

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.08.24	(73) Titular(es): W.C. HERAEUS GMBH 12-14, HERAEUSSTRASSE D-63 450 HANAU DE
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.04.01	(72) Inventor(es): MICHAEL LAMBERT DE KRISTIINA YLIHONKO FI MARIA HOLMBAECK FI
(45) Data e BPI da concessão: 2010.02.03 055/2010	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA PT AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA

(54) Epígrafe: **ESTIRPES DE STREPTOMYCES MODIFICADAS GENETICAMENTE PARA BIOTRANSFORMAÇÕES NA PRODUÇÃO DE ANTRACICLINAS**

(57) Resumo:

Resumo**“Estirpes de *Streptomyces* modificadas geneticamente para
biotransformações na produção de antraciclinas”**

Uma estirpe microbiana que converte metabolitos de antraciclinas em antibióticos antraciclínicos não naturais.

Um processo para a conversão de metabolitos de antraciclinas em antibióticos antraciclínicos que utiliza uma estirpe microbiana.

Descrição

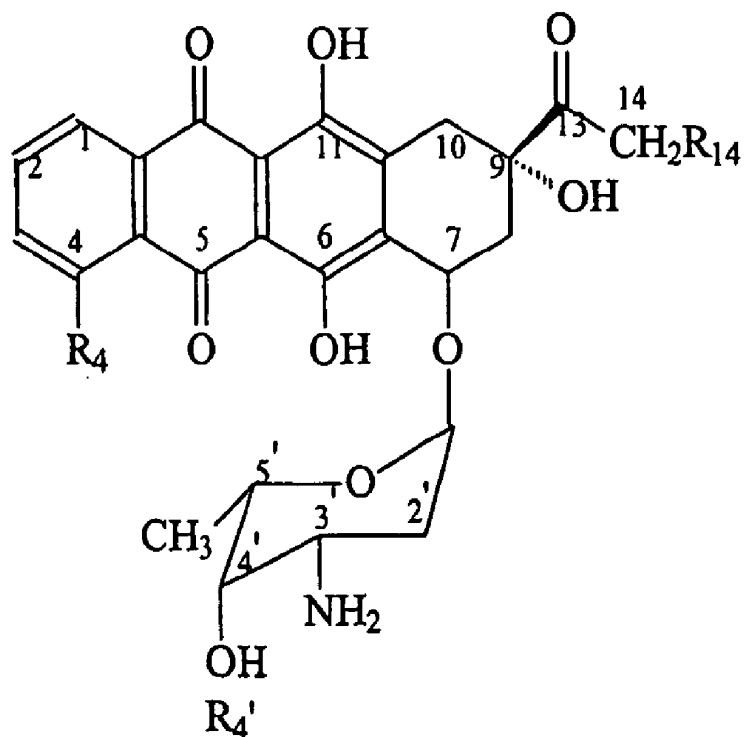
"Estirpes de *Streptomyces* modificadas geneticamente para biotransformações na produção de antraciclinas"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a estirpes microbianas do género *Streptomyces* que foram melhoradas e à sua utilização num processo de biotransformação para melhorar os rendimentos em antibióticos de antraciclinas anti-tumorais, particularmente epirrubicina e idarrubicina.

Antecedentes da Invenção

As daunomicinas são um grupo de antibióticos anti-tumorais produzidos por diferentes *Streptomyces* sp., tais como *S. peucetius*, *S. coerulorubidus*, *S. griseus*, *Streptomyces* sp. C5, *S. peucetius* var. *caesius* e *S. bifurcus*. O composto básico do grupo é a daunomicina (DiMarco et al., 1964). As daunomicinas podem ser descritas através da fórmula geral I.



Os seus derivados mais importantes são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1

	R ₄	R ₁₄	Outros	Nº CAS
Daunorrubicina	OCH ₃	H		20830-81-3
Epirrubicina	OCH ₃	OH	isómero 4'epi	56420-45-2
Epidaunorrubicina	OCH ₃	H	isómero 4'epi	56390-08-0
13-DHED	OCH ₃	H	isómero 4'epi R ₁₃ = OH	
Idarrubicina	H	H		58957-92-9

Os derivados semi-sintéticos da daunorrubicina, epirrubicina e idarrubicina poderiam ser classificados como

antibióticos antraciclínicos não naturais, uma vez que as estirpes que ocorrem naturalmente não produzem estas antraciclinas. A epirrubicina é utilizada clinicamente em muitos tipos de cancro. O mercado está a crescer à medida que compete com a doxorrubicina. Novas formulações, conjugados e novas combinações com outros fármacos anti-cancerígenos também contribuem para o aumento na utilização da epirrubicina. A epirrubicina é fabricada por um processo que compreende a produção de daunorrubicina por fermentação e a modificação de forma sintética do grupo aglicona e açúcar, revelada p. ex. na Patente US 5 874 550.

A idarrubicina (4-demetoxi-daunorrubicina) é utilizada no tratamento de certos tipos de cancro, incluindo leucemia, linfoma e outras doenças da medula óssea. Tem-se defendido que provoca menos efeitos secundários do que a doxorrubicina. O mercado anual global para a idarrubicina não ultrapassa, porém, os 20 kg, presumivelmente devido ao seu preço excepcionalmente elevado, uma consequência de um processo de fabrico muito complicado. A idarrubicina é fabricada a partir da daunomicina, resultante da fermentação da daunorrubicina seguida de uma hidrólise ácida. A daunorrubicinona é posteriormente modificada de forma sintética obtendo-se a idarrubicinona. Um resíduo de açúcar, a daunosamina, é ligado por meio de uma série complicada de reacções sintéticas, como se descreve, p. ex., na Patente US 4 325 946.

Na produção por fermentação de antraciclinas importantes tais como daunorrubicina e epidaunorrubicina, os compostos intermediários acumulam-se no caldo de fermentação. Um intermediário típico em ambos os casos é a ϵ -rodomicinona (Strohl et al. 1989). Contudo, como a epidaunorrubicina pode ser produzida por fermentação usando-se uma estirpe geneticamente modificada, a 13-dihidro-epidaunorrubicina

(designada por 13-DHED) acumula-se simultaneamente no caldo de fermentação. Tipicamente, estes metabolitos são considerados como produtos sem valor. A Patente US 5 652 125 revela a utilização de ϵ -rodomicinona para produzir daunorrubicina e Dickens *et al.* (1997) descreveram a oxidação de 13-dihidro-antraciclinas nas suas formas 13-ceto. Não se conseguiu descobrir publicações que descrevam a biotransformação em processos para a produção de antraciclinas não naturais.

Descobrimos um novo processo para se obter rendimentos mais elevados de antraciclinas não naturais comercialmente importantes, epirrubicina e idarrubicina, a custos mais baixos por meio da utilização de produtos secundários obtidos na produção por fermentação de daunomicina e epidaunorrubicina.

Descrição Resumida das Figuras

A Figura 1 é uma representação esquemática da via biossintética para a classe das daunomicinas que pertence à família das antraciclinas.

A Figura 2 é uma representação esquemática do processo de produção de epirrubicina e idarrubicina de acordo com a presente invenção.

A Figura 3 é um cromatograma que mostra o perfil de produção de uma estirpe de biotransformação de acordo com a presente invenção após alimentação com 4-deoxi- ϵ -rodomicinona.

