

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 422**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 19/56 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2007 E 07009217 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 1990405**

54 Título: **Cepas modificadas genéticamente que producen metabolitos de antraciclina útiles como fármacos para el cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2017

73 Titular/es:
**PROVIVO OY (100.0%)
PO Box 26
04601 Mäntsälä, FI**

72 Inventor/es:
**LAMBERT, MICHAEL, DR. y
YLIHONKO, KRISTIINA, DR.**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 644 422 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

Cepas modificadas genéticamente que producen metabolitos de antraciclina útiles como fármacos para el cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a cepas genéticamente modificadas de *Streptomyces peuceitius* y al uso de tales cepas en la producción de mezclas de alto título de metabolitos de antraciclina, tales como 4'-epidaunorrubicina, 13-dihidro-epidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina y ε-rodomicinona por fermentación en lotes individuales, útiles en procesos aguas abajo de acuerdo con la presente invención para producir los ingredientes farmacéuticos activos epirubicina y/o idarrubicina.

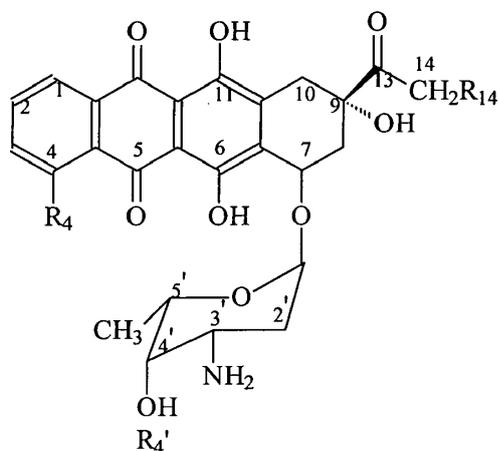
Antecedentes de la invención

10 Las daunomicinas son un grupo de antibióticos antitumorales producidos por varios *Streptomyces sp.*, tales como *S. peuceitius*, *S. coeruleorubidus*, *S. griseus*, *Streptomyces sp. C5*, *S. peuceitius var. caesius* y *S. bifurcus*. El compuesto básico del grupo es la daunomicina (DiMarco et al., 1964).

15 La daunomicina y su derivado hidroxilado en la posición 14, doxorubicina se han utilizado en la quimioterapia contra el cáncer desde 1967 y 1971, respectivamente. La daunomicina se utiliza particularmente para neoplasias malignas hematológicas, mientras que la doxorubicina exhibe un amplio espectro anticancerígeno. Teniendo en cuenta todas las antraciclinas conocidas actualmente en uso clínico, seis de cada siete son miembros del grupo de la daunomicina. Los procedimientos de fabricación de estos compuestos utilizan daunorrubicina o su aglicona, daunomicinona, como material de partida para la síntesis química.

20 Las antraciclinas han estado en uso para la quimioterapia del cáncer durante más de treinta años. La doxorubicina sigue siendo hoy en día el fármaco citotóxico más utilizado debido a su espectro extraordinariamente amplio de neoplasias malignas. La epirubicina, el segundo antibiótico antitumoral más importante poco después de la doxorubicina, se está volviendo aún más importante.

Las daunomicinas se pueden describir por la fórmula general I



25

y sus derivados más importantes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	R ₄	R ₁₄	Sustituyente 2'	4'
Daunorrubicina	OCH ₃	H		
Doxorrubicina	OCH ₃	OH		
Epirubicina	OCH ₃	OH		epi-isómero 4'
Idarrubicina	H	H		
Anamicina	H	OH	I	epi-isómero 4'

	R ₄	R ₁₄	Sustituyente 2'	4'
Pirarrubicina	OCH ₃	OH		4'-O-tetrahidropiraniolo
Valrubicina	OCH ₃	valerato		grupo trifluoroacetilo

La epirrubicina se utiliza clínicamente para muchos tipos de cáncer. El mercado está creciendo a medida que compite con la doxorubicina. Nuevas formulaciones, productos conjugados y nuevas combinaciones con otros fármacos contra el cáncer también expanden el uso de la epirrubicina. La epirrubicina se fabrica mediante un procedimiento que comprende la producción de daunorrubicina por fermentación y la modificación sintética del radical aglicona y azúcar, descrita por ejemplo en la patente de los Estados Unidos 5.874.550.

La idarrubicina (4-desmetoxi-daunorrubicina) se utiliza para tratar ciertos tipos de cáncer, incluyendo leucemia, linfoma y otras enfermedades de la médula ósea. Se afirma que causa menos efectos secundarios que la doxorubicina. Sin embargo, el mercado mundial anual de idarrubicina no supera los 20 kg, presumiblemente debido a su precio excepcionalmente elevado, debido a un procedimiento de fabricación muy complicado. La idarrubicinona se fabrica a partir de daunomicinona, obtenida de la fermentación de daunorrubicina con hidrólisis ácida subsiguiente. La daunorrubicinona se modifica de manera sintética adicionalmente a idarrubicinona. Un residuo de azúcar, la daunosamina, está unido por una serie de reacciones sintéticas complicadas, como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.325.946.

Antes de la ingeniería genética, la generación de cepas que producían las sustancias no endógenas deseadas era casi imposible. Aun cuando las modificaciones en la estructura química son menores, p. ej., la epidaunorrubicina difiere de la daunorrubicina sólo en la estereoquímica del grupo OH 4' en el radical de daunosamina; son necesarias varias mutaciones para causar las alteraciones. Esto significa que se necesitan varias rondas de mutagénesis y se necesita seleccionar y probar millones de clones con el fin de encontrar un cambio deseado en una estructura química.

Hoy en día es bien sabido que la modificación genética de las cepas bacterianas facilita la producción de metabolitos no endógenos. Sin embargo, también es bien sabido que estas cepas acumulan los metabolitos extraños, compuestos híbridos, en cantidades pequeñas aunque se producen metabolitos endógenos en un nivel relativamente alto. Este hecho da como resultado una economía pobre y los procedimientos a menudo no son comercialmente factibles.

La Publicación de patente europea EP1123310 describe una modificación satisfactoria del radical de azúcar de las antraciclinas introduciendo el gen *snogC* en una cepa productora de antraciclina que da como resultado la formación de aklavinona-4'-epi-2-desoxifucosa. Sin embargo, los títulos de producción permanecen bajos como se ha discutido anteriormente.

Además, la purificación de un metabolito deseado de la matriz compleja que comprende típicamente 10-20 productos similares a menudo no tiene éxito. Otra razón más para obtener bajos rendimientos es una escasa resistencia frente a compuestos no endógenos por las cepas productoras. La adaptación de la cepa productora a un metabolito no endógeno por medio de la adición por etapas de un producto tóxico, tal como epidaunorrubicina, epirrubicina o idarrubicina al caldo de cultivo, consume tiempo y, preferentemente, da como resultado la acumulación de un metabolito que es menos tóxico para la cepa productora.

