



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

03-55528

54. TÍTULO

MÉTODOS PARA LA PRODUCCION DE ANSAMITOCINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A 61 K 35/66

71. SOLICITANTE

SMITHKLINE BEECHAM PLC

DOMICILIO

Brentford, Middlesex, Inglaterra

74. APODERADO

GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D. C.

02 JUL 2003

2003

(FORMA P 10)

QF

SS

PETITORIO



03 055528 00

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 03055528 00000000

Folios: 21

Fecha (MM): 2003-07-02 14:21:19

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

2

SOLICITANTE

(71)

Nombre: SMITHKLINE BEECHAM PLC

Dirección: Brentford, Middlesex, Inglaterra

Lugar de Constitución:

Domicilio: Brentford, Middlesex, Inglaterra

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 7460 Fax: 285 92 67

E-mail: info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ OTRO ☐Número 17.017.671 TP 2,978
de Bogotá del C.S.J.

4

INVENTOR(ES)
(72)Nombre: Mark A. FULSTON, Anna L.
STEFANSKA-Jan E. THIRKETTLE

Dirección:

Teléfono: Fax:

Nacionalidad o Domicilio: Worthing, West
Sussex, Harlow, Essex, Worthing,
West Sussex, Gran Bretaña

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ OTRO ☐

Número _____

5

Título (54)

METODOS PARA LA PRODUCCION DE ANSAMITOCINA

6

Clasificación Internacional (51)

A61K 35/66

7

Prioridad

SI

☐

NO

☒

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses

☐

12 meses

☐

18 meses

☐

Otro

☐

9

Comprobante de pago N°:

45696

Fecha:

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

N

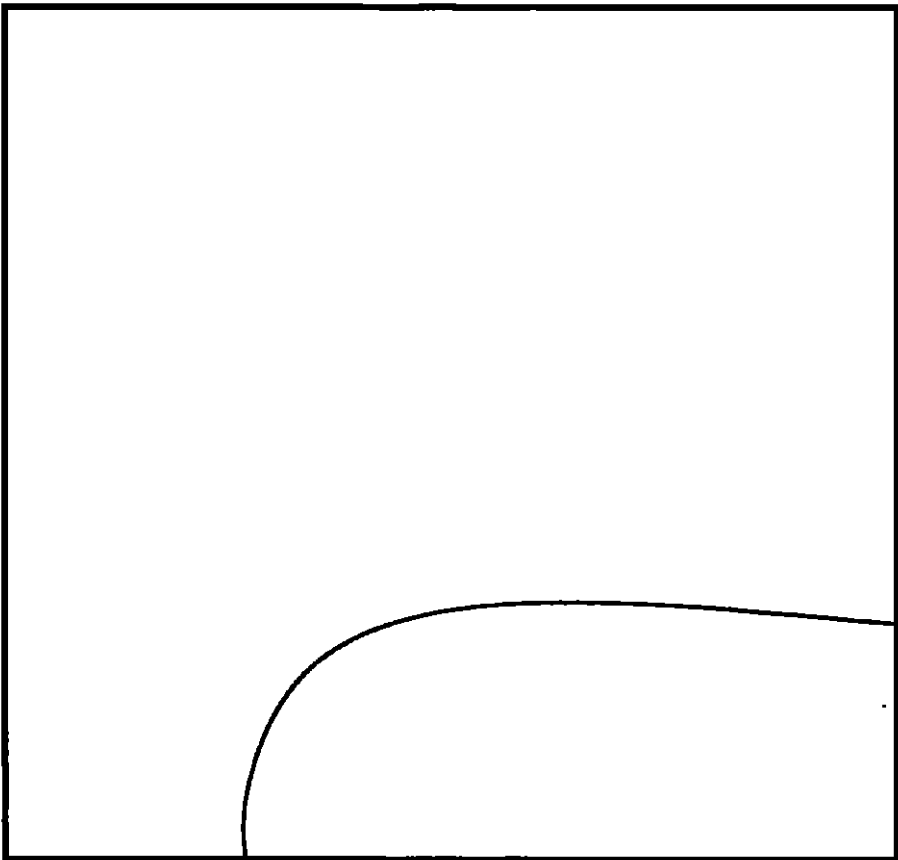
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso No. 15.346
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA: _____