Tr (tempo de retenção) = 6,0 : 13-dihidro-idarrubicina, Tr = 6,9 : Idarrubicina, Tr = 8,1 : 13-deoxi-idarrubicina, Tr = 11,0 : 4-deoxi- ϵ -rodomicinona.

Descrição Resumida da Invenção

A presente invenção refere-se a uma estirpe microbiana do género *Streptomyces*, que converte metabolitos de antraciclinas, tais como epidaunorrubicina, 13-dihidroepidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina e ϵ -rodomicinona, em antibióticos antraciclínicos não naturais, tais como epirrubicina e idarrubicina. De preferência, essas estirpes são seleccionadas a partir da espécie *Streptomyces peucetius* e, mais preferencialmente, a partir da subespécie *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Na presente invenção, a referida estirpe apresenta um bloqueio ao nível da biossíntese de daunomicinas naturais e contém um gene heterólogo de resistência *snorO*, isolado a partir da espécie *Streptomyces nogalater*.

A presente invenção refere-se igualmente a um processo para a conversão de metabolitos de antraciclinas, tais como 13-dihidroepidaunorrubicina e ϵ -rodomicinona, em antibióticos antraciclínicos não naturais, tais como epirrubicina e idarrubicina usando uma estirpe microbiana de acordo como a presente invenção. Numa forma de realização preferida de acordo com a presente invenção, usa-se no referido processo uma resina, preferencialmente seleccionada a partir do grupo que consiste em adsorventes iónicos e não iónicos, mais preferencialmente a partir de poliestirenos e, mais preferencialmente, a partir do grupo que consiste em XAD-7 e Diaion HP-20, em qualquer momento para adsorver os metabolitos de antraciclinas ou antibióticos antraciclínicos.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se a estirpes melhoradas de *Streptomyces*, que conseguem converter intermediários de antraciclinas modificados em fármacos antraciclínicos anti-cancerígenos importantes, a idarrubicina e a epirrubicina. As referidas estirpes são úteis num processo para converter os metabolitos de antraciclinas nos produtos finais.

É, portanto, um objectivo da presente invenção fornecer uma estirpe melhorada de *Streptomyces*, modificada para conseguir realizar a conversão, de forma estável, de 4-deoxi- ϵ -rodomicinona em idarrubicina a uma taxa elevada. Essa estirpe, que apresenta um bloqueio que a impede de produzir daunorrubicina, foi derivada da estirpe G001 (DSM 12245) conforme descrito no Exemplo 1 (a estirpe G001 foi derivada por mutagénese do tipo selvagem *S. peucetius* var. *caesius* ATCC 27952). Esta estirpe mutante melhorada derivada da estirpe G001 consegue converter 4-deoxi- ϵ -rodomicinona em idarrubicina, mas a repetibilidade foi fraca. Para melhorar a conversão, introduziram-se genes de resistência nesta estirpe.

O gene *snorO* foi isolado a partir de *S. nogalater* (ATCC 27952) e estudos sugerem que é responsável pela resistência à nogalamicina (Torkkell, 2001). Com base na análise de sequência e no produto génico, *SnorO* é um produto génico multifuncional que confere resistência, com domínios para as proteínas de reparação por excisão UVrA e as proteínas de ligação ao ATP, os transportadores ABC. A expressão heteróloga de *snorO* em *S. lividans* TK24 revelou que o gene protegia a estirpe de todas as antraciclinas diferentes que foram testadas, nogalamicina, aclarrubicina e daunorrubicina. A introdução do gene *snorO* na estirpe melhorada derivada de

G001 veio proporcionar uma nova estirpe de biotransformação, que apresenta uma maior resistência à idarrubicina. Surpreendentemente, quando o gene *snorO* é introduzido na estirpe melhorada derivada de G001 no vector de *E. coli*, observa-se uma melhor taxa de conversão e uma estabilização da estirpe, mantendo-se uma conversão com um nível máximo de variação de $\pm 10\%$, mesmo após seis sequências de cultivo.

A referida nova estirpe de biotransformação pode ser alimentada com intermediários de antraciclinas naturais tais como aclavinona e ϵ -rodomicinona e formam-se antraciclinas naturais, as daunomicinas.

Surpreendentemente, a estirpe consegue realizar a conversão de metabolitos não naturais e a alimentação com 4- deoxi- ϵ -rodomicinona não natural resultou na formação de idarrubicina. Além disso, a estirpe consegue converter 13-DHED em epidaunorrubicina. É apresentada a conversão sintética de ϵ -rodomicinona em 4-deoxi- ϵ -rodomicinona. De acordo com a presente invenção, 4-deoxi- ϵ -rhodomicinona é subsequentemente biotransformada em idarrubicina pela nova estirpe de biotransformação acima mencionada, que não produz metabolitos de daunomicinas. 13-DHED foi ainda convertido em epidaunorrubicina por biotransformação usando-se a mesma estirpe mutante.

Os aspectos importantes da estirpe de biotransformação adequada para utilização na presente invenção são:

i) a estirpe aceita substratos naturais e não naturais para conversão;

ii) a estirpe apresenta um aumento na resistência contra antraciclinas naturais e não naturais;

iii) a estirpe realiza as funções essenciais necessárias para a conversão e

iv) a estirpe não acumula quantidades detectáveis de daunomicinas naturais.

Qualquer estirpe adequada de *Streptomyces* pode ser utilizada para a biotransformação do composto intermediário 4-deoxi semi-sintético em idarrubicina. É essencial, porém, que a estirpe possua genes endógenos ou transferidos expressáveis para as seguintes reacções: modificações de glicose para formar daunosamina, actividade de 10-esterase para remover um grupo metilo com a actividade de 10-decarboxilase associada, actividade de 13-oxigenase e actividade de glicosil transferase adequada. Além disso, o processo de purificação do produto (*downstream processing*) após a biotransformação só é rentável caso não ocorra nenhuma acumulação ou caso ocorra apenas uma acumulação em quantidades reduzidas de metabolitos de antraciclinas naturais pela estirpe utilizada como estirpe hospedeira na biotransformação.

É vantajoso utilizar um mutante de *S. peucetius* var. *caesius* que contenha um bloqueio nas primeiras fases da biossíntese das daunomicinas; preferencialmente um mutante com um bloqueio na PKS mínima (a policétido sintase mínima, do inglês *minimal poliketide synthase*, catalisa as primeiras reacções, montagem de policétidos em antraciclinas e outras vias de policétidos Tipo II).

A nova estirpe de biotransformação derivada do tipo selvagem de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC 27952 conforme acima descrito é uma estirpe extremamente preferida, mas qualquer estirpe que possua igualmente as seguintes características é adequada para o processo de conversão de acordo com a presente invenção.

1. Possuir um bloqueio nas etapas iniciais da via biossintética das daunomicinas. Disrupção do gene *dpsG* da PKS mínima (dados não apresentados) baseada em experiências de complementação no gene correspondente.

2. Não produzir quantidades detectáveis de daunomicinas, mas acumular uma substância amarela ácida num meio sólido. Desconhece-se a estrutura do composto, mas não é um membro da família das antraciclinas

3. Em placas com ISP4+tsr e ISP2+tsr, a estirpe de biotransformação não apresenta normalmente esporulação e forma hifas incolores aéreas.

