



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 132**

51 Int. Cl.:  
**C12P 19/56** (2006.01)  
**C12R 1/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04732300 .1**  
96 Fecha de presentación : **12.05.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1745140**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Biotransformación de compuestos colchicinoides.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.11.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.11.2009**

73 Titular/es: **Indena S.p.A.**  
**Viale Ortles, 12**  
**20132 Milano, IT**

72 Inventor/es: **Ponzone, Cesare**

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 329 132 T3

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

Biotransformación de compuestos colchicinoides.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de biotransformación, efectuado por medio de cepas microbianas seleccionadas, para la preparación de derivados de 3-O-glicosilo de compuestos colchicinoides.

10 En particular, el procedimiento de la presente invención proporciona compuestos colchicinoides glicosilados exclusivamente en C-3 del anillo aromático A, partiendo de colchicina, tiocolchicina o los derivados de las mismas. El procedimiento, que da como resultado una alta productividad y pureza del producto obtenido, se basa en una activación temprana de la enzima glicosilante, determinada por un producto intermedio de colchicina desmetilada. Preferiblemente, el procedimiento de la invención consiste en un procedimiento de fermentación de alimentación por lotes (*fed-batch*) múltiple, que comprende la alimentación fraccionada de una fuente de nitrógeno, una fuente de carbono y el sustrato que ha de transformarse.

15 Los compuestos colchicinoides glicosilados en C-3 del anillo de benceno son de importancia farmacológica notable en vista de su alta eficacia y como productos intermedios para la preparación de nuevos medicamentos.

20 En particular, el tiocolchicósido (3-O-glucosiltiocolchicina) es un principio activo atractivo e interesante en el campo farmacéutico, principalmente en el tratamiento de enfermedades del sistema musculoesquelético, y como materiales de partida para la preparación de medicamentos antiinflamatorios, antipsoriásicos, inmunosupresores y antitumorales novedosos.

25 El documento WO 98/15642 da a conocer un procedimiento para la producción de derivados de glicosilo de colchicinoides con altos rendimientos de conversión (hasta el 90%), partiendo de compuestos colchicinoides tales como colchicina, tiocolchicina y derivados de las mismas, con una concentración inicial de hasta 1 g/l. El procedimiento se basa en una etapa de desmetilación regioselectiva preliminar del grupo metoxilo en C-3 unido al anillo aromático del colchicinoide, y una posterior glicosilación del derivado de desmetilo en el mismo sitio molecular.

30 El documento XP009085646 de Saarela U. *et al.*: "Modelling of a Fed-Batch Fermentation process (Report A No. 21)", junio de 2003, Universidad de Oulu, Laboratorio de Ingeniería de Control, Oulu, Finlandia, da a conocer un procedimiento de funcionamiento típico de una fermentación de alimentación por lotes, en la que la fermentación se inicia con una pequeña cantidad de biomasa y sustrato en el fermentador, y en el que se inicia la alimentación de sustrato cuando se ha consumido la mayor parte del sustrato añadido inicialmente. Este documento da a conocer que  
35 los reactores de alimentación por lotes se usan ampliamente en aplicaciones industriales porque combinan las ventajas del procedimiento tanto discontinuo como continuo.

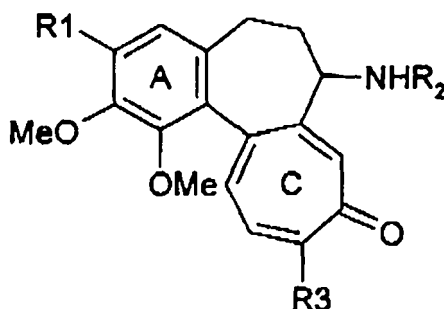
El procedimiento de la presente invención, mientras que mantiene el mismo rendimiento de conversión alto de los anteriores, permite la transformación de una cantidad considerablemente mayor de sustrato total, mejorando así tanto  
40 la productividad total, expresada como la cantidad total de producto obtenido por litro por lote, como la productividad específica, expresada como la cantidad de producto obtenido por litro por unidad de tiempo (es decir: hora) durante el procedimiento de biotransformación.