C.C. 17.017.671 T.P 2978
de Bogotá del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

9

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 03035520 00000000

Folios: 21

Fecha (MM): 2003-07-02 14:21:18

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE MARCAS Y DENOMINACIONES

NIT : 000176007-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 45,696
FECHA : JULIO 2 DE 2003

***** CON D I B N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	DESIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9771293	02/07/2003	6,190,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	400,000.00

SUM: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

X

MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANSAMITOCINA

Campo de la invención

Esta invención se refiere a procedimientos para la preparación de ansamitocinas,
5 en particular ansamitocinas que se pueden convertir en maitansinol.

Antecedentes de la invención

En la patente de EE.UU. n° 5.208.020, se han descrito fármacos maitansinoides sumamente citotóxicos y su uso terapéutico. Estos fármacos se pueden preparar a partir
10 de precursores de ansamitocina producidos por fermentación de microorganismos tales como *Actinosynnema*.

En condiciones definidas de cultivo, *Actinosynnema spp.* tales como *Actinosynnema pretiosum* produce cierto número de ansamitocinas relacionadas. El producto principal es ansamitocina P-3 con un resto isobutirilo en la posición C-3.
15 Como componentes minoritarios se producen otras ansamitocinas que se diferencian sólo en la cadena lateral acilo en C-3, a saber, P-1 (resto etionilo), P-2 (resto propionilo), P-3' (resto butirilo), P-4 (resto isovalerilo) y P-4' (resto valerilo). Todos estos compuestos pueden experimentar escisión reductora para producir un mismo producto, maitansinol (forma P-0). Además, se produce, en bajas proporciones, cierto
20 número de otras ansamitocinas, que están modificadas en otros sitios de la molécula (hidroxiladas o n-désmetiladas). Éstas no producen el P-0 deseado por desacilación.

En las Patentes de EE. UU. números 4.162.940; 4.228.239; 4.356.265 y 4.450.234, se describen procedimientos para la producción de ansamitocina P-3 a partir de *Actinosynnema spp.* En general, estos métodos requieren añadir un coadyuvante de
25 filtración y un disolvente miscible con agua al caldo completo de fermentación, separando la materia sólida y extrayendo la fracción acuosa con un disolvente inmiscible con agua, concentrando y precipitando con éter de petróleo, purificando el precipitado por cromatografía sobre sílice y cristalización, seguida por cromatografía adicional o recristalización. Procedimientos alternativos utilizan adsorción en Diaion
30 HP-10 en lugar de la cromatografía sobre sílice, seguida por extracción adicional en disolvente y cristalización.

Estos procedimientos se pueden utilizar para obtener rendimientos aceptables de ansamitocina P-3, pero los métodos implican un gran número de etapas, lo que

introduce limitaciones en operaciones de producción a gran escala, particularmente debido a la naturaleza extremadamente tóxica de los compuestos de ansamitocina y a la necesidad de garantizar la seguridad de los técnicos encargados de los procedimientos. Así, existe necesidad de disponer de un procedimiento alternativo más seguro, utilizando menos etapas y más contenidas.

Compendio de la invención

Un aspecto de la presente invención es un método para preparar ansamitocinas purificadas, que comprende las etapas de:

- 10 a. cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;
- b. tratar el medio de cultivo para facilitar la extracción con disolvente de las ansamitocinas;
- c. extraer las ansamitocinas del medio de cultivo con un disolvente
- 15 hidrocarbonado aromático.
- d. concentrar las ansamitocinas extraídas; y
- e. purificar las ansamitocinas por cristalización.

Otro aspecto de la presente invención es un método para preparar ansamitocinas purificadas, que comprende las etapas de:

- 20 a. cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;
- b. tratar el medio de cultivo para facilitar la extracción con disolvente de las ansamitocinas;
- c. concentrar las ansamitocinas extraídas; y
- 25 d. purificar las ansamitocinas por cristalización.

Descripción detallada de la invención

Todas las publicaciones, incluidas pero sin limitación las patentes y solicitudes de patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan aquí como referencia, como si se hubieran expuesto íntegramente.