4. Expressar resistência a várias antraciclinas diferentes em consequência da função do gene *snorO*.

5. Converter a 4-deoxi- ϵ -rodomicinona em dois produtos principais: idarrubicina e 13-dihidroidarrubicina. Encontram-se outros metabolitos de idarrubicina em pequenas quantidades.

A presente invenção refere-se ainda a um processo para a produção de antibióticos antraciclínicos não naturais, epirrubicina e idarrubicina, explorando produtos produzidos na via biossintética, a ϵ -rodomicinona formada na produção de daunorrubicina e epidaunorrubicina por fermentação e a 13-DHED formada na produção de epidaunorrubicina por fermentação.

É, portanto, um objectivo adicional da presente invenção apresentar um processo para a preparação de antibióticos antraciclínicos comercialmente úteis por biotransformação, utilizando uma estirpe bacteriana hospedeira melhorada de acordo com a presente invenção. De preferência, essa estirpe hospedeira é a nova estirpe de biotransformação acima descrita, derivada de *S. peucetius* var. *caesius*.

Sabe-se, na área, que a idarrubicinona pode ser convertida em idarrubicina por uma série de processos de síntese química complicados, conforme descrito p. ex. na Patente US 7 053 191. No processo de acordo com a presente invenção uma série de reacções biossintéticas endógenas de uma estirpe bacteriana é utilizada para converter 4-deoxi- ϵ -rodomicinona em idarrubicina. Sabe-se que a biossíntese se processa de acordo com a sequência apresentada na Fig. 1. A aclavinona, um precursor usual de várias antraciclinas, é 11-hidroxilada para originar ϵ -rodomicinona, que é glicosilada. As modificações na posição 10 são necessárias para uma forma glicosilada, apesar de outros resíduos de açúcar, tais como rodosamina, serem aceites como substratos. Após modificações no C-10, ocorre uma oxigenação no C-13 e o passo final para a biossíntese de daunorrubicina é uma O-metilação no C-4. Surpreendentemente, as últimas modificações no C-10 e no C-13, assim como a glicosilação foram bem sucedidas apesar da forma 4-deoxi. Tanto 4-deoxiaclavinona como 4-deoxi- ϵ -rodomicinona são convertidas em idarrubicina usando-se uma estirpe de biotransformação adequada. Contudo, os produtos génicos que catalisam estas modificações necessitam de um substrato em que o substituinte no C-10 é um grupo COOCH_3 -.

A ϵ -rodomicinona, obtida como um produto de uma via alternativa num processo de fermentação de metabolitos da daunomicina, é processada em 4-deoxi- ϵ -rodomicinona por síntese química. Existem várias vias sintéticas que podem ser utilizadas para remover um grupo hidroxilo da posição 4 da ϵ -rodomicinona. Contudo, preferimos realizar as quatro series de reacções, a começar pela protecção dos grupos hidroxilo no C-7 e C9 por catalisação. A seguir, ocorre a activação com trifluorometanosulfonilo (*Trifyl*) do grupo OH, aqui designada por trifilação, seguido da redução para remover o

substituente no C-4. Após cada etapa o produto é isolado ou purificado por precipitação/cristalização e obtêm-se um rendimento global > 20%, preferencialmente > 30%, mais preferencial > 40%. O grau de pureza da 4-deoxi- ϵ -rodomicinona obtida neste processo é > 60%, preferencialmente > 80%, mais preferencialmente > 90%, sendo um substrato adequado para a biotransformação. A ϵ -rodomicinona acumula-se normalmente no caldo de fermentação em quantidade elevadas e a purificação por métodos convencionais é bem sucedida. A conversão sintética da ϵ -rodomicinona produz > 20%, preferencialmente > 30%, mais preferencialmente > 40% de 4-deoxi- ϵ -rodomicinona pura, que é adicionada à estirpe mutante de *S. peucetius* var. *caesius* incapaz de a produzir. A eficiência da biotransformação da 4-deoxi- ϵ -rodomicinona em idarrubicina foi > 20%, preferencialmente > 30%, mais preferencialmente > 40%. Conseguiu-se adicionar mais do que 100 mg do intermediário semi-sintético a um litro de cultura da estirpe de biotransformação. O momento exacto em que se adiciona o intermediário não é muito importante. Podem utilizar-se quaisquer condições de fermentação que possibilitem o crescimento de estreptomicetos e o metabolismo secundário, mas é vantajoso utilizar o meio de cultura E1 e intervalos de temperatura e de pH compreendidos entre 25 e 35 °C e 6 e 8, respectivamente.

A recuperação da idarrubicina a partir da cultura pode ser efectuada usando-se qualquer método adequado, tal como a centrifugação, filtração ou usando-se um adsorvente iónico ou não iónico adequado. Para a inserção da idarrubicina, pode utilizar-se qualquer solvente orgânico solúvel em água, embora se prefiram os álcoois acídicos. As agliconas são removidas usando extracção ácida, após a qual os glicósidos são extraídos da fase de água para a fase de clorofórmio em

pH elevado. Dependendo do perfil dos compostos após a evaporação do último extracto, a idarrubicina é finalmente purificada por cristalização ou, preferencialmente, por cromatografia e cristalização. É vantajoso utilizar uma coluna de sílica para a purificação.

Conversão de 13-DHED em EPIDAUNORRUBICINA

É um dado bem conhecido que as 13-dihidro-antraciclinas se acumulam no caldo de fermentação juntamente com formas 13-ceto. Contudo, a 13-DHED não é comercialmente útil e com base na sua natureza citotóxica, deve ser manuseada e tratada como um resíduo tóxico. Para nossa surpresa, este metabolito, apesar de não ser um metabolito natural, foi convertido em epidaunorrubicina pela estirpe de biotransformação a uma taxa útil, p. ex. > 20%, preferencialmente > 30%, mais preferencialmente > 40%.

13-DHED, um produto secundário na fermentação da epidaunorrubicina é facilmente separado da fracção glicosídica por cromatografia seguida de uma etapa de cristalização acompanhada da separação da epidaunorrubicina. 13-DHED poderia ser adsorvida numa resina adicionada ao caldo de cultura da estirpe de *Streptomyces* com capacidade para sintetizar a daunomicina e especialmente as últimas etapas dessa via. Apesar de qualquer estirpe ser adequada, é vantajoso utilizar a estirpe que apresenta um bloqueio nos primeiros passos da via biossintética e que é incapaz de acumular metabolitos de daunomicina.

Numa forma de realização preferida da presente invenção, a nova estirpe de biotransformação, derivada de *S. peucetius* var. *caesius* é utilizada na biotransformação para converter 13-DHED em epidaunorrubicina.

As taxas de conversão nas condições descritas para a produção de epidaunomicinas de acordo com a presente invenção são > 20%, preferencialmente > 30%, mais preferencialmente > 40%. A epidaunorrubicina obtida desta forma pode ser purificada a partir de outros metabolitos ligados à resina recorrendo-se a quaisquer métodos convencionais utilizados na recuperação de antraciclinas, embora a cromatografia e, em especial, a cromatografia de fase reversa, seja preferencialmente utilizada para se obter de forma adequada epidaunorrubicina purificada para a síntese.

Conversão da epidaunorrubicina em epirubicina

Utiliza-se epidaunorrubicina bruta (grau de pureza > 60%, preferencialmente > 80%, mais preferencialmente > 90%) como material de partida na síntese química para se obter epirubicina, que é frequentemente usada como fármaco anti-cancerígeno. Pode utilizar-se qualquer série de reacção sintética ou biocatalítica para a hidroxilação no C-14.

