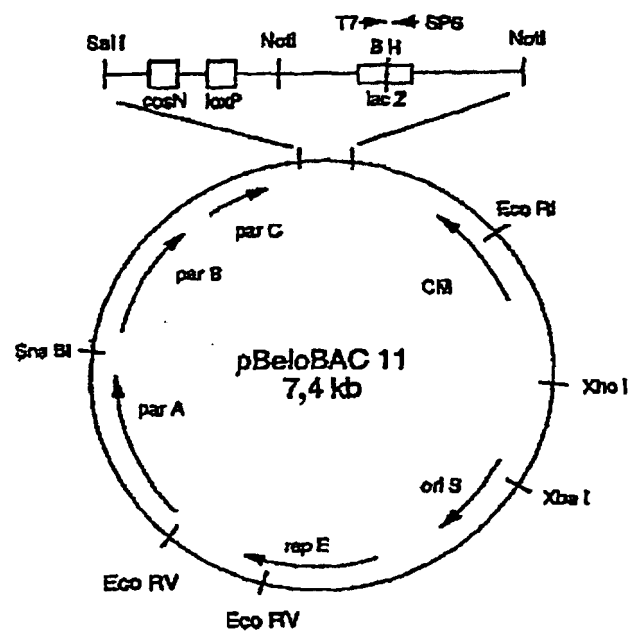


FIGURA 4

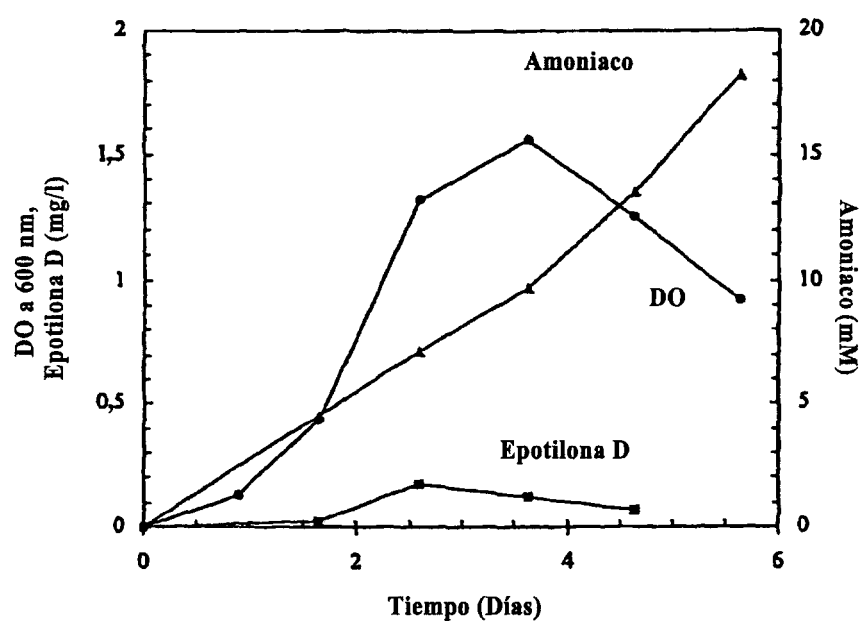


FIGURA 5