Recientemente se ha informado de algunos progresos en cuanto al rendimiento y la economía de la producción biotecnológica de la epirrubicina de antraciclina, por ejemplo en la Publicación de Patente Internacional WO 2006/111561 A1. Mediante la mutagenización de una cepa de la especie *Streptomyces peucetius* se obtuvo una cepa microbiana que produce epidaunorrubicina (un precursor de la epirrubicina) y/o la propia epirrubicina a concentraciones de al menos 0,1 g/l de caldo de cultivo.

La ruta biosintética para las antraciclinas y las especificidades del sustrato se describen en varias publicaciones (para una revisión reciente véanse Niemi et al., 2002, o K. Madduri, Nature Biotechnology, Nature, New York, NY, US vol. Núm. 1, Enero 1988, págs. 69-74), aunque no se comprenden completamente las etapas finales de la biosíntesis de daunomicina, las reacciones que modifican el radical aglicona después de la glicosilación y la genética molecular de la misma. La ruta biosintética se muestra en la Figura 1.

El triunfo de las antraciclinas parece ser continuo. Varias nuevas formulaciones, productos conjugados, nuevas moléculas y profármacos de la clase de la daunomicina están en desarrollo para fármacos contra el cáncer. La producción de antraciclina a partir de la daunorrubicina por medio de síntesis química es un procedimiento de múltiples etapas que da como resultado rendimientos relativamente bajos, lo que sugiere que se necesitan mejores procedimientos. Por lo tanto, existe una necesidad bien reconocida de mejores cepas productoras y procedimientos de producción eficaces y comercialmente viables.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una presentación esquemática de la ruta biosintética para la clase de antraciclinas de la daunomicina.

La Figura 2 es una presentación esquemática de un procedimiento para producir y aislar epidaunomicinas en bruto y ϵ -rodomicinona a partir de un lote de fermentación.

- 5 La Figura 3 muestra un cromatograma típico que identifica los metabolitos obtenidos a partir de una cepa microbiana con capacidades para la producción de alto título de epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona relacionadas con la presente invención. Perfil típico del metabolito: Rt = 6,950 13-DHED, Rt=7,850 4'-epi-feudomicina, Rt=8,725 4'-Epidaunorrubicina, Rt=15,842 ϵ -rodomicinona

Breve descripción de la invención

- 10 A lo largo de esta descripción, las epidaunomicinas, tales como la epidaunorrubicina (CAS núm. 56390-08-0), 13-dihidro-epidaunorrubicina = 4'-epi-daunorrubicinol (denominada en lo sucesivo 13-DHED) y epi-feudomicina (designada análogamente a Feudomicina B) se denominan colectivamente epidaunomicinas.

- 15 La presente invención se refiere a cepas productoras genéticamente modificadas mejoradas, preferiblemente cepas derivadas de *Streptomyces peuceitius*, que producen una mezcla de metabolitos de antraciclina, incluyendo metabolitos no endógenos, tales como epidaunomicinas, con un título de al menos 0,5 g por litro de caldo de cultivo, y que producen al menos 0,1 g/l de caldo de fermentación de cada uno de los compuestos epidaunorrubicina, 13-dihidro-epidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina y ϵ -rodomicinona. Estos metabolitos de antraciclina se pueden utilizar para la producción subsiguiente de antibióticos de antraciclina, particularmente epirubicina e idarrubicina.

- 20 En el presente trabajo los autores de la presente invención han utilizado una cepa mutante de *S. peuceitius* var. *caesius*, depositada en DSMZ con el Núm. de depósito DSM 12245, que está bloqueada en la biosíntesis de baumicinas, y es capaz de producir daunomicina a un título más de cien veces mayor que la cepa de tipo salvaje. La cepa también produce mayores cantidades de ϵ -rodomicinona. Adicionalmente la cepa fue modificada genéticamente reemplazando el gen funcional *dnmV* (Otten et al., 1997) por el gen *ekr8* dando como resultado una estereoquímica opuesta en la posición 4' de los metabolitos de daunomicina proporcionando así la familia de metabolitos de epidaunomicina. El gen utilizado para el reemplazo se encontró sorprendentemente en un experimento de clonación con pistola génica relacionado con el aislamiento de genes a partir de cultivos bacterianos con una sonda derivada de *snog C* (Torkkell et al., 2001). La cepa genéticamente modificada, denominada G001/pB70dv, acumuló los metabolitos de epidaunorrubicina, aproximadamente 800 mg por 1 litro de caldo de cultivo y simultáneamente se produjo ϵ -rodomicinona a un nivel relativamente elevado; 200-300 mg/l.

- 30 Sin embargo, una mezcla de metabolitos de epidaunomicina encontrada contenía compuestos 4-OH llamados epi-carminomicinas haciendo algo complicado el procedimiento de purificación.

- 35 Se introdujeron diferentes constructos génicos disponibles en una cepa obtenida por eliminación del plásmido pB70dv de la cepa anfitriona G001 y, sorprendentemente, el plásmido pB89rdmB produjo metabolitos de epidaunomicina sin epi-carminomicinas. Además, se obtuvo un incremento inesperado en el título de producción cuando este cultivo de cepa se trató una vez más con un mutágeno. Se estudiaron 200 mutantes en cultivos de tubos de ensayo para la producción de epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona y se identificaron cepas de alta producción que producían más de 1 g de metabolitos de antraciclina por litro de caldo de cultivo. Estas cepas producen buenas mezclas de los metabolitos de la epidaunomicina y la ϵ -rodomicinona: Típicamente epidaunorrubicina:13-DHED:4'-epi-feudomicina: ϵ -rodomicinona con títulos de 600 mg/l: 500 mg/l 200 mg/l 200 mg/l, respectivamente.

- 40 La glicosilación del radical aglicona no prosigue completamente con estas cepas y el intermedio biosintético crítico, la ϵ -rodomicinona, se encuentra en cantidades notables en el caldo de cultivo. El cultivo de estas cepas modificadas genéticamente utilizando una resina en caldo de fermentación da lugar a títulos aún más altos de metabolitos y facilita el procedimiento aguas abajo.

- 45 La presente invención se refiere adicionalmente a un método para producir y aislar epidaunomicinas en bruto, incluyendo epidaunorrubicina, 13-dihidro-epidaunorrubicina (13-DHED), 4'-epi-feudomicina y ϵ -rodomicinona a partir de un único lote de fermentación. El esquema del procedimiento de acuerdo con la presente invención se describe generalmente en la Figura 2.

- 50 La presente invención tiene como objetivo maximizar la producción de epidaunomicina y ϵ -rodomicinona, minimizando la producción de productos secundarios no endógenos y simplificar de esta manera el procedimiento aguas abajo subsiguiente. Los aspectos importantes de una cepa productora adecuada para su uso en el procedimiento de producción de la presente invención son

i) que el perfil del metabolito bruto sea adecuado para el procesamiento aguas abajo y;

ii) que la capacidad de producción en exceso no esté limitada por una sensibilidad de la cepa a las epidaunomicinas

y la ϵ -rodomicinona.

En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, se utiliza un solo lote de fermentación como fuente de material sintético tanto para la epirrubicina como para la idarrubicina, es decir, ambas antraciclinas comercialmente importantes.