Existem várias opções para converter a epidaunorrubicina na sua forma 14-hidroxilada, a epirubicina. Só por si, o produto génico endógeno, a 14-hidroxilase, não possui uma actividade suficiente nas condições de cultura para converter toda a epidaunorrubicina formada em epirubicina, apesar de se detectarem quantidades pequenas de epirubicina no caldo de cultura. De acordo com as nossas experiências (dados não apresentados), mesmo um número elevado de cópias do gene da 14-hidroxilase foi insuficiente para se completar o processo da produção de epirubicina. Porém, as patentes US 5 955 319 e US 6 210 930 revelam a conversão da daunorrubicina em doxorubicina num nível baixo pelo produto génico de doxA.

Aparentemente, a bioconversão é extremamente dependente das condições e não conseguimos repetir o processo.

Existem várias possibilidades para adicionar um grupo hidroxilo no C-14 à epidaunorrubicina intacta, de modo análogo à síntese da doxorubicina a partir da daunorrubicina.

A purificação da epirrubicina é realizada por cromatografia e/ou por cristalização após a extração da epirrubicina a partir da mistura de síntese. Contudo, para se alcançar a qualidade exigida ao ingrediente farmacêutico activo, é essencial que a separação por cromatografia resulte numa epirrubicina com um grau de pureza > 97%.

Os exemplos a seguir apresentados descrevem de forma mais detalhada a presente invenção.

Será óbvio para um especialista na área que, com o avanço tecnológico, o conceito da invenção poderá ser implementado de várias formas. A invenção e as suas formas de realização não são limitadas aos exemplos a seguir descritos, mas podem apresentar variações dentro do âmbito das reivindicações.

Figura 1 a apresenta uma via biossintética para a daunorrubicina. As baumicinas são formadas a partir da daunorrubicina. A via biossintética é ramificada para a (i) doxorubicina e para a (ii) baumicina após a daunorrubicina. Esses passos não são apresentados na figura.

Figura 1 b apresenta uma via biossintética para a dTDP-daunosamina, que é utilizada para a glicosilação no C-7 na Fig. 1a.

Figura 2 apresenta uma representação esquemática do processo de biotransformação.

Figura 3 apresenta um cromatograma que mostra o perfil de produção da estirpe de biotransformação após alimentação com 4-deoxi- ϵ -rodomicinona.

EXEMPLOS

Exemplo 1 Construção de uma estirpe de biotransformação

Para a mutagénese da estirpe G001, derivada por mutagénese do tipo selvagem de *S. peucetius* var. *caesius* ATCC 27952, aquela foi cultivada em 50 ml de meio TSB num balão de Erlenmeyer de 250 ml. Todos os balões usados na mutagénese continham uma barra magnética no fundo do balão para dispersar os micélios durante a cultura. A cultura foi realizada durante dois dias a 30°C e a 330 rpm num agitador. Inoculou-se a seguir 1 ml da cultura na garrafa seguinte que continha 50 ml de TSB e o cultivo prolongou-se por mais um dia (30°C, 330 rpm). Esta cultura mais recente foi ajustada a um pH alcalino com NaOH e adicionou-se NTG para actuar sobre as células durante 20 minutos a > 30°C. A cultura da referida estirpe mutagenizada foi dividida em dois tubos e formaram-se *pellets* por centrifugação (300 rpm, 10 minutos). Utilizaram-se *pellets* combinados para inocular 50 ml de meio TSB. Após um dia (30°C, 330 rpm), o título da suspensão de células foi determinado plaqueando-se diluições adequadas, de 1:10 a 1:100000 em placas com ISP4. As colónias de culturas mutagenizadas foram comparadas com o tipo selvagem e as que exibiam características distintas das do tipo selvagem foram seleccionadas para serem posteriormente caracterizadas.

Os mutantes foram seleccionados com base na cor clara do pigmento que é vermelho-escuro no tipo selvagem na placa de agar ISP4.

O gene *snorO* (Torkkell, 2001) foi introduzido nos mutantes usando-se o vector de *E. coli*, pCNB3033. Foi sugerido que a integração ocorresse no local *attP*. Com a estirpe de biotransformação obtida melhorada obteve-se para > 20%, preferencialmente > 30%, mais preferencialmente > 40% de 4-deoxi- ϵ -rodomicinona adicionada taxas de conversão repetidas em metabolitos de idarrubicina conforme se descreve de forma detalhada no Exemplo 5.

Exemplo 2 Cultura de estirpes de biotransformação para a produção de metabolitos de antraciclinas e para biotransformação

Mutantes adequados seleccionados conforme descrito no exemplo 1 foram cultivados em 50 ml de meio E1 suplementado com resina adsorvente (15 g/l). (E1: Por litro de água da torneira: glicose 20 g; amido solúvel 20 g; Péptido 5 g; extracto de levedura 2,5 g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g; NaCl 3 g; $CaCO_3$ 3 g; pH 7 a 7,5).

Para determinar os metabolitos de antraciclinas, os compostos foram extraídos no décimo dia de incubação. Para a análise, a resina adsorvente foi decantada com água de um balão de cultura e a resina lavada foi extraída com 40 ml de álcool ácido, agitando-se pelo menos durante 30 min. Usou-se HPLC para analisar as amostras. Observou-se que a utilização de resina adsorvente em meio E1 aumenta a produção de metabolitos de antraciclinas nas condições referidas. No fim do período de cultura não se observaram alterações na morfologia das colónias na presença do adsorvente.

No caldo de cultura das estirpes mutantes não se detectou produção de metabolitos de antraciclinas.

Contudo, as estirpes mutantes possuem os genes biossintéticos funcionais para a glicosilação e modificação de agliconas de acordo com a via biossintética representada na Figura 1 e como foi demonstrado pelas experiências de alimentação. As estirpes mutantes foram alimentadas com agliconas, ϵ -rodomicinona e aclavinona naturais (pelo menos 100 mg da aglicona por 1 litro do caldo de cultura) e a aglicona adicionada foi convertida em metabolitos de daunomicina em dois dias. Contudo, com a alimentação das estirpes mutantes com 4-deoxi- ϵ -rodomicinona não ocorreu a conversão repetida em metabolitos de idarrubicina. Foi sugerido que a razão para esse insucesso se devia a uma fraca resistência ao produto adicionado ou ao produto formado.

A estirpe de biotransformação melhorada conseguiu converter agliconas, ϵ -rodomicinona e aclavinona naturais como era esperado. Também converteu intermediários biossintéticos análogos não naturais, 4-deoxi- ϵ -rodomicinona e 13-DHED em idarrubicina e em epidaunorrubicina, conforme descrito no exemplo 4 abaixo apresentado.

Exemplo 3 Conversão sintética de ϵ -rodomicinona em 4-deoxi- ϵ -rodomicinona

Utilizou-se ϵ -rodomicinona purificada com uma pureza cromatográfica > 60%, preferencialmente > 80%, mais preferencialmente > 90% para a síntese de 4-deoxi- ϵ -rodomicinona. A síntese de 4-deoxi- ϵ -rodomicinona consiste em quatro passos:

A) protecção, B) trifilação, C) redução e D) desprotecção.