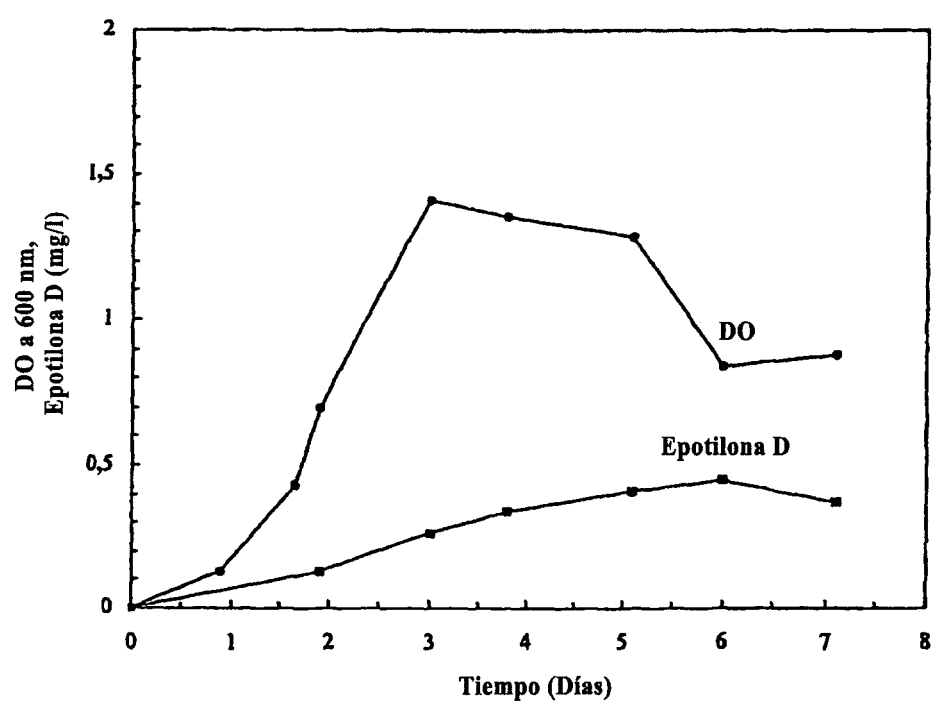


FIGURA 6

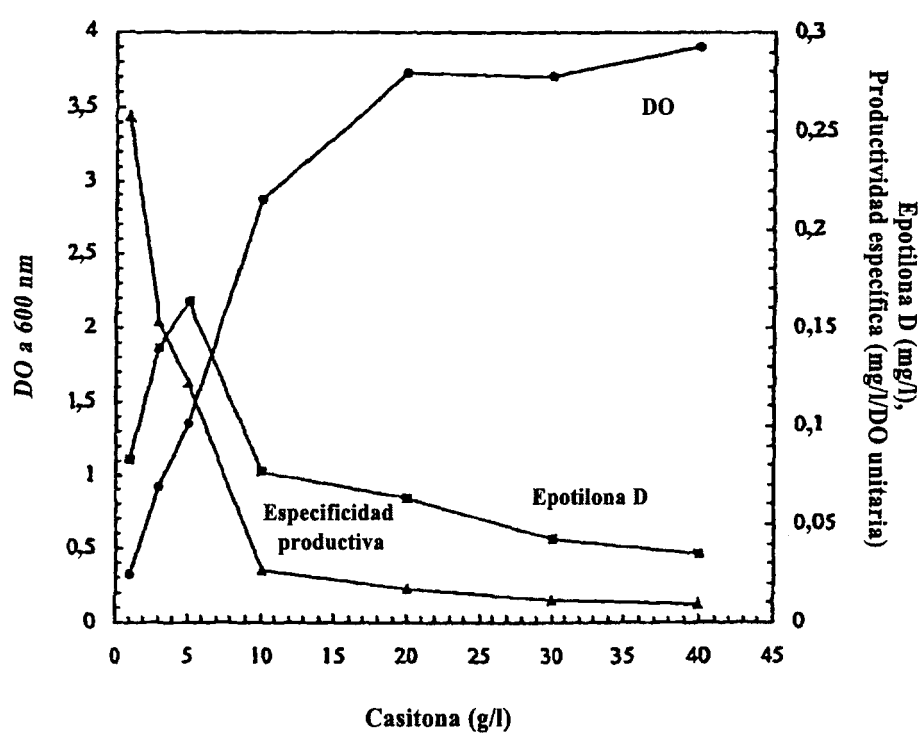


FIGURA 7