El procedimiento de la invención se caracteriza por el mecanismo de activación de la etapa de glicosilación, basada  
45 en la inducción de la enzima específica. De hecho, se ha descubierto sorprendentemente que la enzima implicada en la etapa de glicosilación se induce de manera eficaz por colchicinoides desmetilados tales como 3-O-desmetilcolchicina (DMC) o 3-O-desmetiltiocolchicina (DMTC). Una adición de pequeñas cantidades (200-600 mg/l) del colchicinoide desmetilado en el cultivo de siembra preliminar, es útil para una activación temprana del sistema de glicosilación. En tales condiciones, el producto intermedio desmetilado, liberado por etapas por la enzima desmetilante, puede convertirse de manera eficaz en el derivado de glicosilo final, y la biotransformación puede avanzar muy rápidamente, durante  
50 las primeras 15-18 horas de fermentación. Además, no hay una acumulación significativa del producto intermedio, esto significa ninguna inhibición de la actividad desmetilante y una alta tasa de conversión. La biotransformación es completa tras 18-21 horas y, por tanto, es considerablemente más rápida que el procedimiento conocido (26-28 horas). El rendimiento de conversión sigue siendo muy alto, de desde el 80% hasta el 100%, habitualmente de aproximadamente el 90-95%, pero con un aumento considerable de sustrato transformado total y, por consiguiente, de producto  
55 final.

60

65

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de compuestos colchicinoides de 3-O-glicosilo de fórmula (I),



en la que  $R_1$  es un residuo de O-glicósido,  $R_2$  es hidrógeno o acilo  $C_1-C_7$ ,  $R_3$  es alcoxilo  $C_1-C_6$  o tioalquilo  $C_1-C_6$ , que comprende la biotransformación de compuestos en los que  $R_1$  es metoxilo por medio de *Bacillus megaterium*, comprendiendo dicho procedimiento la alimentación fraccionada múltiple del sustrato, en combinación con fuente de nitrógeno y una de carbono a un cultivo de siembra preliminar que contiene un colchicinoide desmetilado usado para inducir el sistema enzimático de glicosilación.  $R_1$  es preferiblemente un residuo de O-glucósido.

La peptona y la glucosa son una fuente de nitrógeno y de carbono adecuada. Estas condiciones, al garantizar una velocidad de crecimiento estable del cultivo microbiano, permiten un aumento relevante del sustrato total añadido al lote de fermentación (2-4 g/l, en lugar de 1 g/l) y por consiguiente de la productividad del procedimiento (hasta 2,5-5,2 g/l de producto glicosilado por lote individual, en lugar de 1-1,2 g/l), sin pérdida alguna de eficacia de conversión ni riesgo de efectos tóxicos sobre el cultivo bacteriano, debido a una acumulación considerable del sustrato no transformado.

La presente invención también es ventajosa en vista del tiempo reducido del procedimiento, dando como resultado una alta viabilidad del cultivo y una lisis celular limitada, con una formación reducida de desechos celulares y ventajas considerables para el procesamiento posterior y la recuperación del producto. Esta ventaja puede mejorarse adicionalmente mediante el uso de resinas de absorción, tales como XAD 1180 (Rohm & Haas) o HP 21 (Mitsubishi), útiles para una absorción selectiva de los compuestos colchicinoides y una recuperación de producto eficaz a partir del caldo de fermentación.

Una ventaja adicional se refiere a la posibilidad de un procedimiento semicontinuo, mediante la recuperación de la fracción principal (el 75%-90%) del caldo de fermentación final, que contiene el producto, la adición de medio de fermentación nuevo a la parte restante del caldo en el biorreactor, y el comienzo con un nuevo lote. Este enfoque puede extenderse a etapas de fermentación repetidas, con un aumento proporcional de la productividad total.

Además, la regioselectividad constante de la catálisis garantiza, además de los rendimientos de producción notables, una alta calidad del producto resultante, permitiendo una pureza  $\geq 99\%$  con un procesamiento posterior simple y una incidencia reducida de la etapa de purificación y recuperación del producto. Este aspecto implica ventajas adicionales en cuanto a la limitación del disolvente y la alta compatibilidad ambiental del procedimiento.