5 Descripción detallada de la invención

Teniendo en cuenta el inconveniente conocido de la técnica anterior, tendría un interés económico esencial, poder proporcionar en una fermentación discontinua individual un alto título de una mezcla de metabolitos no endógenos, adecuada para la posterior fabricación de más de un antibiótico de antraciclina, particularmente epirrubicina e idarrubicina. Para simplificar los procesamientos aguas abajo subsiguientes, un aspecto aún más económico
10 consiste en evitar la formación adicional de compuestos endógenos en la medida de lo posible. Todo esto es objeto de la presente invención.

La producción de una antraciclina, tal como la epirrubicina, mediante fermentaciones discontinuas individuales utilizando cepas microbianas optimizadas es un comienzo para obtener propósitos de producción más eficientes. Sin embargo, la mejor solución para los procedimientos de producción comercialmente viables sería trabajar con cepas
15 microbianas modificadas que suministren en una fermentación discontinua individual en un momento dado, un alto título de una mezcla de metabolitos útiles como material de partida para la producción de más de un antibiótico de antraciclina.

La presente invención proporciona cepas productoras mejoradas para su uso en un procedimiento para producir epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona por medio de fermentación. Estas cepas producen metabolitos de antraciclina con
20 un título de al menos 0,5 g/l, en donde las cepas producen al menos 0,1 g/l de caldo de fermentación de cada uno de los compuestos epidaunorrubicina, 13-dihidro-epidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina y ϵ -rodomicinona.

Varias cepas de *Streptomyces* son capaces de producir daunomicina, mientras que *S. peucetius* se utiliza preferiblemente como cepa productora para las epidaunomicinas en la presente invención. A lo largo de la presente descripción, incluyendo los ejemplos de trabajo, se utiliza *S. peucetius var. caesius* G001 (DSM12245) como cepa
25 parental que se utiliza para modificaciones genéticas para obtener la cepa que acumula epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona.

Sin embargo, cualquier cepa que comparta las siguientes características es adecuada para este procedimiento:

1. Capacidad de alta producción de metabolitos de epidaunomicina; superior a 0,1 g/l en total.
2. Un sistema incompleto de glicosilación para obtener ϵ -rodomicinona en el procedimiento de fermentación; más de
30 10% de la fracción total de metabolitos de antraciclina.
3. Todos los metabolitos epidaunorrubicina, 13-DHED, epi-feudomicina y ϵ -rodomicinona se producen en cantidades de al menos 10% de la fracción total de metabolitos de antraciclina.
3. La vía biosintética para producir daunorrubicina y metabolitos relacionados está bloqueada.

Se utilizó una cepa mutante de *S. peucetius var. caesius* G001 como cepa parental de esta invención. Sin embargo,
35 son igualmente adecuadas otras cepas que comparten maquinaria biosintética para la producción de daunomicinas. La cepa se bloqueó en la producción de baumicinas mediante un mutágeno químico, NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina), y el gen correspondiente, *dnrH*, se secuenció con el fin de identificar la mutación puntual dando como resultado el bloqueo de la producción de baumicinas. La mutación puntual causó el cambio en el aminoácido; Gly fue sustituido por Asp. Aunque cualquier productor de daunorrubicina es adecuado, una cepa de alta producción bloqueada en la biosíntesis de baumicinas es una cepa anfitriona preferida para esta invención.
40

La clonación de los genes para la 4'-ceto-reductasa se puede realizar por medio de cualquier método conocido que dé lugar a la disponibilidad del gen que se expresará en un anfitrión seleccionado. Los autores de la presente invención utilizaron un fragmento de ADN derivado del gen *snogC*, que Ylihonko et al. (1999) demostraron
45 previamente que creaba 4'-epi-antraciclinas, como una sonda para escrutar los correspondientes genes de ceto-reductasa con una mejor acción concomitante con glicosil transferasas de la vía de la daunosamina, p. ej., *ekr8*. Utilizando *E. coli* como una cepa anfitriona para una biblioteca génica, la hibridación es una estrategia de escrutinio ventajosa. La sonda para la hibridación puede ser cualquier fragmento derivado de *snogC* o un gen similar y generado por subclonación con sitios de restricción adecuados o por amplificación mediante PCR. Las colonias para la biblioteca génica se transfieren a membranas para la hibridación en filtro, y se utilizan típicamente
50 membranas de nailon. Se puede utilizar cualquier método de detección para la hibridación pero, en particular, es útil el Sistema DIG (Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania). Dado que la sonda es heteróloga con respecto al ADN hibridado, es preferible llevar a cabo lavados rigurosos de hibridación a 65°C a una concentración baja de sal, de acuerdo con el manual de Boehringer Mannheim, DIG System User's Guide for Filter hybridization. La funcionalidad del gen se demostró mediante experimentos para detectar epidaunomicinas (además de ϵ -rodomicinona) en el caldo
55 de cultivo por la cepa que porta *ekr8* clonado en un vector de expresión de alto número de copias,

pJJE486. Cualquier gen de 4'-ceto-reductasa que pueda convertir la estereoquímica del grupo 4'-OH en daunosamina es adecuado para la clonación en una cepa productora de daunorrubicina para generar la producción de epidaunomicina (además de ϵ -rodomicinona) de acuerdo con la presente invención, pero se prefiere que el gen sea expresado a un alto nivel.

5 De acuerdo con la ruta biosintética para las daunomicinas, el gen *dnmV* (Otten et al., 1997) es responsable de la etapa de ceto-reducción en la ruta de la daunosamina. Este gen particular es un competidor para un gen transferido y es, por lo tanto, preferiblemente inactivado o eliminado. La inactivación del gen *dnmV* se puede conseguir por medio de cualquier técnica conocida para interrumpir una función génica. Con este fin se prefiere la recombinación homóloga para la inactivación génica. También es posible causar una mutación en el gen mediante técnicas aleatorias tales como la mutagenización química.

10 El gen *ekr8* se clonó en diferentes constructos en una cepa, obtenida por disminución del plásmido de la cepa parental G001, y se analizaron los metabolitos de las cepas obtenidas. El perfil del metabolito de un clon se consideró prometedor para los efectos aguas abajo. Este clon lleva el plásmido pB89rdmB (*rdmB*, véase Jansson et al., 2003) y produce epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona a un título que corresponde aproximadamente a 50% de la cantidad de daunomicinas producidas por la cepa G001. El plásmido pB89rdmB contiene los genes *ekr8* y *rdmB*. Este clon se designó como G005a. El constructo del gen podría expresarse en cualquier vector capaz de replicar en estreptomicetos. Sin embargo, se utiliza preferiblemente como vector un plásmido de alto número de copias. Para esta invención se encontró que era ventajoso el vector plasmídico pJJE486 (Ylihonko et al., 1996).

20 Se han descrito varios métodos para introducir ADN en células anfitrionas. Un procedimiento altamente preferido consiste en la transformación de protoplastos y se utiliza a lo largo de todo este trabajo. Sin embargo, son útiles cualquier método y cualquier vector utilizados para generar una cepa que tenga las características de una cepa de acuerdo con la presente invención, y descrita anteriormente.