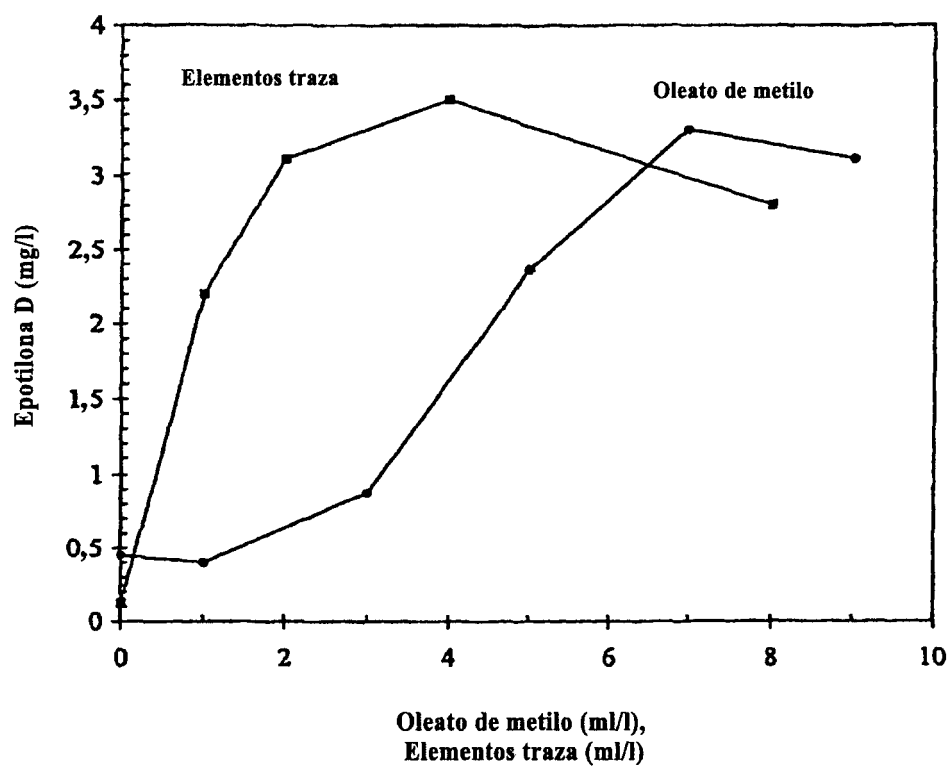


FIGURA 8

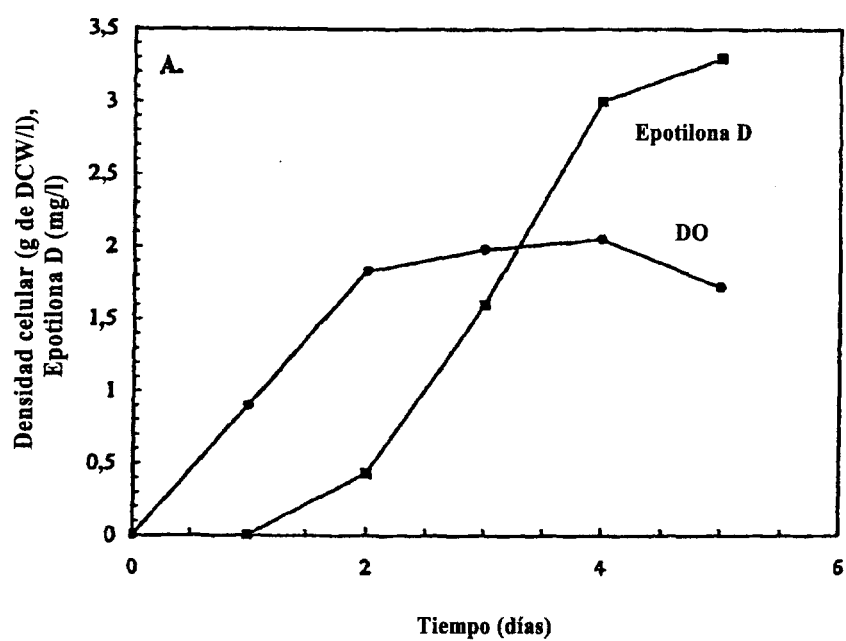


FIGURA 9A