Após cada passo isolou-se o produto por precipitação/cristalização a partir de misturas de clorofórmio-metanol. As reacções de síntese foram monitorizadas por TLC.

A) Protecção

A ϵ -rodomicinona foi dissolvida em clorofórmio à temperatura ambiente. Adicionou-se 2 eq. de 2-metoxipropeno a uma mistura seguido de 1 eq. de TMSCI. A reacção foi seguida por TLC. Quando a reacção terminou conforme detectado numa placa de TLC, deixou-se arrefecer a mistura e recolheu-se o precipitado e secou-se para o próximo passo.

B) Trifilação

Um material de partida do passo de protecção foi dissolvido em clorofórmio. Adicionou-se NMP (N-metil pirrolidona) e diisopropiletilamina (DIPEA) e, por fim, PhNTf₂ (N-feniltrifluorometanosulfonimida). A reacção foi monitorizada por TLC. O composto foi precipitado adicionando-se à mistura água e ácido cítrico. O precipitado foi filtrado e lavado com KHSO₄. Os cristais foram filtrados e secos sob vácuo.

C) Redução

O material resultante da trifilação foi suspenso em ACN sob árgon. Adicionou-se (Ph₃P)₄Ph seguido da adição de (Etil)₃N e HCOOH. A mistura de reacção foi aquecida e a reacção foi monitorizada por TLC. Após 1 hora, a reacção estava completa. Deixou-se arrefecer a mistura de reacção e obteve-se o produto por filtração.

D) Desprotecção

O produto resultante da redução foi dissolvido em clorofórmio e adicionou-se 1 eq. de TsOH x H₂O à temperatura ambiente. A reacção processa-se em 0,5 h. Lavou-se a solução com NaHCO₃ 1 M, secou-se com MgSO₄ e evaporou-se até à secura.

Purificação de 4-deoxi-ε-rodomicinona

Uma mistura de reacção de desprotecção (CHCl₃ / TsOH x H₂O) foi diluída com clorofórmio e lavou-se com NaHCO₃ 1 M. A fracção no clorofórmio foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e evaporada até à secura. A cristalização foi realizada a partir de clorofórmio-metanol. Os cristais foram filtrados e secos sob vácuo.

Exemplo 4 Recuperação de 13-DHED do caldo de cultura de uma estirpe mutante que produz epidaunorrubicina derivada de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

O caldo de fermentação para a produção da epidaunorrubicina contém três metabolitos principais na seguinte ordem: epidaunorrubicina, 13-DHED e epi-feudomicina (Ref. pedido de patente epi). Os substituintes adsorvidos numa resina foram decantados do caldo de cultura de 20 litros obtido por fermentação. A resina foi lavada para remover restos de células com água. O *pellet* foi extraído com álcool uma a cinco vezes. As agliconas foram extraídas com clorofórmio adicionando-se clorofórmio aos extractos de álcool combinados. As camadas de solvente e de água foram separadas.

Os glicósidos na fase de água foram extraídos com clorofórmio a um pH levemente alcalino e o pH foi estabilizado com NaHCO₃ saturado. Os sais foram removidos lavando-se com água. Por fim, a fase de clorofórmio foi filtrada através de um filtro de cartucho.

Foi realizada uma cromatografia em gel de sílica para separar-se os metabolitos. O clorofórmio filtrado foi bombeado para uma coluna de sílica e purificado por cromatografia usando-se uma solução de clorofórmio-metanol como uma fase móvel. Foram recolhidas fracções puras de cada um dos três metabolitos e combinaram-se as fracções de cada produto para a cristalização. As fracções de 13-DHED foram cristalizadas por soluções de etanol-água. Os cristais foram filtrados e adsorvidos numa resina adsorvente.

Exemplo 5 Conversão biossintética de 4-deoxi- ϵ -rodomicinona e metabolitos associados em idarrubicina

Efectuou-se uma cultura por sementeira, cultivando-se uma estirpe de biotransformação em dois balões com 400 ml do meio E1 durante três dias. As culturas foram combinadas e os 800 ml do caldo de cultura foram usados para inocular 20 litros de meio E1 suplementado com XAD-7. A fermentação foi realizada num volume de 20 litros durante 8 dias a uma temperatura de 30 °C, 350 rpm com uma aeração de 10 l/min. O pH foi mantido num valor ligeiramente ácido, o que garante uma conversão mais estável da 4-deoxi- ϵ -rodomicinona adicionada em idarrubicina. A 4-deoxi- ϵ -rodomicinona é adicionada por alimentação contínua durante 4 dias, a começar 24 horas após a inoculação com pelo menos 5 mg/ml de 4-deoxi- ϵ -rodomicinona em EtOH. A quantidade de 4-deoxi- ϵ -rodomicinona adicionada é de pelo menos 100 mg/l.

Durante a biotransformação com a estirpe mutante foram produzidos dois metabolitos secundários principais a partir da 4-deoxi- ϵ -rodomicinona adicionada; nomeadamente idarrubicina e 13-dihidro-idarrubicina. Outros metabolitos produzidos em menor quantidade foram a idarrubicinona, a 13-dihidroidarrubicinona, as baumicinas e 13-deoxi-idarrubicina e a sua aglicona. O título estável de Idarrubicina é > 20 mg/L, além disso produz-se > 20 mg/L do intermediário anterior 13-DHI; assim, no conjunto, a quantidade é > 40 mg/L. As baumicinas podem ser hidrolisadas em Idarrubicina, aquecendo-se em condições ácidas (+45 °C, 1 hora). O cromatograma dos produtos obtidos a partir da estirpe de biotransformação é apresentado na Figura 3.

Exemplo 6 Conversão biossintética de 13-DHED em epidaunorrubicina

O pré-cultivo da estirpe de transformação foi efectuado tal como descrito detalhadamente no Exemplo 5. Adicionou-se ao cultivo após um dia 13-DHED adsorvido na resina correspondendo a pelo menos 50 mg/ l do caldo de cultura e continuou-se o cultivo durante quatro dias. As fermentações foram realizadas em balões contendo 50 ml de meio E1, a 34 °C, 300 rpm.

Segundo a análise cromatográfica, 50% de 13-DHED foi convertido em epidaunorrubicina. Foram detectadas quantidades pequenas de epirrubicina, compreendidas entre valores < 10%.

Exemplo 7 Medição analítica das agliconas e antraciclinas

TLC

1. 0,5 água Milli-Q

2. 0,1 HCOOH
3. 25 MeOH
4. 75 CHCl₃, misturar cuidadosamente com as soluções 1, 2 e 3

HPLC

Equipamento: Equipamento cromatográfico da Hewlett-Packard da série 1100 com detecção por matriz de díodos.

Coluna Zorbax, SB-C8, Agilent, 4,6 x 150 mm 3,5-Mícrones

Solventes utilizados: 0,05% de TFA, e 1:1 MeCN - tetrahidrofurano

Temperatura da coluna: 30°C

Velocidade do fluxo: 1 ml/min

Detecção: 254±8 nm, comprimento de onda de referência 600 nm±50 nm

Volume de injeção: 5 µl

Pressão: min. 20 bar, máx. 300 bar

Parâmetros utilizados:

Tempo (min)	%-quantidade de 0,05% de TFA	%-quantidade de MeCN-THF
0	76,0	24,0
0,1	76,0	24,0
13,0	32,0	68,0
16,0	1,0	99,0
19,0	1,0	99,0
20,0	76,0	24,0
24,0	76,0	24,0

Lista de Referências Bibliográficas

Dickens M, Priestley N e Strohl W: In vivo and in vitro bioconversion of ϵ -rhodomycinone glycoside to doxorubicin: Function of DauP, DauK, and DoxA. (1997) J. Bacteriol. 179: 2641-2650.