25 Se encontró que la cepa mencionada anteriormente, que contenía el plásmido pB89rdmB, era algo sensible a las epidaunomicinas puesto que la resistencia endógena contra las daunomicinas no era suficiente y daba como resultado una escasa estabilidad de la cepa como se observó por los cambios en los títulos de producción encontrados en cultivos repetidos. El aumento de la resistencia mediante la adaptación con epirubicina o epidaunorrubicina dio lugar a mayores títulos de 13DHED. El cultivo de la cepa se trató en condiciones rigurosas con un mutágeno y aunque se podrían utilizar mutágenos químicos, se prefiere NTG. Se obtuvo un clon procedente del tratamiento de mutagénesis con aumento de la producción de los mismos metabolitos en comparación con el clon que contenía pB89rdmB, se observó la estabilidad a largo plazo. La estabilidad es crucial para la producción comercial y por lo tanto era extremadamente ventajosa aunque sorprendente.

30 El nuevo clon logra el pico del nivel de producción en el octavo día, mientras que el sexto día es el mejor para la cepa parental G001. Típicamente, la cepa mutante produce epidaunorrubicina, 13-DHED, epi-feudomicina y ϵ -rodomicinona como productos principales, mientras que el resto de la fracción de antraciclina cubre menos de 10% del rendimiento. La Tabla 2 proporciona información sobre los perfiles típicos de los metabolitos de las cepas para la presente invención. Las cantidades se indican en mg/l

Tabla 2.

Cepa	4'-epi-daunorrubicina	13-DHED	4'-epi-feudomicina B	Otras epidaunomicinas (no especificadas)*	ϵ -rodomicinona
G001/pB70dv	250-350	50 - 150	na	350 - 450	200 - 300
Clon que contiene pB89rdmB	350 - 450	250 - 400	150 - 250	<100	150 - 300
Mutagenización NTG	500 - 700	400 - 600	150 - 300	<100	150 - 300
* principalmente epicarminomicinas					

40 Una dificultad bien conocida cuando se intenta utilizar *S. peucetius* o cepas relacionadas en la fabricación de antraciclinas para uso clínico es la escasa estabilidad, los cambios en el título de producción de cultivos de las cepas en términos de productividad. No es económicamente viable utilizar dichas cepas y, como mucho, provoca desventajas económicas apreciables y, en el peor de los casos, conduce a una falta de fármacos citotóxicos deseados para pacientes con cáncer. El efecto de la inestabilidad de las cepas en su productividad es una consecuencia de la mutagenicidad de la daunorrubicina y los metabolitos relacionados. Por lo tanto, una cepa productora estable de acuerdo con la presente invención es ventajosa para la fabricación de antraciclinas, y una

garantía para el suministro continuo de fármacos anticancerosos citotóxicos importantes.

El cultivo de una cepa productora modificada de acuerdo con la presente invención, preferiblemente una cepa de *Streptomyces*, más preferiblemente una cepa de *Streptomyces peucetius*, se puede llevar a cabo en un medio que contiene fuentes nutrientes adecuadas. Un medio preferido es el medio E1, que se describe en el Experimento 2. El cuerpo del plásmido de pJJE486 incluye un gen responsable de la resistencia al tioestrepton. Por lo tanto, los protocolos experimentales generales sugerirían un mantenimiento de la presión de selección para mantener la cepa que contiene el plásmido en los cultivos. Sorprendentemente, sin embargo, los cultivos de dicha cepa en ausencia de tioestrepton no provocaron la pérdida del plásmido clonado, lo que sugiere que se prefiere el medio E1 sin el antibiótico suministrado en los cultivos.

10 La adición de una resina adsorbente a un caldo de cultivo se describe en procedimientos para antraciclinas (Torkkell et al., 2001 y Metsä-Ketelä et al., 2003). El producto tóxico que es también un mutágeno afecta de dos maneras; (i) menor producción causada por el efecto tóxico y (ii) mutagenización de una cepa productora. Por tanto, es preferible un adsorbente que no interfiera en el producto o la bacteria en el cultivo, pero adsorba tanto los metabolitos excretados como los acumulados en las células.

15 En una realización preferida de la presente invención, se añade un adsorbente no iónico al medio antes o durante el cultivo para recoger los metabolitos del caldo de fermentación, aumentando la recuperación por lote. Una resina de poliestireno, tal como Amberlite XAD-7 (CAS núm. 37380-43-1) (Rohm & Haas Alemania GmbH, Frankfurt) o Diaion HP-20 en un medio adecuado, tal como E1 descrito con más detalle en la sección experimental, aumenta la recuperación de epidaunorrubicina-13-DHED y de epi-feudomicina. La ϵ -rodomicinona es también adsorbida del caldo de fermentación. El mayor rendimiento se debe a la capacidad de adsorción extremadamente fuerte del XAD-7 para los metabolitos de la epidaunomicina por entrecruzamiento de las moléculas. Las epidaunomicinas brutas obtenidas como rendimiento de recuperación contienen aproximadamente 500 - 700 mg/l de epidaunorrubicina, 400 - 600 mg/l de 13-DHED, 150 - 300 mg/l de 4'-epi- feudomicina y 150 - 300 mg/l de ϵ -rodomicinona. Si se utiliza Diaion HP-20 como adsorbente, se recuperan los mismos rendimientos, pero la cantidad de adsorbente añadido como suplemento al medio E1 tiene que ser significativamente mayor.

20 El procedimiento de fermentación se puede llevar a cabo en cualquier condición que permita la máxima producción de epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona. Sin embargo, resulta ventajoso llevar a cabo fermentaciones en un intervalo de temperatura de 26°C a 34°C a pH 6,5-7,5 durante 7 a 14 días. El adsorbente se puede añadir en cualquier momento del cultivo, pero el mejor rendimiento se obtiene si el adsorbente se añade al cultivo al comienzo del cultivo.

25 Las sustancias adsorbidas en la resina adsorbente, que comprenden principalmente epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona, se separaron del caldo de cultivo por decantación. La resina se extrajo utilizando disolventes orgánicos, siendo preferidos el metanol y el butanol. Se recomienda una cantidad de disolvente de 10-50% del volumen del caldo de cultivo en un fermentador. La extracción repetida de 1 a 5 veces libera el adsorbente utilizado de todos los metabolitos de la antraciclina, y la resina es reciclable después del lavado con agua.

30 La separación de la fracción de aglicona, que contiene ϵ -rodomicinona, es ventajosa después de la recuperación de todos los metabolitos del adsorbente.

Procesamiento adicional de las antraciclinas brutas

Conversión de 13-DHED en epidaunorrubicina

40 La 13-DHED, se separa fácilmente de la fracción glicosídica por medio de cromatografía seguida de cristalización junto con la separación de epidaunorrubicina. La 13-DHED se podría adsorber en una resina añadida al caldo de cultivo de la cepa *Streptomyces* con capacidades para la síntesis de daunomicina y especialmente las últimas etapas. Aún cuando cualquier cepa es adecuada, resulta ventajoso utilizar la cepa que está bloqueada en la ruta biosintética temprana y no es capaz de acumular metabolitos de daunomicina.