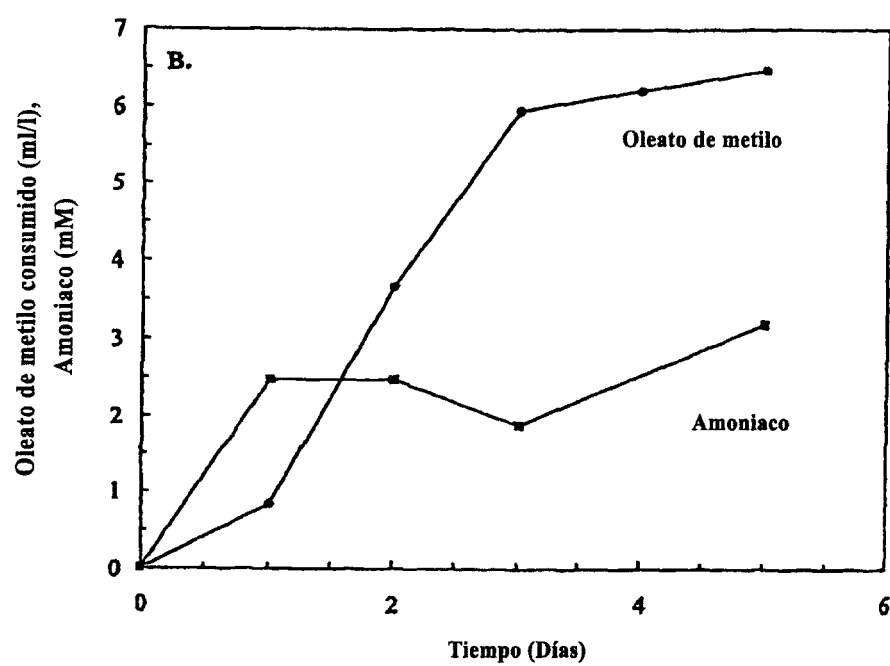


FIGURA 9B

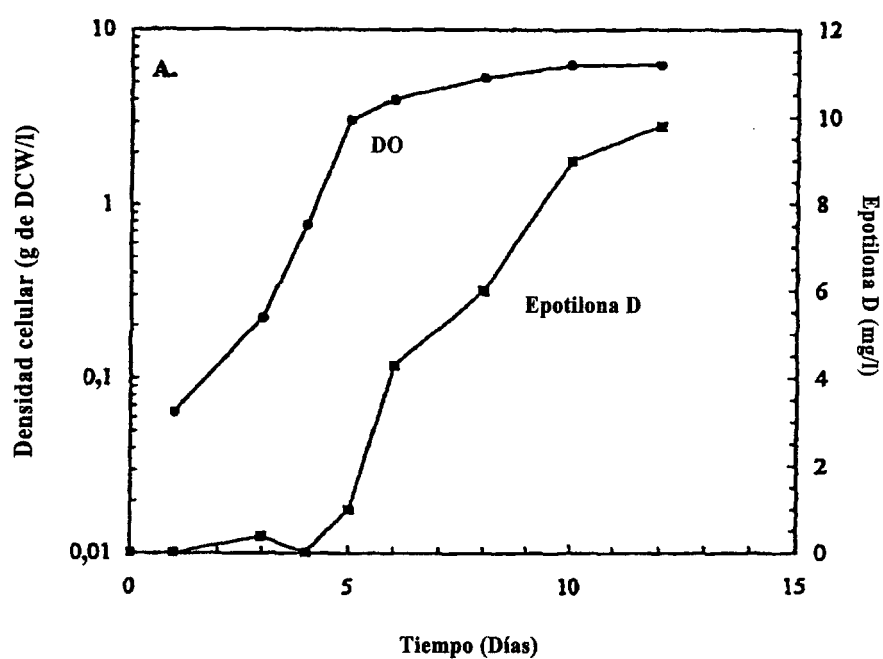


FIGURA 10A