Di Marco A, Silvestrini R, Gaetani M, Soldati M, Orezzi P, Dasdia T, Scarpinato BM, Valentini L: 'daunomycin', a new antibiotic of the rhodomycin group. (1964) Nature 15: 706-707.

Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM e Schrempf H: Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual. (1985) John Innes Foundation, Norwich.

Sambrook J, Fritsch EF e Maniatis T: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nova Iorque.

Strohl W.R, Bartel P, Connors NC, Zhu C, Dosch D, Beale JM, Floss HG, Stuzman-Engwall K, Otten SL e Hutchinson CR: Biosynthesis of natural and hybrid polyketides by anthracycline-producing streptomycetes. (1989)

p. 68-84, C.L. Hershberger, SW Queener e G Hegeman (ed.) Genetics and molecular biology of industrial microorganisms. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Torkkell S, Kunnari T, Palmu K, Mäntsälä P, Hakala J e Ylihonko K: The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of Streptomyces nogalater: characterization of a 20-kb DNA region and generation of hybrid structures. (2001) Molecular Genetics and Genomics 266:276-288.

Torkkell S: Anthracycline antibiotics: Biosynthetic pathway and molecular genetics of nogalamycin, a product of *Streptomyces nogalater*. (2001) Publications in Annales Universitatis Turkuensis n° da série: 275.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

A lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor, não sendo parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 5874550 A [0003]
- US 4325946 A [0004]
- US 5652125 A [0005]
- US 7053191 B [0021]
- US 5955319 A [0029]
- US 6210930 B [0029]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

• **DICKENS M ; PRIESTLEY N ; STROHL W.** In vivo and in vitro bioconversion of ϵ -rhodomycinone glycoside to doxorubicin: Function of DauP, DauK, and DoxA. J. Bacteriol., 1997, vol. 179, 2641-2650 [0058]

• **DI MARCO A; SILVESTRINI R ; GAETANI M ; SOLDATI M ; OREZZI P ; DASDIA T ; SCARPINATO BM ; VALENTINI L.** daunomycin', a new antibiotic of the rhodomycin group. Nature, 1964, vol. 15, 706-707 [0058]

• **HOPWOOD DA; BIBB MJ ; CHATER KF ; KIESER T ; BRUTON CJ ; KIESER HM ; LYDIATE DJ ; SMITH CP ; WARD JM ; SCHREMPF H.** Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual. John Innes Foundation, 1985 [0058]

• **SAMBROOK J ; FRITSCH EF ; MANIATIS T.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0058]

• Biosynthesis of natural and hybrid polyketides by anthracycline- producing streptomycetes. **STROHL W.R ; BARTEL P ; CONNORS NC ; ZHU C ; DOSCH D ; BEALE JM ; FLOSS HG ; STUZMAN- ENGWALL K ; OTTEN SL ; HUTCHINSON CR.** Genetics and molecular biology of industrial micro- organisms. American Society for Microbiology, 1989, 68-84 [0058]

• **TORKKELL S ; KUNNARI T ; PALMU K ; MÄNTSÄLÄ P ; HAKALA J ; YLIHONKO K.** The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater*: characterization of a 20-kb DNA region and generation of hybrid structures. Molecular Genetics and Genomics, 2001, vol. 266, 276-288 [0058]

• **TORKKELL S.** Anthracycline antibiotics: Biosynthetic pathway and molecular genetics of nogalamycin, a product of *Streptomyces nogalater*. Annales Universitatis Turkuensis- n° da série: 275, 2001 [0058]

Lisboa, 16/03/2010

Reivindicações

1. Uma estirpe microbiana seleccionada a partir do género *Streptomyces* a qual converte metabolitos de antraciclinas em antibióticos antraciclínicos não naturais, **caracterizada por** a estirpe apresentar um bloqueio na biossíntese das daunomicinas naturais e conter o gene de resistência heterólogo *snrO*.

2. A estirpe de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos metabolitos de antraciclinas são seleccionados a partir do grupo que consiste em epidaunorrubicina, 13-dihidroepidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina e ϵ -rodomicinona.

3. A estirpe de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que os referidos antibióticos antraciclínicos não naturais são seleccionados a partir do grupo que consiste em epirrubicina e idarrubicina.

4. A estirpe de acordo com a reivindicação 1, em que a referida estirpe é seleccionada a partir da espécie *Streptomyces peucetius*.

5. A estirpe de acordo com a reivindicação 4, em que a referida estirpe é seleccionada a partir da subespécie *Streptomyces peucetius* var *caesius*.

6. A estirpe de acordo com a reivindicação 1, em que o referido gene é isolado a partir do género *Streptomyces*.

7. A estirpe de acordo com a reivindicação 6, em que o referido gene é isolado a partir da espécie *Streptomyces nogalater*.

8. A estirpe de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a referida estirpe apresenta uma taxa de conversão dos metabolitos de antraciclinas nos antibióticos antraciclínicos não naturais > 20%.

9. A estirpe de acordo com a reivindicação 8, em que a referida estirpe apresenta uma taxa de conversão dos metabolitos de antraciclinas nos antibióticos antraciclínicos não naturais > 30%.

10. A estirpe de acordo com a reivindicação 9, em que a referida estirpe apresenta uma taxa de conversão dos metabolitos de antraciclinas nos antibióticos antraciclínicos não naturais > 40%.

11. Um processo para converter metabolitos de antraciclinas em antibióticos antraciclínicos que utiliza uma estirpe microbiana de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

12. Um processo de acordo com a reivindicação 11, em que os referidos metabolitos de antraciclinas são seleccionados a partir do grupo que consiste em epidaunorrubicina, 13-dihidroepidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina e ϵ -rodomicinona.

13. O processo de acordo com a reivindicação 11 ou 12, em que os referidos antibióticos antraciclínicos são seleccionados a partir do grupo que consiste em epirrubicina e idarrubicina.

14. O processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, em que a referida estirpe apresenta

uma taxa de conversão dos metabolitos de antraciclinas nos antibióticos antraciclínicos não naturais > 20%.

15. O processo de acordo com a reivindicação 14, em que a referida estirpe apresenta uma taxa de conversão dos metabolitos de antraciclinas nos antibióticos antraciclínicos não naturais > 30%.

16. O processo de acordo com a reivindicação 15, em que a referida estirpe apresenta uma taxa de conversão dos metabolitos de antraciclinas nos antibióticos antraciclínicos não naturais > 40%.

17. O processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, em que o grau de pureza dos metabolitos de antraciclinas brutos utilizados para a biotransformação é > 60%.

18. O processo de acordo com a reivindicação 17, em que o grau de pureza dos metabolitos de antraciclinas brutos utilizados para a biotransformação é > 80%.

19. O processo de acordo com a reivindicação 18, em que o grau de pureza dos metabolitos de antraciclinas brutos utilizados para a biotransformação é > 90%.

20. O processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 19, em que uma resina é utilizada a qualquer momento para adsorver os metabolitos de antraciclinas ou os antibióticos antraciclínicos.