Se proporcionan métodos para preparar ansamitocinas purificadas sin la etapa de filtración. Los métodos comprenden las etapas de cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido, tratar el medio de cultivo para liberar



las ansamitocinas del microorganismo en el medio de cultivo, facilitando con ello la extracción con disolvente, extraer las ansamitocinas del medio de cultivo tratado con un disolvente hidrocarbonado aromático, concentrar las ansamitocinas extraídas y purificar las ansamitocinas por cristalización. Alternativamente, puede omitirse la etapa de

5 tratamiento.

Las ansamitocinas purificadas pueden reducirse formando maitansinol e incluyen ansamitocina P-3, P-1, P-2, P-3', P-4 y P-4'. Las ansamitocinas purificadas contienen sólo muy bajos niveles de ansamitocinas indeseables, con modificaciones en otros sitios de la molécula. Preferiblemente, el microorganismo productor ansamitocina

10 es *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565. También es particularmente preferido es *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565. También es particularmente preferido es *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31281. Los microorganismos pueden propagarse por técnicas de cultivo por fermentación, bien conocidas por los expertos en la técnica, tales como las descritas en la patente de los EE.UU. nº 4.450.234.

15 Una realización del método de la invención utiliza el tratamiento del microorganismo para ayudar a liberar ansamitocinas intracelulares y hacer las ansamitocinas asociadas con las células más susceptibles a la extracción con disolvente. Métodos ilustrativos de tratamiento incluyen sonicación, presión incrementada o temperatura incrementada. Preferiblemente, el tratamiento es un tratamiento con calor.

20 El tratamiento con calor se puede realizar a una temperatura de aproximadamente 60°C a aproximadamente 80°C. Preferiblemente, la etapa de tratamiento con calor se efectúa a unos 75°C, lo que mata al microorganismo y facilita la extracción con disolvente de las ansamitocinas. En una realización alternativa, no se utiliza ninguna etapa de tratamiento antes de la extracción, ya que se puede encontrar aproximadamente 60% de las

25 ansamitocinas totales en el medio de cultivo.

Las ansamitocinas se pueden extraer del medio de cultivo haciendo uso de disolventes hidrocarbonados aromáticos. Los hidrocarburos aromáticos tienen una selectividad más particular para las ansamitocinas que para otros constituyentes del caldo, lo que garantiza que sólo se requieren procedimientos simples curso abajo para

30 aislar el producto puro. Preferiblemente, el disolvente hidrocarbonado aromático es tolueno o xileno. Es particularmente preferido el tolueno ya que éste es más propenso a la evaporación a bajas temperaturas. Las propiedades del tolueno y el xileno son tales que el disolvente y las capas acuosas se separan fácilmente por acción de la gravedad y

sin necesidad de separación mecánica, por lo que se garantiza una mayor contención del procedimiento y mayor seguridad de los técnicos. La extracción se puede efectuar a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C. Preferiblemente, la extracción se efectúa a unos 45°C. El pH de la solución acuosa antes de la extracción deberá estar en el intervalo de 3 a 9. Preferiblemente, el pH es casi neutro, es decir, pH 6 a 8.

En general, se prefiere un volumen de disolvente equivalente al de caldo total (1:1) para la extracción. También se puede utilizar una relación alternativa en el intervalo de 2:1 a 1:4. Generalmente las soluciones se mezclan lentamente con agitación y la mezcla se agita hasta que se ha extraído aproximadamente >80% de las ansamitocinas en la capa orgánica. Preferiblemente la mezcla se deja sedimentar bajo la acción de la gravedad a una temperatura entre 15°C y 50°C. La temperatura preferida para la sedimentación es aproximadamente 45°C.

La capa orgánica se separa y la concentración del extracto por reducción del volumen de disolvente se puede llevar a cabo a vacío o por otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Después de la reducción del volumen, el extracto concentrado se puede, opcionalmente, disolver en un disolvente polar tal como metanol, y clarificar utilizando un filtro-membrana tal como PTFE, o un filtro con profundidad tal como sílice o alúmina.