45 Conversión de epidaunorrubicina en epirubicina

La epidaunorrubicina bruta (pureza \geq 80%) se utiliza como material de partida para la química sintética para obtener epirubicina, que es un fármaco para el cáncer de uso frecuente. Se puede utilizar cualquier serie de reacciones sintéticas o biocatalíticas para la hidroxilación de la posición 14.

50 Existen varias posibilidades de convertir la epidaunorrubicina en su forma hidroxilada en la posición 14, la epirubicina. El producto genético endógeno, la 14-hidroxilasa, no es suficientemente activo en las condiciones de cultivo para convertir toda la epidaunorrubicina formada en epirubicina aunque se encuentran cantidades menores de epirubicina en el caldo de cultivo. De acuerdo con los experimentos de los autores de la presente invención (datos no mostrados), incluso el elevado número de copias del gen para la 14-hidroxilasa, fracasó al completar el procedimiento para la producción de epirubicina. Sin embargo, dos publicaciones de patentes de los Estados Unidos, US 5.955.319 y US 6.210.930 describen la conversión de daunorrubicina en doxorubicina a un nivel bajo por el producto génico de *doxA*. Al parecer, la bioconversión es altamente dependiente de las condiciones, y los autores de

la presente invención no han logrado repetir el procedimiento.

Existen varias posibilidades de añadir un grupo hidroxilo en el C-14 de la epidaunorrubicina intacta, análogamente a la síntesis de doxorubicina a partir de daunorrubicina.

5 La purificación de la epirrubicina se lleva a cabo por medio de cromatografía y/o cristalización después de la extracción de epirrubicina de la mezcla de síntesis. Sin embargo, para lograr la calidad requerida para el ingrediente farmacéutico activo, es esencial la separación por cromatografía para proporcionar epirrubicina con una pureza \geq 97%.

Conversión de ϵ -rodomicinona en idarrubicina

10 Se sabe que la biosíntesis prosigue en la secuencia mostrada en la Figura 1. La aklavinona, un precursor típico de varias antraciclinas, está hidroxilada en la posición 11 para formar la ϵ -rodomicinona, que está glicosilada. Las modificaciones en la posición 10 necesitan una forma glicosilada aunque otros residuos de azúcar, tales como la rodosamina, son sustratos aceptados. Después de 10 modificaciones, tiene lugar la oxigenación en la posición 13 y la última etapa para la biosíntesis de daunorrubicina es una O-metilación en C-4. Por lo tanto, las modificaciones en 10 y 13 así como la glicosilación tienen éxito a pesar de la forma 4-desoxi. Tanto la 4-desoxiaclavina como la 4-desoxi- ϵ -rodomicinona se convierten en idarrubicina.

15 El procedimiento de la presente invención es, en efecto, eficaz ya que permite la producción y recuperación de ϵ -rodomicinona, epidaunorrubicina, 13 DHED y 4'-epi-feudomicina a partir de una sola fermentación.

20 Por las razones enumeradas anteriormente, resulta ventajoso utilizar una cepa de acuerdo con la presente invención en la fermentación para producir epirrubicina e idarrubicina para uso comercial. El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite la producción de las antraciclinas importantes con un alto rendimiento con bajo coste. El diagrama del procedimiento de fermentación se describe en la Figura 2.

Se proporciona una descripción más detallada de la presente invención en los ejemplos siguientes.

25 Resultará obvio para un experto en la técnica que, a medida que avanza la tecnología, el concepto de la invención se puede implementar de diversas maneras. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos anteriormente, pero pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de cepas microbianas que producen altos títulos de epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona

30 La manipulación del ADN de *Streptomyces* se realizó en *E. coli* y el ADN propagado se introdujo a continuación en cepas de *Streptomyces*. Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepa/plásmido	Descripción	Referencia o Fuente
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Anfitrión de clonación de <i>E. coli</i>	Stratagene
G001	Cepa de <i>Streptomyces</i> productora de daunomicina	DSM12245
G001/pB70dv	Cepa de <i>Streptomyces</i> productora de epidaunomicinas y epi-carminomicinas	DSM 19076

35 Los cultivos de *Streptomyces* y cepas de *E. coli* así como los aislamientos y las manipulaciones de ADN se llevaron a cabo como se describe en los manuales de laboratorio de Hopwood et al. (1985) y Sambrook et al. (1989), respectivamente. Los plásmidos se introdujeron en cepas de *E. coli* mediante electroporación de alta tensión y en *Streptomyces* mediante transformación de protoplastos (Ylisonko et al., 1996).

40 El gen *snog C* se utilizó como una sonda para la clonación de los genes correspondientes de las bibliotecas de genes de estreptomicetos. Los genes clonados y propagados en *E. coli* se transfirieron a G001 en un vector pJJE486 y los productos obtenidos en cultivos a pequeña escala se estudiaron mediante la comparación con los productos de G001. De esta manera se encontró que el clon que portaba *ekr8* producía epidaunomicinas además de daunomicinas. Se seleccionó el clon que era incapaz de producir metabolitos típicos de daunorrubicina mientras que

acumulaba epidaunomicinas y se denominó G001/pB70dv (núm. de depósito: DSM 19076). Los productos obtenidos en el cultivo del clon en las condiciones descritas en el Ejemplo 2, revelaron tanto epidaunomicinas como epi-carminomicinas.

5 El plásmido que contenía el clon G001/pB70dv se cultivó varias rondas en medio TSB (Caldo de Triptona de Soja modificado Oxoid en polvo de 30 g por 1 litro) para eliminar el plásmido. La cepa obtenida no portaba el plásmido y producía agliconas. El gen *ekr8* se clonó en diferentes constructos que portaban los genes implicados en etapas tardías de biosíntesis de antraciclina y se introdujeron en la cepa productora de aglicona mencionada anteriormente. Se estudió el análisis de muestras de cultivos a pequeña escala en las condiciones descritas en el ejemplo 2 y el clon obtenido que portaba el plásmido pB89rdmB podía producir metabolitos de epidaunomicina mientras que las epi-carminomicinas ya no se acumulaban en el caldo de cultivo. Las cantidades se muestran en la Tabla 2 anterior.

15 La producción de epi-carminomicinas puede ser el resultado de una actividad incompleta de la 4-O-metilasa en el clon G001/pB70dv. Por lo tanto, se sugirió que el gen *rdmB* que había sido clonado en el constructo pB89rdmB era responsable de la biosíntesis completa para evitar las epi-carminomicinas. *rdmB* (ACCESO U10405) muestra una alta similitud de secuencia con *dnrK*, aunque la actividad O-metil transferasa no ha sido demostrada (véase Jansson et al., 2003).