Los microorganismos *Bacillus megaterium* que pueden usarse en la presente invención son los mismos que los descritos en el documento WO 98/15642.

Pueden seleccionarse sobre diferentes medios de agar que contienen una fuente orgánica de nitrógeno (peptonas, extractos de levadura, extractos de carne, asparagina, etc.), una fuente de carbono (glicerina, almidón, maltosa, glucosa, etc.), con un pH de 5 a 8, preferiblemente 6-7. La temperatura de incubación oscila desde 20° hasta 45°C, preferiblemente 28°-40°C.

Los medios de cultivo usados para la conservación del cultivo son sustratos microbiológicos típicos, que contienen fuentes orgánicas de nitrógeno (peptonas, extractos de levadura, triptona, extractos de carne, etc.), una fuente de carbono (glucosa, maltosa, glicerina, etc.), a un pH de 5 a 8, preferiblemente 6-7. La temperatura de incubación oscila desde 20° hasta 45°C, preferiblemente 28°-40°C.

Los microorganismos seleccionados pueden someterse a ensayo para determinar la capacidad de crecimiento en cultivo sumergido, en presencia de compuestos colchicinoides, añadidos tal como se describe en la presente invención, y de transformación de estos últimos en los derivados de 3-glicosilo correspondientes.

Dichos ensayos se llevaron a cabo en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de medio líquido, con diferentes formulaciones de medio, que comprendían una o más fuentes orgánicas de nitrógeno (extractos de levadura, peptonas, triptona, hidrolizados de caseína, extracto de carne, licor de maceración de maíz, etc.), una o más fuentes de carbo-

## ES 2 329 132 T3

no (glucosa, glicerol, almidón, sacarosa, etc.), fuentes inorgánicas de fósforo y de nitrógeno, y sales inorgánicas de diversos iones (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, etc.).

Las muestras de cultivo puede someterse opcionalmente a tratamientos mutagénicos, por medio de las técnicas de mutagénesis convencionales (irradiación con rayos UV, etc.) para inducir mutantes que tienen una actividad de bioconversión específica que puede evaluarse con el mismo procedimiento que anteriormente.

La capacidad de las bacterias seleccionadas de transformación en los respectivos derivados de 3-glicosilo los sustratos colchicinoides, añadidos al caldo de cultivo en fracciones repetidas, junto con una fuente de carbono y una de nitrógeno, se ha confirmado por medio de ensayos de bioconversión en matraces, en una escala de 300 ml, que contenían diferentes formulaciones de medio, que comprendían una o más fuentes orgánicas de nitrógeno (extractos de levadura, peptonas, triptona, hidrolizados de caseína, extracto de carne, licor de maceración de maíz, etc.), una o más fuentes de carbono (glucosa, glicerol, almidón, sacarosa, etc.), fuentes inorgánicas de fósforo y de nitrógeno, y sales inorgánicas de diversos iones (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, etc.).

El crecimiento bacteriano y la biotransformación están apoyados por una o más fuentes orgánicas de nitrógeno, preferiblemente extracto de carne, peptona, triptona, hidrolizados de caseína, licor de maceración de maíz, etc. Las fuentes de carbono útiles para el crecimiento y la biotransformación son glucosa, fructosa, sacarosa, glicerol, extracto de malta, etc., preferiblemente glucosa, fructosa y glicerol. El medio de cultivo contiene además fuentes inorgánicas de fósforo y sales de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, etc.

La fuente de carbono útil para la alimentación en el procedimiento es preferiblemente glucosa y fructosa. La fuente de nitrógeno para la alimentación en el procedimiento es preferiblemente una fuente orgánica, tal como peptona, hidrolizado de caseína, triptona, o una inorgánica, tal como sulfato de amonio, o una combinación de ambas.

Experimentos preliminares han mostrado que la introducción, antes de la etapa de biotransformación, de un cultivo de siembra sumergido, que contiene una formulación de medio similar a la del medio de producción, da como resultado una población microbiana muy homogénea y sumamente activa al principio de la biotransformación.

Se han realizado experimentos adicionales usando diferentes parámetros de fermentación, tales como cantidad, tiempo y modalidad de adición de sustrato, razón de alimentación, tiempo de incubación, razón de inóculo, etc.