La cristalización se utiliza para purificar las ansamitocinas deseadas, particularmente P-3, reduciendo los niveles de ansamitocinas no deseadas. Una mezcla preferida de disolventes para la cristalización es acetato de etilo y heptano. Dicha cristalización se efectúa de una manera convencional. Para facilitar la disolución del sólido para la cristalización, se puede añadir un pequeño volumen de metanol o disolvente polar similar, antes de la adición de acetato de etilo y después tratamiento con volúmenes más grandes de heptano, opcionalmente con agitación y enfriamiento para dar el producto cristalizado. El producto puede recrystalizarse siguiendo el mismo procedimiento.

Alternativamente, antes de la cristalización, las ansamitocinas extraídas del caldo de fermentación se pueden purificar utilizando gel de sílice, p.ej., haciendo pasar una solución del extracto de disolvente a través de un lecho de sílice. Los disolventes utilizados para la cromatografía pueden ser tolueno y mezclas de tolueno y metanol. También se pueden utilizar otros disolventes conocidos por los expertos en la técnica.

Las fracciones que contienen ansamitocina P-3 se reúnen y concentran a presión reducida.

También se proporcionan métodos para análisis de ansamitocinas por HPLC. La cuantificación de ansamitocina P-3 y el análisis de las relaciones de ansamitocina se obtienen por los métodos. Estos métodos se emplearon en los Ejemplos que se exponen a continuación.

La cuantificación de ansamitocina P-3 en caldo y muestras de extracción se puede determinar en una columna C18 Waters Q Spherisorb S5 ODS2, 4,6 x 250 mm, con una columna de guarda de 10 mm. La detección UV se hace a 252 nm y 205 nm. Se utilizan una fase móvil isocrática de 1 ml/min de MeCN (0,05% de TFA) al 60% en agua (0,05% de TFA) y un volumen de inyección de 20 µl.

El análisis de las relaciones de ansamitocina en las muestras de procedimiento curso abajo se puede determinar en una columna C8 Waters Symmetry Shield, 3,9 x 150 mm, sin columna de guarda. La detección UV se hace a 252 nm y 205 nm. Se utilizan una fase móvil en gradiente de 1 ml/min de MeCN al 35-45% (0,05% de TFA) en agua (0,05% de TFA) a lo largo de 30 minutos con una re-equilibración de 10 minutos a 40°C y un volumen de inyección de 10 µl.

El análisis de las relaciones de ansamitocina en las fracciones cromatográficas y el producto final se puede determinar en una columna C8 Waters Symmetry Shield, 3,9 x 150 mm, sin columna de guarda, con un sistema de detección LC-MS, ionización por electropulverización a presión atmosférica, modo de iones +ve. La detección de la masa por un voltaje de cono de 30 V para identificar positivamente los picos se hace por exploración MS completa (exploración de 600-700 u.m.a. con quad 1). La fragmentación MS-MS para determinar la clase de ansamitocina se lleva a cabo utilizando el mismo sistema de gradiente. Se utiliza una fase móvil de gradiente de 1 ml/min de MeCN (0,05% de TFA) al 35-45% en agua (0,05% de TFA) a lo largo de 30 minutos con una re-equilibración de 10 minutos a 40°C y un volumen de inyección de 10 µl.

La cuantificación de ansamitocina P-3 en corrientes residuales y otras muestras de bajo nivel, que requiere alta sensibilidad, se puede determinar en una columna C18 Waters Spherisorb S5 ODS2, 4,6 x 250 mm, con una columna de guarda de 10 mm y un sistema de detección de ionización por electropulverización a presión atmosférica LC-MS-MS, modo de iones +ve, voltaje de cono 30 V. Para la determinación del tipo

estructural, se seleccionaron los iones moleculares de la especie principal y los modelos de fragmentación observados eran un ion 547 predominante, que indicaba N-metilación y un 533 que indicaba N-desmetilación. Se utilizan una fase móvil isocrática de 1 ml/min de MeCN (0,05% de TFA) al 60% en agua (0,05% de TFA) y un volumen de inyección de 20 µl.