20 La cepa que portaba pB89rdmB se mutagenizó adicionalmente mediante NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) (Sigma-Aldrich). Se recogieron aproximadamente 200 colonias sobre placas de agar después de la mutagenización y se cultivaron primero en 3 ml de medio E1. Para más detalles de las condiciones de cultivo, véase el ejemplo 2 a continuación. Los clones obtenidos mediante mutagenización aleatoria con una mejor producción de epidaunomicinas y un perfil de producto idéntico al de la cepa portadora de pB89rdmB se cultivaron varias veces. Finalmente, se seleccionaron cepas microbianas que eran capaces de producir metabolitos de epidaunomicina más que el clon portador de pB89rdmB en las mismas proporciones y sin tioestrepton en el medio para la presión de selección.

25 La estabilidad de tales cepas para su idoneidad en la producción comercial se demostró mediante catorce cultivos repetidos (datos no mostrados).

Ejemplo 2.

Cultivo y perfil de producto de cepas microbianas que producen altos títulos de epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona

30 Las cepas, obtenidas como se describe en el ejemplo 1, se cultivaron en 50 ml de medio E1 con un suplemento de XAD-7 (15 g/l). (E1: Por litro de agua del grifo: glucosa 20 g; almidón soluble 20 g; Péptido 5 g, Extracto de levadura 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 7-7,5).

35 Para determinar el título de producción se extrajeron los compuestos desde el cuarto día de crecimiento hasta el décimo día. Para determinar la cantidad de metabolitos de antraciclina producida, se decantó XAD-7 con agua de un matraz de cultivo y se extrajo XAD-7 con 40 ml de metanol agitando durante al menos 30 min. La HPLC se utilizó para analizar las muestras. El uso de XAD-7 en medio E1 aumentó el rendimiento de epidaunomicina a 500-700 mg/l desde aproximadamente 400-500 mg/l. Véanse otros productos de la Tabla 2. El tiempo de producción óptimo fue de once días. No se encontraron cambios en la morfología de las colonias al final del cultivo en presencia del adsorbente, lo que sugiere que es posible prevenir el efecto tóxico y mutágeno de los metabolitos de epidaunomicina adsorbiéndolos en XAD durante el cultivo.

40 Un cromatograma típico de los productos obtenidos se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 3

Producción de metabolitos de epidaunomicina y ϵ -rodomicinona en fermentación

45 El cultivo de siembra se realizó cultivando una cepa con la capacidad de producir un alto título de epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona en cuatro matraces con 60 ml de medio E1 con un suplemento de tioestrepton (5 mg/l) durante cuatro días. Se combinaron los cultivos y se utilizaron los 240 ml del caldo de cultivo para inocular un medio E1 de 20 l con un suplemento de XAD-7 (15 g/l) en el fermentador. La fermentación se llevó a cabo en un volumen de 20 litros durante 11 días a la temperatura de 30°C y 34°C, 350 rpm con aireación de 10 l/min.

Ejemplo 4

Recuperación y purificación de epidaunomicinas brutas y ϵ -rodomicinona.

50 4.1. Purificación de epidaunomicinas bruta

Los sustituyentes que contenían epidaunorrubicina y ϵ -rodomicinona adsorbidas en XAD-7 se decantaron a partir del caldo de cultivo de 20 litros obtenido de la fermentación. La resina se lavó para eliminar los restos celulares con agua. El sedimento se extrajo con 1 litro de metanol durante dos a cinco veces.

Las agliconas se extrajeron con cloroformo añadiendo 1 l de cloroformo a los 3 litros de extractos de metanol combinados. Se separaron las capas de disolvente y agua. Los glucósidos de la fase acuosa se extrajeron a cloroformo a un pH ligeramente alcalino y el pH se estabilizó con NaHCO₃ saturado. Las sales se eliminaron lavando con agua. Finalmente, la fase de cloroformo se filtró a través de un filtro de cartucho. El rendimiento de epidaunomicina utilizando dicho procedimiento correspondía al 70% del extracto bruto.

4.2 Purificación de ε-rodomicinona

La fracción de disolvente obtenida de la extracción en el párrafo 4.1. anterior se secó y se concentró hasta un volumen pequeño. La cromatografía instantánea se realizó utilizando cloroformo como eluyente. La fracción purificada se cristalizó disolviéndola en una mezcla de cloroformo-metanol y se concentró hasta un volumen pequeño y se obtuvo una pureza >90% de ε-rodomicinona. El producto precipitado seco se disolvió y la purificación se realizó mediante cromatografía instantánea utilizando un sistema disolvente con CHCl₃:acetona:metanol. Se extrajeron los glicósidos. Esto se realizó dos veces para maximizar el rendimiento.

Después de extraer todos los glicósidos al cloroformo, el pH se estabilizó mediante la extracción con NaHCO₃ saturado. A continuación, las sales se eliminaron extrayendo con agua RO dos o cuatro veces. Las fases se separaron con un separador bifásico.

Ejemplo 5.

Separación de compuestos individuales de la fracción de epidaunomicinas

Para separar la epidaunorrubicina, la 13-DHED y la epi-feudomicina de las epidaunomicinas obtenidas en el Ejemplo 4.1, se llevó a cabo una cromatografía. El cloroformo filtrado se bombeó a una columna de sílice y se purificó por medio de cromatografía utilizando una solución de cloroformo-metanol como fase móvil.

Se recogieron fracciones puras de cada uno de los tres metabolitos y se reunieron las fracciones de cada producto. A las fracciones de epidaunorrubicina, se les añadió butanol y se ajustó el pH ácido. Después de esto se inició la evaporación. Cuando la evaporación fue continua, la epidaunorrubicina comenzó a cristalizar. Los cristales se filtraron y se secaron en una cabina de vacío. Las fracciones de 13-DHED se cristalizaron por medio de soluciones de etanol-agua.

Ejemplo 6.

Conversión sintética de epidaunomicina bruta en epirubicina

La epidaunorrubicina purificada se convirtió en epirubicina por medio de síntesis química en forma de reacción en un solo recipiente que constaba de dos reacciones; bromación e hidrólisis. En la primera, la posición C-14 se sustituye con bromo y en la segunda etapa se hidroxila C-14 dando lugar a la formación de epirubicina. La epidaunorrubicina obtenida como se describe en el Ejemplo 5 se disolvió en metanol y se añadió bromo. La reacción se realizó a menos de 10°C y se analizó por medio de HPLC. La reacción de bromación se detuvo después de un día por adición de tampón de formiato sódico. El pH se ajustó a <3 y la temperatura de la mezcla se ajustó a 50-60°C. La reacción se controló con HPLC y cuando la cantidad de epirubicina no se incrementaba más, la reacción se detuvo por enfriamiento de la mezcla de reacción.

La purificación se realizó por cromatografía de sílice de fase inversa. Las fracciones se recogieron y se analizaron con HPLC y se reunieron las fracciones puras (pureza > 97%). Después de la cristalización se obtuvo una pureza superior al 98%.

Ejemplo 7.

Medición analítica de agliconas y antraciclinas

HPLC:

Equipo: Jasco HPLC.