21. O processo de acordo com a reivindicação 20, em que a referida resina é seleccionada a partir do grupo que consiste em adsorventes iónicos e não iónicos.

22. O processo de acordo com a reivindicação 21, em que a referida resina é seleccionada a partir do grupo dos poliestirenos.

23. O processo de acordo com a reivindicação 21, em que a referida resina é seleccionada a partir do grupo que consiste em XAD-7 e Diaion HP-20.

24. O processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, em que a referida resina é adicionada numa quantidade compreendida entre 1 e 100 g/l.

25. O processo de acordo com a reivindicação 24, em que a referida resina é adicionada numa quantidade compreendida entre 10 e 50 g/l.

26. O processo de acordo com a reivindicação 25, em que a referida resina é adicionada numa quantidade compreendida entre 15 e 30 g/l.

Lisboa, 16/03/2010

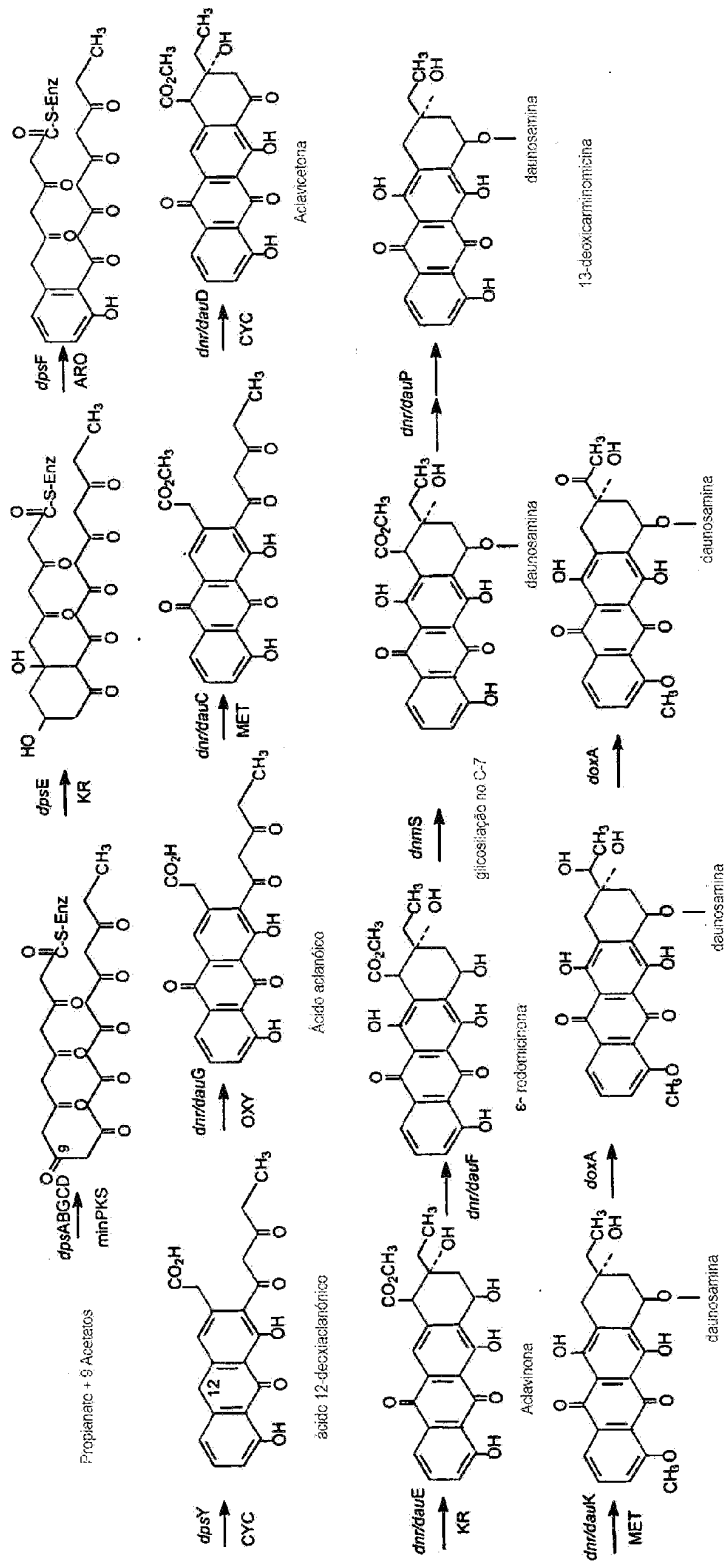


Figura 1a

Figura 1b

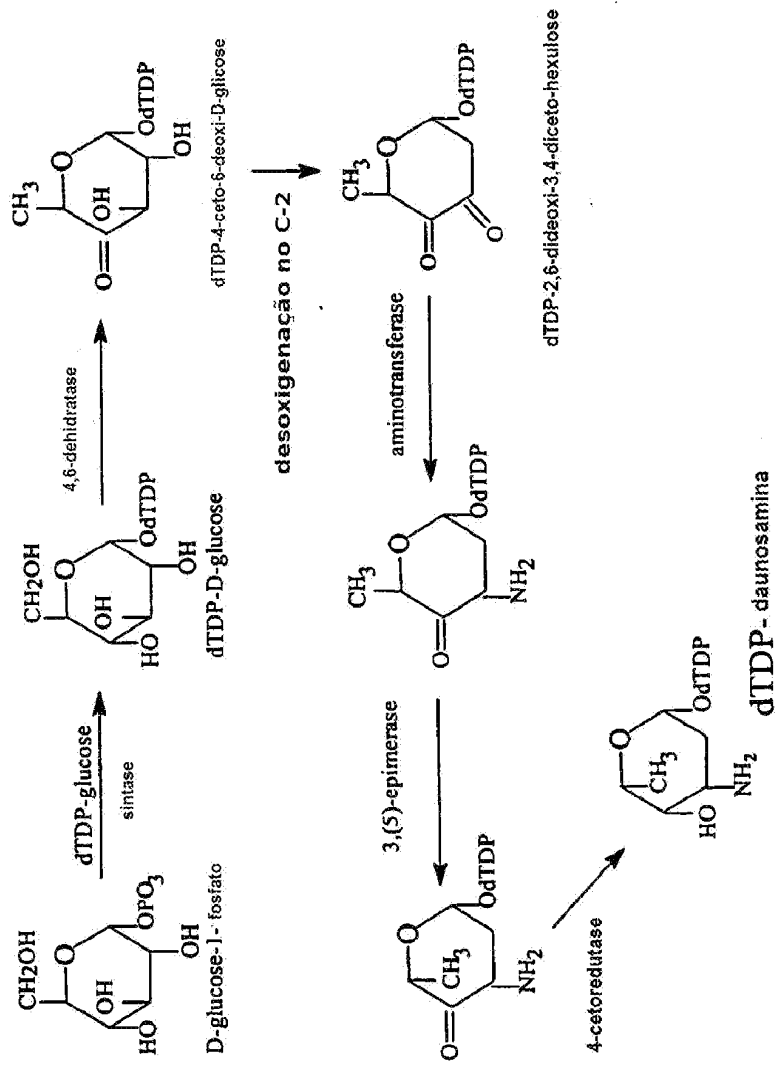


Figura 2

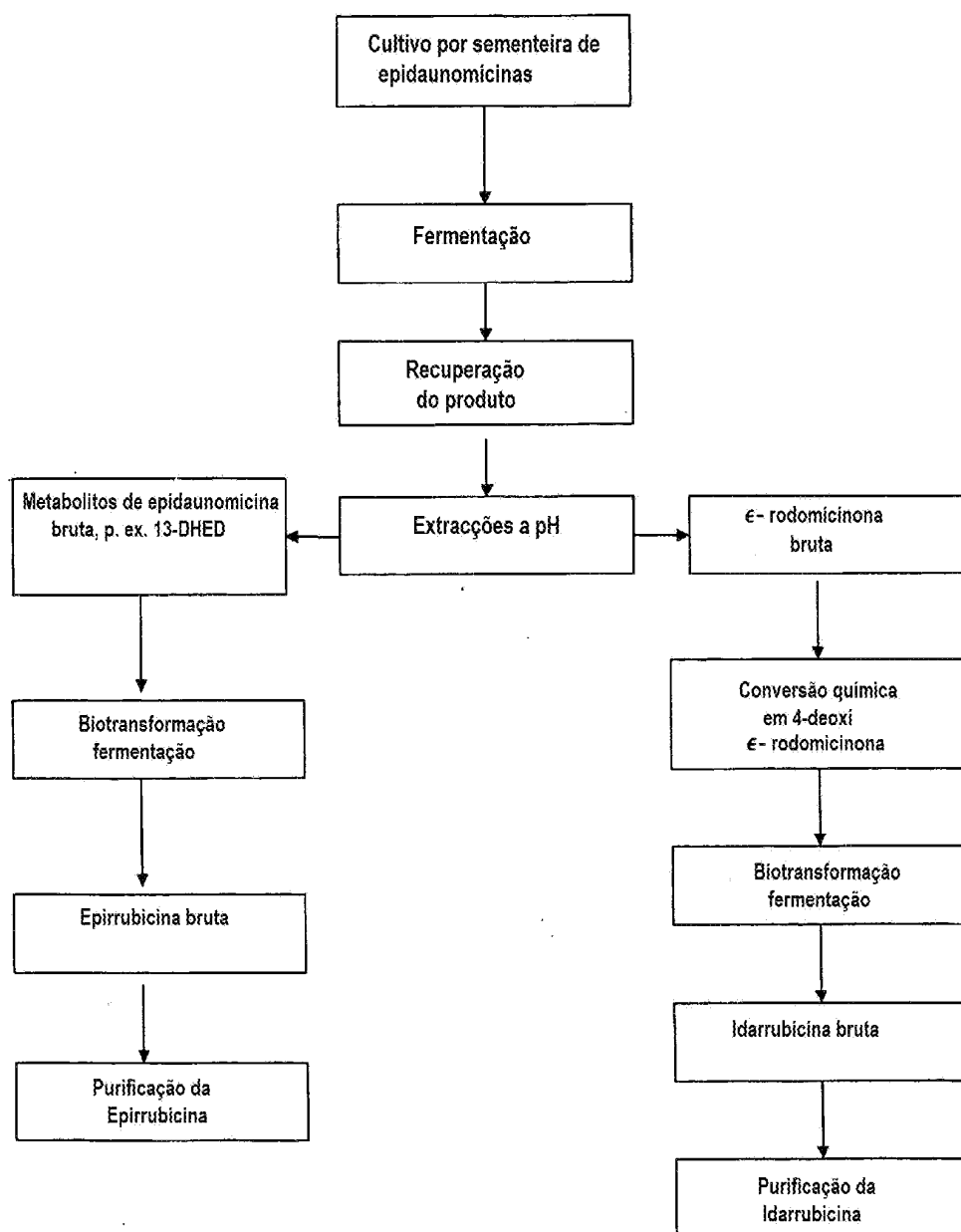
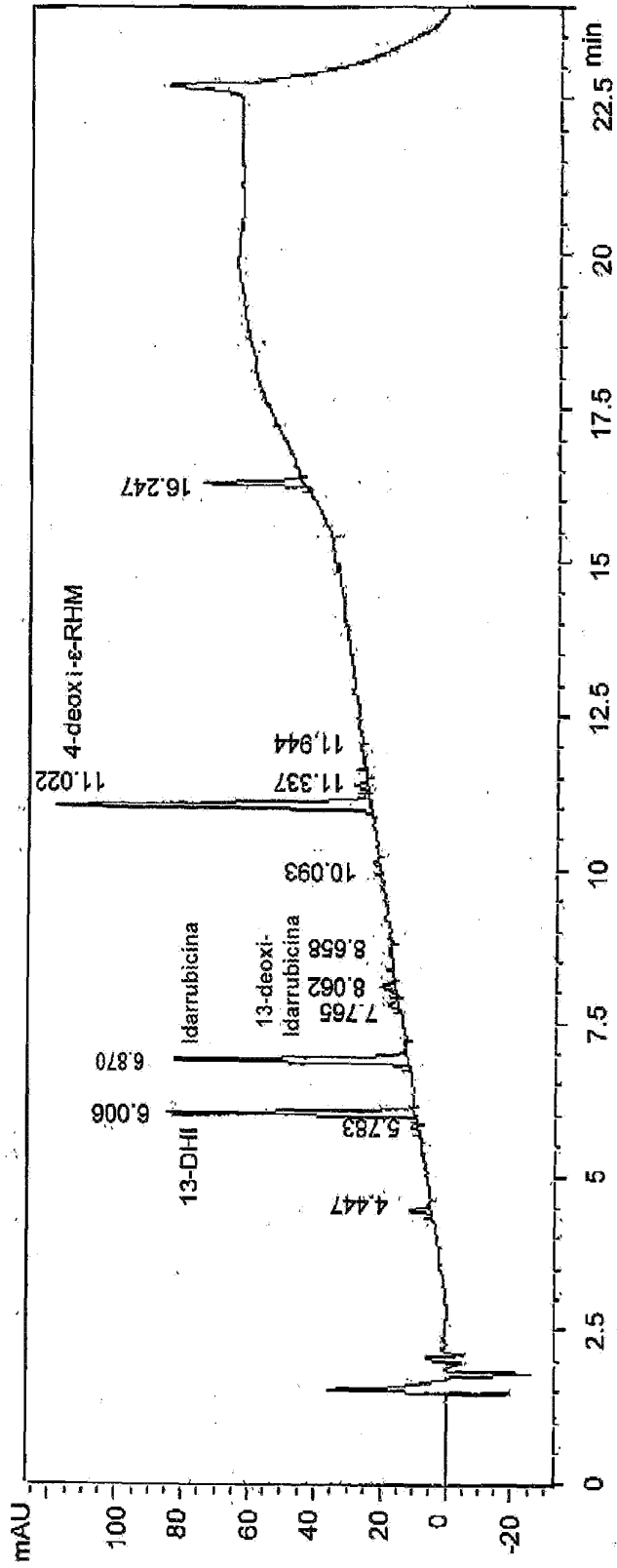


Figura 3

DAD1 B, Sig=254,16 REF=600,100

(061106RITV015-4801.D)



Perfil de produção da estirpe de biotransformação:

Rt= 6.0:13-DHI, Rt= 8.1:13-deoxi-IDA, Rt= 11.0:4-deoxi-ε-RHM.