El procedimiento de la invención se puede utilizar para preparar complejos de maitansinoide/agente que se une a células, que son útiles como pro-fármacos activados por el tumor. Las ansamitocinas preparadas por el procedimiento de la invención pueden experimentar escisión reductora formando maitansinol, que se puede utilizar como se describe en la patente de los EE.UU. n° 5.208.020 para producir N-metil-L-alanina que contiene derivados de maitansinoide. Después, estos derivados se conjugan con agentes que se unen a células, preferiblemente anticuerpos, vía diversos enlazadores tal como un enlace disulfuro.

Un complejo ilustrativo de maitansinoide/agente que se une a células se puede preparar por un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- (1) reducir las ansamitocinas preparadas por el procedimiento de la invención., formándose maitansinol;
- (2) esterificar maitansinol con derivados de N-metil-L-alanina para formar un éster de maitansinoide que contiene disulfuro;
- (3) reducir el éster de maitansinoide que contiene disulfuro preparado por la etapa (2), formándose un maitansinoide que contiene tiol;
- (4) introducir grupos ditiopiridilo en un agente que se une a células; y
- (5) enlazar el maitansinoide que contiene tiol producido por la etapa (3) al agente ditiopiridílico que se une a células, de la etapa 4, mediante un enlace disulfuro.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos específicos, no limitantes.

Ejemplo 1

Extracción de caldo de cultivo de *Actinosynnema pretiosum* y purificación de las ansamitocinas

Un volumen de 37 litros de caldo completo que contenía la cepa productora de *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 (título de ansamitocina P-3 86,3 mg/l) se trató

con calor *in situ* a 75°C durante 60 min para matar el microorganismo y facilitar la extracción con disolvente de las ansamitocinas. Se añadieron 40 litros de tolueno y la mezcla se calentó a 45°C. Se agitaron las fases de manera que un vórtice de la fase superior de tolueno fue arrastrado a la fase inferior de caldo, pero sin producirse emulsiónamiento u homogeneización completa de las fases. La extracción se completó en 16 horas y la separación bajo la acción de la gravedad en 2 horas.

Se recuperaron por sifón 39 litros de tolueno que contenía 80 mg/litro de P-3, y se evaporaron utilizando un evaporador rotatorio de 20 litros de capacidad (temperatura del baño 40-45°C, caudal aprox. 9 litros/h). Después de la evaporación, se generaron 11,2 g de un aceite móvil que contenía 3,1 g de P-3; 27,6% en peso/peso). El extracto resultante se transfirió a un matraz por disolución en tolueno y de nuevo evaporación. (Rendimiento de la etapa de extracción = 97%).

El extracto se recogió en 120 ml de tolueno y se cargó sobre una columna de sílice (Kieselgel 60, 125 ml de volumen de lecho (vl) empaquetado en tolueno, 4 cm de diámetro x 10 cm) en 375 ml de tolueno (3 vl). La columna se lavó con 2 vl de tolueno y después se eluyó 4 veces con 2 vl de MeOH al 2% en tolueno, seguido por 12 veces con 1 vl de MeOH al 4% en tolueno. La columna se eluyó a 40 ml/min y se produjeron bandas compactas de color. Las fracciones 7-10 que contenían ansamitocina P-3 se reunieron y evaporaron para producir 3,2 g de sólido oleoso que contenía 2,5 g de P-3. Este material se analizó por LC-MS y MS-MS.

En esta etapa, el producto contenía 85,1% de ansamitocina P-3, y un total de 93,9% de las ansamitocinas desecadas. (Rendimiento en la etapa de la columna = 80,6%).

El producto de la columna de sílice se extrajo en 200 ml de EtOAc calentado a 40°C. Se añadió heptano (200 ml) y la solución se dejó enfriar. La solución se sembró con 1 mg de cristales puros de P-3 (también ocurrió espontáneamente cristalización en otros puntos del matraz). Después de 4 horas a temperatura ambiente, el sobrenadante se analizó por HPLC y se determinó que todavía quedaban 0,8 g de P-3 (30%) en solución. Se añadió más heptano (150 ml) y el matraz se dejó durante 3 horas más y se volvió a analizar. Esto indicó que 0,4 g de P-3 (16%) permanecían en solución. El matraz se dejó durante una noche a 4°C. El análisis subsiguiente indicó que quedaban sólo 70 mg de P-3 (3%) en solución. Se retiraron las aguas madres por aspiración, utilizando un montaje en línea de filtro sinterizado. Los cristales en forma de agujas blancas se lavaron con 2 x

15 ml de EtOAc:heptano 1:3. Los cristales se secaron *in situ* a vacío en un evaporador rotatorio a 30°C durante 10 horas. Se obtuvieron 2,5 g de cristales. (Rendimiento de la cristalización = 86%).