Columna: Phenomenex, Aqua, 150 x 4.6 mm, 3 μm

Disolvente A: TEA al 0,05% (pH = 2,0 con TFA)

Disolvente B: MeOH al 10% en THF

Temperatura de la columna: temperatura ambiente

Velocidad de la corriente: 1 ml/min

Detección: UV-Vis, 480 nm

Volumen de inyección: 5 µl

Gradiente:

tiempo (min)	Disolvente A [%]	Disolvente B [%]
0	80	20
10	60	40
27	45	55
28	10	90
30	10	90
31	80	20
36	80	20

5 Microorganismos depositados

El siguiente microorganismo se depositó bajo las normas del Tratado de Budapest en DMSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania

Microorganismo	Número de acceso	Fecha de depósito
G001/pB70dV	DSM 19076	23-02-2007

Lista de referencias

- 10 Di Marco A, Silvestrini R, Gaetani M, Soldati M, Orezzi P, Dasdia T, Scarpinato BM, Valentini L: 1964, 'daunomycin', a new antibiotic of the rhodomycin group. *Nature* 15: 706-707.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM y Schrempf H (1985) *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual*. John Innes Foundation, Norwich.
- 15 Jansson A, Niemi J, Lindqvist Y, Mantsala P y Schneider G (2003) Crystal structure of aclacinomycin-10-hydroxylase, a S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase homolog involved in anthracycline biosynthesis in *Streptomyces purpurascens*. *J Mol Biol* 334:269-280.
- Metsä-Ketelä M, Palmu K, Kunnari T, Ylihonko K y Mäntsälä P (2003) Engineering Anthracycline Biosynthesis toward Angucyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (4), 1291-1296
- 20 Niemi J, Kantola J, Ylihonko K, Mäntsälä, P. (2002) Anthracycline biosynthesis: stps, enzymes and genes (revisión) in *Microbial secondary metabolites: biosynthesis, genetics and regulation* (eds. Francisco Fierro & Juan Francisco Martin). *Research Signpost* 37/661, Kerala, India.
- Otten SL, Gallo MA, Madduri K, Liu X, Hutchinson CR. (1997) Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius* dnmZUV genes encoding three enzymes required for biosynthesis of the daunorubicin precursor thymidine diphospho-L-daunosamine. *J Bacteriol.* 179 (13), 4446-50.
- 25 Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Torkkell S, Kunnari T, Palmu K, Mäntsälä P, Hakala J y Ylihonko K (2001) 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* 266:276-288.

Torkkell S. 2001, Anthracycline antibiotics: Biosynthetic pathway and molecular genetics of nogalamycin, a product of *Streptomyces nogalater*. Publications in Annales Universitatis Turkuensis-series nr: 275.

Ylihonko K, Tuikkanen J, Jussila S, Cong L y Mäntsälä P (1996) A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early blocked mutations of the anthracycline pathway. *Mol Gen Genet* 251:113-120

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa microbiana de la especie *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, que produce metabolitos de antraciclina con un título de al menos 0,5 g/l, en donde la cepa produce al menos 0,1 g/l de caldo de fermentación de cada uno de los compuestos epidaunorrubicina, 13-dihidro-epidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina y ϵ -rodomicinona, pudiéndose obtener dicha cepa (i) proporcionado la cepa de *Streptomyces peucetius* var. G001/pB70dv, depositada con el número de acceso DSM 19076, (ii) retirando el plásmido de dicha cepa mediante cultivo de dicha cepa varias rondas en medio TSB (30 g de Caldo de Triptona de Soja Oxoid en polvo por 1 litro), y (iii) transformando dicha cepa con un plásmido que contiene los genes *ekr8* y *rdmB*.
- 10 2. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde esta cepa es productora de cualquiera de los compuestos epidaunorrubicina, 13-dihidro-epidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina y ϵ -rodomicinona en al menos 10% de la fracción total de metabolito de antraciclina.
3. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la biosíntesis de metabolitos endógenos de daunomicina está bloqueada.
- 15 4. La cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha producción de baumicina está bloqueada por mutagenización aleatoria.
5. Un procedimiento para producir metabolitos de antraciclina por fermentación utilizando una cepa productora microbiana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dichos metabolitos de antraciclina se seleccionan del grupo que consiste en epidaunomicinas y ϵ -rodomicinona.
- 20 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en donde dichos metabolitos de antraciclina se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en epidaunorrubicina, 13-dihidroepidaunorrubicina, 4'-epi-feudomicina y ϵ -rodomicinona.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, en donde las epidaunomicinas brutas y la ϵ -rodomicinona se absorben a partir del caldo de fermentación añadiendo una resina en cualquier momento.
- 25 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha resina se selecciona del grupo de adsorbentes iónicos y no iónicos.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha resina se selecciona del grupo de poliestirenos.
- 30 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha resina se selecciona del grupo que consiste en XAD-7 y Diaion HP-20.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, en donde dicha resina se añade en una cantidad de 1 - 100 g/l.
- 35 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha resina se añade preferiblemente en una cantidad de 15 - 40 g/l.