Una adición temprana de un desmetilcolchicinoide como inductor, al principio de la etapa de biotransformación o, mejor, durante el cultivo de siembra preliminar, puede aumentar considerablemente la eficacia de conversión y la productividad total del procedimiento.

Puede conseguirse un aumento adicional alimentando el sustrato que ha de convertirse en más fracciones durante el procedimiento, en combinación con una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

Por tanto, un procedimiento típico, que combina los parámetros descritos anteriormente, puede basarse en el siguiente programa:

- una adición preliminar de un colchicinoide desmetilado (200-600 mg/l, preferiblemente 300-500 mg/l) en el cultivo de siembra;
- la adición de alícuotas (300-800 mg/l, preferiblemente 500-600 mg/l) del sustrato colchicinoide que ha de convertirse, al principio y cada 1-3 horas, preferiblemente 1,5-2,5 horas, durante las primeras 14-18 horas, preferiblemente 15-16 horas de biotransformación;
- la adición, en cada momento de la alimentación de sustrato, de una disolución que contiene los siguientes materiales de partida:
  - a) peptona o triptona o hidrolizado de caseína, a una concentración final de entre 2 y 4 g/l, preferiblemente 2,5-3,5 g/l (también en combinación con sulfato de amonio 1-3 g/l, preferiblemente 1,5-2,5 g/l);
  - b) glucosa o fructosa, a una concentración final de entre 5 y 15 g/l, preferiblemente 8-12 g/l.

Considerando un tiempo de fermentación total de 20 horas, una concentración de sustrato inicial de 500 g/l, un intervalo de alimentación en el procedimiento de 2 horas y un número total de 7 etapas de alimentación (última adición de sustrato a la 14ª hora de fermentación), se añadirá al cultivo una cantidad total de sustrato de 4 g/l (en lugar de 1 g/l, tal como se describe en el documento WO 98/15642).

La biotransformación puede realizarse a 25°-35°C, preferiblemente a 28°-32°C, a un pH de entre 4 y 8, preferiblemente 5-7, en matraces agitados en un agitador rotatorio.

La biotransformación de la invención puede ampliarse a escala hasta el nivel de tanque de fermentación, manteniendo las condiciones de cultivo inalteradas, en particular en lo que respecta al medio de cultivo, la temperatura

y los tiempos de procesamiento. Con el fin de obtener buenos crecimientos, son importantes niveles adecuados de agitación-aireación, en particular se requieren niveles de aireación de 1-2 litros de aire por litro de cultivo por minuto (vvm), preferiblemente de 1,4-1,8 vvm. En tales condiciones, el procedimiento es muy rápido y tras 20-21 horas la biotransformación es completa.

El producto es extracelular y puede extraerse del caldo de cultivo tras la separación de la biomasa de la fracción de líquido mediante centrifugación y recuperación del sobrenadante, o microfiltración y recuperación del permeado. El cultivo puede tratarse con alcoholes, en vista de una recuperación óptima del producto.

La purificación puede realizarse mediante técnicas cromatográficas, extracción líquido-líquido con alcoholes y disolventes orgánicos lipófilos y cristalización, tal como se describe en el documento WO 98/15642.

Los siguientes ejemplos dan a conocer la invención con más detalle.

#### Ejemplo 1

Se utiliza una alícuota de cultivo congelado de *Bacillus megaterium* para el inóculo de cultivos de siembra (es decir: precultivo) en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, que contiene 250 ml de medio SF2 (tabla), al que se le añade 3-O-desmetiltiocolchicina hasta una concentración final de 0,4 g/l. Se incuban dichos cultivos durante la noche a 30°C, en un agitador rotatorio, a 250 rpm. Tras la incubación, se transfieren en condiciones estériles 500 ml de precultivo a un fermentador de 14 l, que contiene 9,5 l de medio SF2 nuevo (véase la tabla 1), al que se le añade tiocolchicina hasta una concentración final de 0,5 g/l. La fermentación se lleva a cabo a 30°C, manteniendo niveles adecuados de agitación-aireación (agitación de hasta 900 rpm; aireación de 1 a 1,8 vvm, dependiendo del crecimiento del cultivo). Cada 2 horas se añaden al cultivo tiocolchicina (concentración final de 0,5 g/l), peptona (2 g/l), sulfato de amonio (2 g/l) y glucosa (10 g/l), durante las primeras 14 horas de fermentación. Antes de cada adición (es decir: cada 2 horas) se toman muestras de los caldos de cultivo y se someten al siguiente análisis:

- nivel de crecimiento, como densidad óptica (DO) a 600 nm;
- análisis de esterilidad y pureza de la cepa sobre agar LB;
- morfología al microscopio (tinción de Gram);
- análisis del contenido en tiocolchicósido, mediante CCF y HPLC.

El análisis de CCF se realiza sobre gel de sílice, con un sistema eluyente de acetona:acetato de etilo:agua 5:4:1. Para el análisis de HPLC, a fracciones de 1 ml de caldos de cultivo se les añaden 9 ml de metanol y se centrifugan a 13.000 rpm durante 2 minutos. El contenido en tiocolchicósido del sobrenadante se analiza mediante HPLC de fase inversa, con elución isocrática, por medio del sistema eluyente de agua:acetonitrilo 80:20. El análisis de HPLC demuestra que la conversión de tiocolchicina en tiocolchicósido comienza muy pronto y es casi completa tras 20 horas. Se transforma una cantidad total de 4 g/l de tiocolchicina en 5,2 g/l de tiocolchicósido, con un rendimiento de conversión del 96% y una productividad específica de 0,26 g/l.h de colchicinoide glucosilado.

#### Ejemplo 2

Se somete el caldo de cultivo final procedente de la fermentación (volumen total: aproximadamente 10 l), que contiene aproximadamente 52 g de tiocolchicósido tal como se determinó mediante análisis de HPLC, a una microfiltración de flujo cruzado en un cartucho de cerámica de 0,22 µm, para separar las células del caldo. Se absorbe el permeado en una columna rellena con una resina de absorción XAD 1180 (Rohm and Haas). Tras el lavado con agua, se eluye el producto con metanol. Se concentra hasta sequedad el eluato de metanol a vacío, después se redissuelve en metanol. Tras la extracción con cloruro de metileno, se concentra hasta sequedad la fracción de alcohol y se redissuelve en una mezcla de etanol-cloruro de metileno 1:1. Tras la clarificación con gel de sílice, se concentra la disolución a vacío; después se sustituye el cloruro de metileno por etanol. Se concentra la suspensión resultante y se deja cristalizar. Se lleva a cabo una segunda cristalización con etanol tras etapas de redisolución adicionales del sólido en mezclas de etanol-cloroformo y clarificación en gel de sílice. Se obtiene una cantidad total de 49,9 g de producto tras la purificación, con un rendimiento de purificación del 96% y una pureza del 99,5%.

El producto resultante, analizado mediante HPLC, C-RMN, H-RMN y espectro de masas, resulta ser el mismo que el patrón de tiocolchicósido.

#### Ejemplo comparativo 3

Se repite el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero se añade toda la tiocolchicina en una única fracción, a una concentración final de 4 g/l, al principio de la fermentación. El crecimiento resultante es muy escaso y prácticamente se bloquea tras unas pocas horas de incubación. Se detecta una lisis celular evidente mediante análisis microscópico. No se muestra una biotransformación significativa mediante análisis de CCF y HPLC.

## ES 2 329 132 T3

### Ejemplo comparativo 4

Se repite el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero sin adición alguna de 3-O-desmetiltiocolchicina en el cultivo de siembra preliminar (sin inducción enzimática). La biotransformación resulta ser más lenta que la del ejemplo 1 y se detiene tras 28 horas, con un rendimiento de conversión final del 61%, una productividad total de 3,3 g/l y una productividad específica de 0,118 g/l.h de tiocolchicósido.

### Ejemplo comparativo 5

(Correspondiente el documento WO 98/15642)

Se repite el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero se añade toda la tiocolchicina en una única fracción, a una concentración final de 1 g/l, al principio de la fermentación, usando el medio de fermentación ST tal como se describe en el documento WO98/15642. La biotransformación resulta ser más lenta que la del ejemplo 1 y se detiene tras 28 horas, con un rendimiento de conversión final del 90%, una productividad total de 1,22 g/l y una productividad específica de 0,044 g/l.h de tiocolchicósido.