El producto final contenía 86% de ansamitocina P-3, y un total de 98,4% de las
5 ansamitocinas aciladas desecadas (P-1, P-2, P-3, P-3', P-4, P-4').

Ejemplo 2

Extracción de caldo de cultivo de *Actinosynnema pretiosum* y purificación de las ansamitocinas

10 Un volumen de 1.100 litros de caldo completo que contenía la cepa productora *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 (título de ansamitocina P-3 75,1 mg/litro, 82,6 g de P-3) se trató con calor *in situ* a 75°C durante 60 min para matar el microorganismo y facilitar la extracción con disolvente de las ansamitocinas. Quedaban 77,6 g de P-3 después del procedimiento que ocasionaba la muerte por calor. Se añadió un volumen
15 idéntico de tolueno previamente calentado a 45°C y la mezcla se mantuvo a 45°C. Las fases se agitaron de manera que un vórtice de la fase superior de tolueno fue arrastrado hacia la fase inferior de caldo pero sin producirse emulsiónamiento u homogeneización completa de las fases. La extracción se llevó a cabo durante 45 horas, seguida de separación bajo la acción de la gravedad, que ocurrió en 30 minutos. (Rendimiento de la
20 etapa de extracción 90,3%).

Un volumen de 1.127 litros del extracto en tolueno, que contenía las ansamitocinas, se concentró a 22 litros utilizando un evaporador de película descendente (FFE por sus siglas en inglés *falling film evaporator*). El líquido concentrado se transfirió a un evaporador rotatorio de 50 litros de capacidad y se evaporó hasta un
25 pequeño volumen (caudal de evaporación 14,6 litros/h). El FFE se lavó con 2 x 20 litros de tolueno y los lavados se hicieron pasar al evaporador para garantizar la transferencia completa de producto. El concentrado se evaporó a sequedad.

El extracto seco se recogió en 7,2 litros de metanol al 4% en tolueno y se cargó en una columna de sílice (Kieselgel 60, 4,8 litros de volumen de lecho cargado en metanol al 4% en tolueno, 15,0 cm de diámetro x 27,0 cm. caudal de carga 120 ml/min).
30 La columna se eluyó isocráticamente utilizando metanol al 4% en tolueno a un caudal de 227-384 ml/min y se produjeron bandas compactas de color. Las fracciones iniciales fueron de un volumen de lecho; las fracciones 3 a 6 fueron recogidas como mitades de

volúmenes de lecho. Las fracciones se sometieron a seguimiento por TLC (placas de Kieselgel 60 F₂₅₄, se hicieron correr en metanol al 5% en diclorometano, y se visualizaron por UV a 254 nm) y las que contenían ansamitocinas se sometieron a seguimiento por HPLC y LC-MS. La selección de las fracciones para cristalización se basó en análisis de HPLC y de LC-MS de las fracciones para optimizar la recuperación de ansamitocina P-3 y minimizar las ansamitocinas no deseadas. Las fracciones 5 a 10 que contenían ansamitocina P-3 se reunieron y evaporaron para producir un sólido que contenía 54,6 g de P-3. En esta etapa el producto contenía 77,1% de ansamitocina P-3 y un contenido total de 96,1% de las ansamitocinas deseadas. (Rendimiento de la etapa de cromatografía en columna = 92,5%).