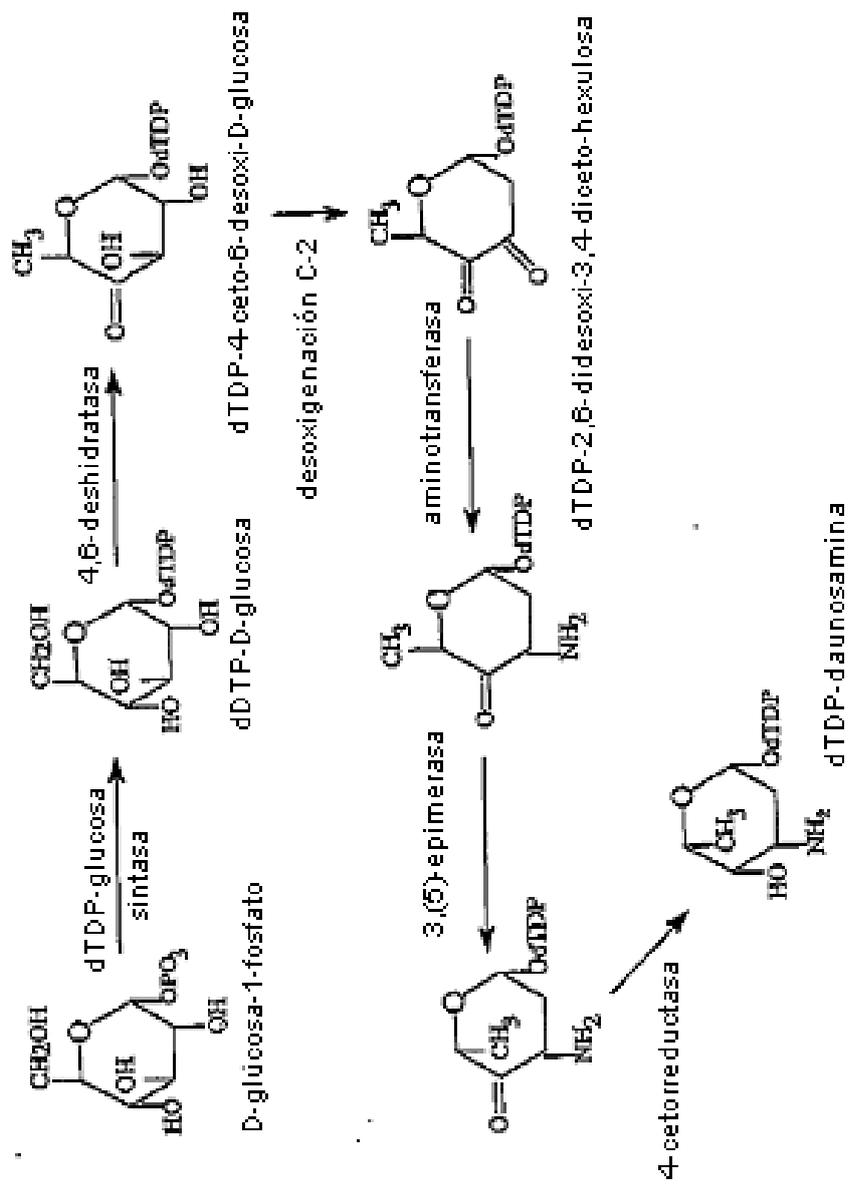


Figura 2.

Esquema de un procedimiento de fermentación de epidaunomicinas brutas y purificación de dichos metabolitos.

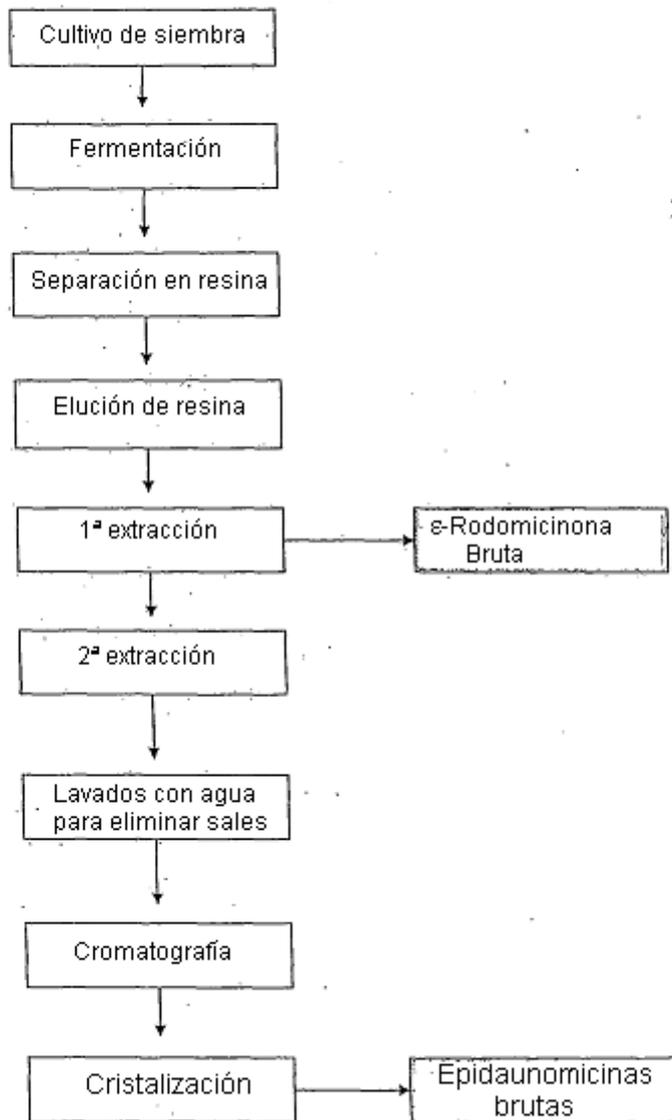
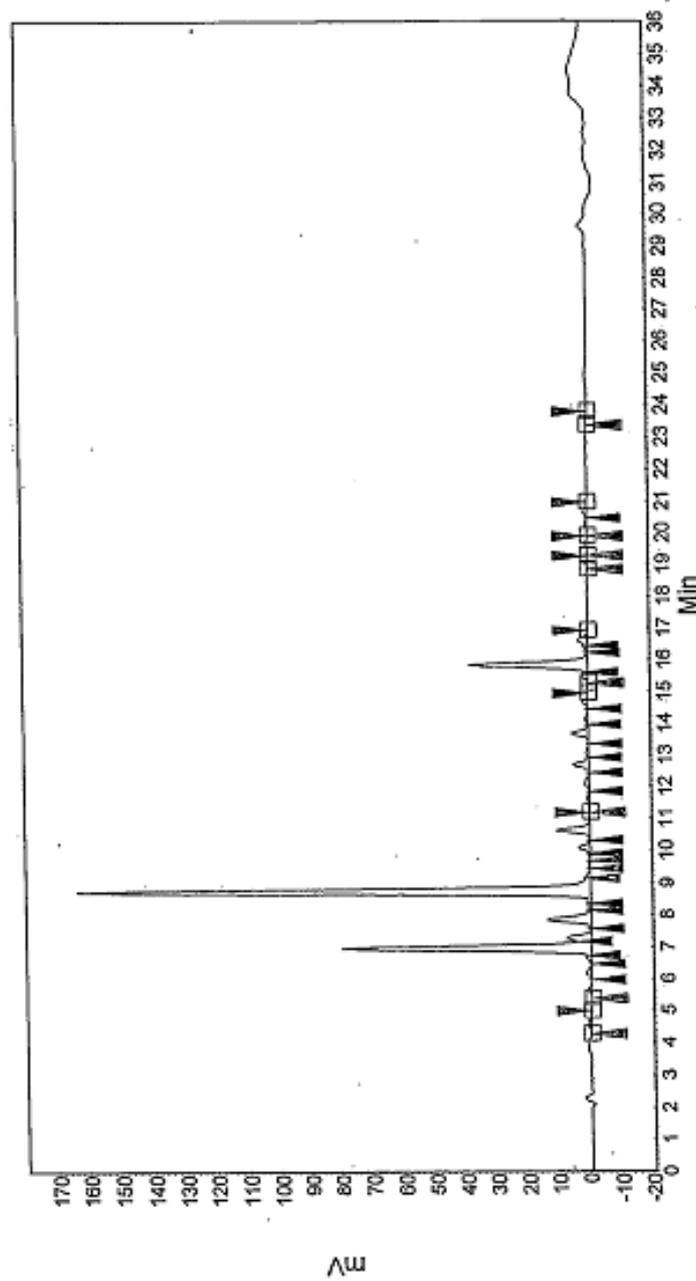


Figura 3.

Cromatograma típico que identifica los metabolitos obtenidos de una cepa microbiana con capacidades de producción de un alto título de epidaunomicinas y e-rodomicinona relacionadas con la presente invención



Perfil de metabolito típico:

Rt= 6,950	13-DHED
Rt= 7,850	4'-epi-feudomicina
Rt= 8,725	4'-epidaunorrubicina
Rt= 15,842	e-rodomicinona