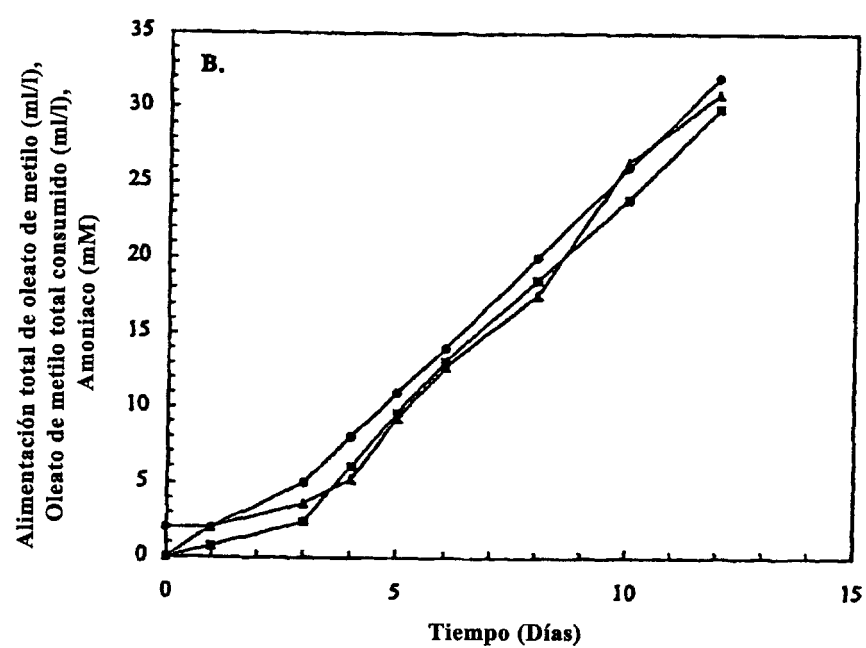


FIGURA 10B

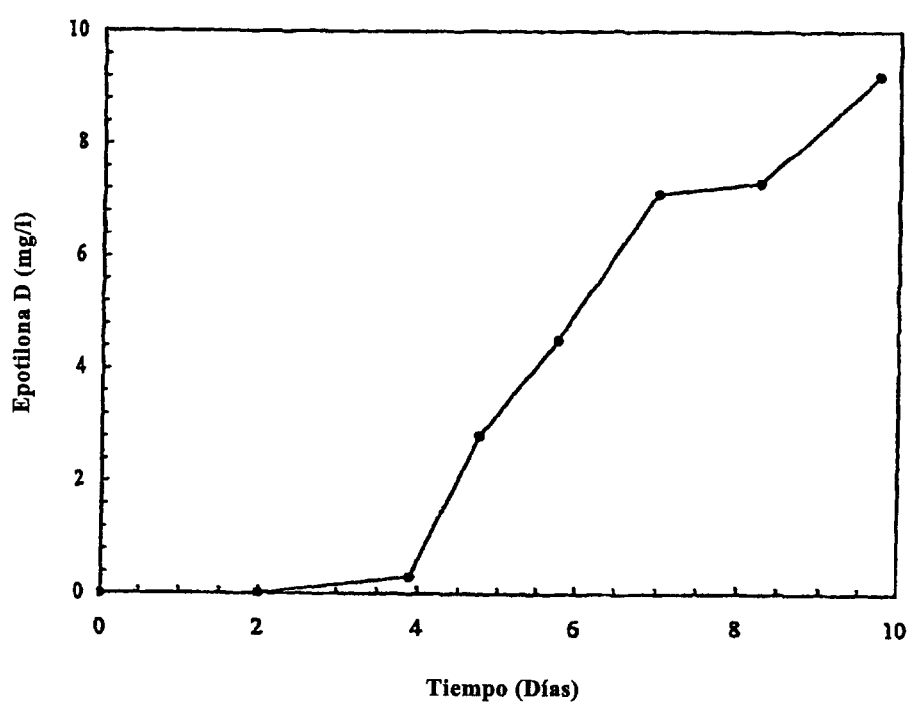


FIGURA 11