El producto procedente de la columna de sílice se recogió en 91 ml de metanol previamente calentado a 46°C, seguido por 546 ml de acetato de etilo calentado a la misma temperatura. Se añadieron partes alícuotas adicionales del metanol para ayudar a la disolución del sólido. Se añadió un total de 166 ml de metanol a la mezcla. Se añadió heptano (100 ml) calentado a 50°C a la primera señal de turbidez y luego la solución se dejó enfriar a la temperatura ambiente a medida que comenzó la cristalización. Después de 4 horas, se añadió una porción adicional de 1,324 ml de heptano (a temperatura ambiente). El líquido sobrenadante se analizó por HPLC y se determinó que 6,6 g de P-3 estaban todavía en solución. La mezcla se enfrió sobre hielo y se añadieron partes alícuotas adicionales de heptano (200 y 400 ml) hasta que 3,9 g de P-3 (6,8%) permanecían en las aguas madres.

Las aguas madres se retiraron mediante aspiración, empleando un conjunto de tubería con filtro sinterizado. Los cristales se lavaron con 2 x 150 ml de acetato de etilo:heptano 1:3. Los cristales se secaron in situ en un evaporador rotatorio, inicialmente bajo vacío, seguido por alto vacío (1,0-1,3 milibares) a 30°C durante 88.5 horas. Se obtuvieron 76,4 g de cristales.

El producto final contenía 74,5% de ansamitocina P-3 (56,9 g) y un total de 97,8% de las ansamitocinas aciladas deseadas. (Rendimiento global = 69%).



Ejemplo 3

Cromatografía sobre sílice y cristalización de las ansamitocinas

1.008 litros del caldo completo de *Actinosynnema pretiosum* con un título de 64,8 mg/l de ansamitocina P-3 se trató con calor, se extrajo con tolueno y se evaporó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1.

El concentrado que contenía 34,5 g de ansamitocina P-3 se recogió en 3 litros de tolueno y se cargó sobre una columna de sílice (Kieselgel 60, 3,0 litros de volumen de lecho, rellena en tolueno, 13,8 cm de diámetro x 16,6 cm). La columna se cubrió en la parte superior con un lecho de 4 cm de arena. La columna se lavó con 5 litros de tolueno, seguido por 20 litros de MeOH al 2% en tolueno, el cual se recogió como fracciones de 5 litros. La columna se eluyó luego con 20 litros de MeOH al 4% en tolueno, recogándose como fracciones de 2,5 litros. Las ansamitocinas se eluyeron en las fracciones 9 hasta 15. La selección de fracciones para la cristalización se basó en el análisis por HPLC y LC-MS de las fracciones para optimizar la recuperación de la ansamitocina P-3 y minimizar las ansamitocinas no deseadas. Las fracciones 10 a 12 se reunieron y evaporaron hasta sequedad para proporcionar un aceite que contenía 32,5 g de ansamitocina P-3.

En esta etapa el producto contenía 91,8% de ansamitocina P-3 y un total de 95,3% de las ansamitocinas aciladas deseadas (rendimiento de la etapa de columna = 94,2%).

El concentrado de las fracciones de sílice reunidas se calentó en un baño de agua a 50°C y se disolvió en un volumen mínimo de metanol/acetato de etilo caliente (50°C). Se añadieron inicialmente 60 ml de metanol. Por la adicción lenta de 300 ml de acetato de etilo. Se añadió una porción adicional de 20 ml de metanol caliente en cuyo momento el concentrado estaba completamente disuelto. Se añadió 200 ml de heptano caliente (50°C) y la solución de cristalización se retiró del baño de agua. Comenzó la cristalización, y se añadió más heptano en partes alícuotas de 200 ml hasta que se hubo añadido un volumen total de 800 ml. La mezcla se enfrió en un baño de hielo durante 18 horas. La cristalización se sometió a seguimiento por análisis HPLC de las aguas madres. A las 18 horas, 6,3% de la ansamitocina P-3 permanecía en las aguas madres. Se añadieron 200 ml más de heptano y la mezcla se enfrió durante cinco horas más. El análisis por HPLC indicó que 4,0% de ansamitocinas permanecían en las aguas madres.

Los cristales se recuperaron por aspiración de las aguas madres de color pardo oscuro. Los cristales se lavaron tres veces con 50 ml de heptano: acetato de etilo, 3:1, y se secaron bajo vacío (0,8 mBar) durante una noche. Los cristales eran agujas uniformes, finas y blancuzcas que contenían 28,2% de ansamitocina P-3. (La recuperación de la etapa de cristalización = 86,9%).