La siguiente tabla muestra una comparación en cuanto a productividad total, productividad específica y rendimiento de conversión de tiocolchicina en tiocolchicósido, entre el método de la presente invención (A) y el del documento WO98/15642 (B).

|                                                          | Productividad<br>(total) g/l | Productividad<br>(específica) g/l | Rendimiento de<br>conversión % |
|----------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| A *                                                      | 5,22                         | 0,261                             | 96                             |
| B *                                                      | 1,22                         | 0,044                             | 90                             |
| * sustrato (tiocolchicina) añadido; 4 g/l (A); 1 g/l (B) |                              |                                   |                                |

TABLA 1

*Formulación de los medios de cultivo*

Agar LB (esterilización: 121°C x 20') - pH 7

Triptona 10 g/l

Extracto de levadura 5 g/l

NaCl 10 g/l

Agar-agar 15 g/l

Caldo SF2 (esterilización: 121°C x 20') - pH 7

Glucosa 40 g/l

Peptona 20 g/l

Extracto de levadura 5 g/l

NaCl 3 g/l

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/l

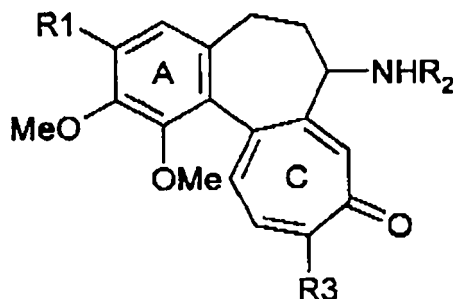
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/l

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de compuestos colchicinoides de 3-O-glicosilo de fórmula (I),



en la que  $R_1$  es un residuo de O-glicósido,  $R_2$  es hidrógeno o acilo  $C_1-C_7$ ,  $R_3$  es alcoxilo  $C_1-C_6$  o tioalquilo  $C_1-C_6$ , que comprende la biotransformación de un compuesto de fórmula (I) en la que  $R_1$  es metoxilo por medio de *Bacillus megaterium*, comprendiendo dicho procedimiento la alimentación fraccionada múltiple de un compuesto de fórmula (I) en la que  $R_1$  es metoxilo en combinación con una fuente de nitrógeno y de carbono, a un cultivo de siembra preliminar que contiene un colchicinoide desmetilado usado para inducir el sistema enzimático de glicosilación.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el colchicinoide desmetilado se selecciona de 3-O-desmetil-colchicina (DMC) y 3-O-desmetiltiocolchicina (DMTC).

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el colchicinoide desmetilado se añade en una cantidad que oscila desde 200 hasta 600 mg/l.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la fuente de nitrógeno y de carbono es peptona y glucosa.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sustrato total añadido al lote de fermentación es de 2-4 g/l.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la recuperación del producto se lleva a cabo por medio de resinas de absorción.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, llevado a cabo en un procedimiento semicontinuo, mediante la recuperación de la fracción principal (el 75%-90%) del caldo de fermentación final, que contiene el producto, la adición de medio de fermentación nuevo a la parte restante del caldo en el biorreactor, y el comienzo con un nuevo lote.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:

- una adición preliminar de un 3-O-desmetil-colchicinoide en el cultivo de siembra;
- la adición de alícuotas de 300-800 mg/l del sustrato colchicinoide que ha de convertirse, al principio y cada 1-3 horas, durante las primeras 14-18 horas de biotransformación;
- la adición, en cada momento de la alimentación de sustrato, de una disolución que contiene los siguientes materiales de partida:
  - a) peptona o triptona o hidrolizado de caseína, a una concentración final de 2-4 g/l, en combinación con sulfato de amonio 1-3 g/l;
  - b) glucosa o fructosa, a una concentración final de 5-15 g/l.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la biotransformación se lleva a cabo a 25°-35°C, a un pH de entre 4 y 8.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que se usan los niveles de aireación de 1-2 litros de aire por litro de cultivo por minuto (vvm).