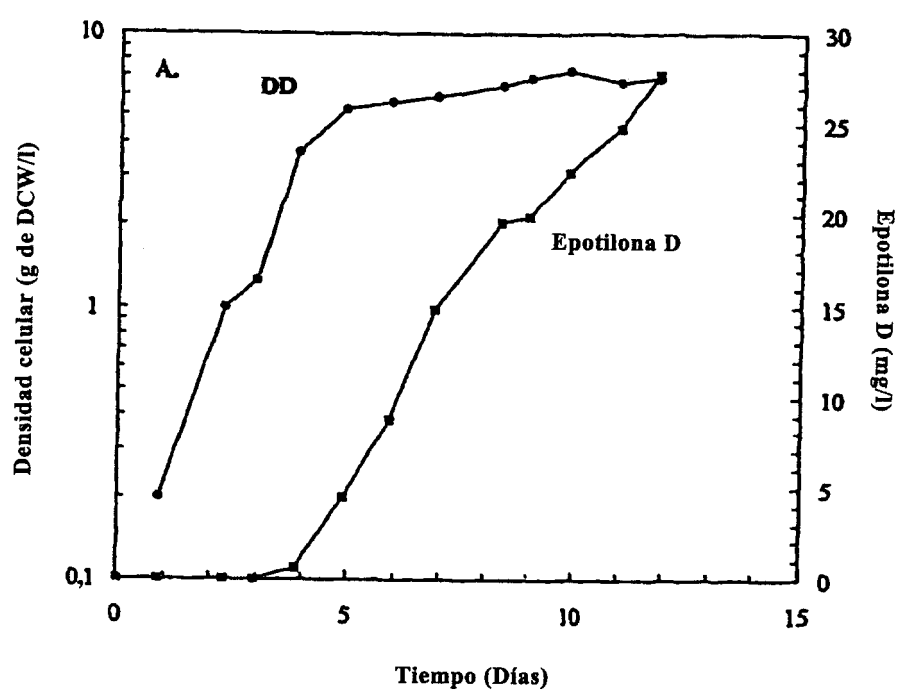


FIGURA 12A

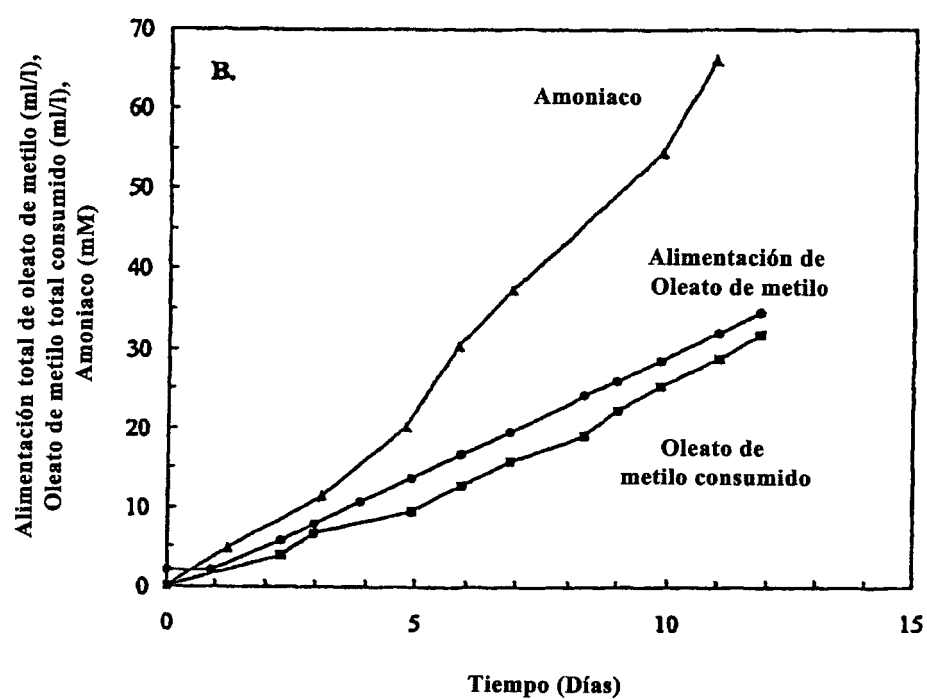


FIGURA 12B