El producto final contenía 93,1% de ansamitocina P-3 y un total de 98,4% de las ansamitocinas aciladas deseadas.

Ejemplo 4

Purificación y cristalización de ansamitocinas procedentes del extracto toluénico

1.001 litros de caldo completo de *Actinosynnema pretiosum* con un título de 74,5 mg/l de ansamitocina P-3 se trataron con calor, se extrajeron con tolueno y se evaporaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 para dar 9,5 litros de un extracto concentrado que contenía 54,7 g de ansamitocina P-3.

El concentrado se calentó a 45°C y se añadieron durante 33 minutos 14,5 litros de heptano para precipitar las ansamitocinas. La mezcla se enfrió con hielo. Una porción adicional de 5 litro de heptano se añadió y la mezcla se dejó reposar durante la noche. Las aguas madres se retiraron por aspiración y el precipitado se lavó con 10 litros de tolueno:heptano, 1:1. El análisis por HPLC indicó que las aguas madres contenían 6,5% de ansamitocina P-3, y los líquidos de lavado contenían 1,8% de P-3. En el precipitado se disolvió en 2 L de metanol y se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros.

La solución en metanol se evaporó hasta sequedad y se redisolvió en 85 ml de metanol a 50°C. A la solución se añadieron 510 ml de acetato de etilo seguido por 200 ml de heptano. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron lentamente 990 ml adicionales de heptano a medida que comenzó la cristalización. 4,14 g de ansamitocina P-3 permanecían en las aguas madres. Se añadió una porción de 400 ml adicionales de heptano y la mezcla se enfrió sobre hielo. 2.7 g de ansamitocina P-3 permanecían en las aguas madres.

Las aguas madres se retiraron por aspiración y los cristales se disolvieron en 110 ml de metanol y 520 ml de acetato de etilo a 50°C. Se añadió heptano en dos partes alícuotas de 75 ml. se enfrió la mezcla a la temperatura ambiente y se añadieron otro

900 ml. Se añadieron 400 ml más de heptano y la mezcla se enfrió sobre hielo y se dejó una noche para que cristalizara. El análisis por HPLC indicó que 2,3 g de ansamitocina P-3 permanecían en las aguas madres. Las aguas madres se retiraron por aspiración y los cristales se lavaron con heptano:acetato de etilo, 3:1, y se secó bajo vacío (0,6 mBar) durante una noche. Los 47,8 g de cristales contenían 84,3% de ansamitocina P-3, y un total de 97,0% de las ansamitocinas aciladas desecadas.

Ejemplo 5

Extracción del caldo de cultivo de *Actinosynnema pretosium* con xileno y purificación de ansamitocina

10

220 ml de la *Actinosynnema pretosium* tratada con calor, con un título de 44 µg/ml de ansamitocina P-3 se colocaron en un baño de agua a 45°C y se añadió un volumen igual de xileno. Las fases se mezclaron de tal modo que se formó un vórtice de xileno en la fase de caldo inferior pero sin formar una emulsión. Después de 20 horas, se había extraído en la fase de xileno 64% de la ansamitocina P-3

15

La mezcla se separó bajo gravedad y se retiraron 170 ml de xileno. El extracto de xileno se evaporó hasta sequedad. El extracto de xileno se purificó empleando cromatografía con sílice. El extracto se disolvió en 2 ml de metanol al 4% en tolueno y se cargó y eluyó empleando la misma mezcla disolvente. Las fracciones (0,5 ml) se recogieron y ensayaron por TLC (placas de Kieselgel 60 F₂₅₄ que se habían hecho correr en diclorometano: metanol 20:1). Las fracciones que contenían ansamitocina P3 se cristalizaron empleando el procedimiento descrito en los Ejemplos previos. El producto cristalino era de calidad comparable en términos de color y pureza con el producido por extracción con tolueno del caldo de fermentación.

20

La presente invención puede tener otras realizaciones de forma específicas sin apartarse del espíritu o atributos esenciales de la misma, y, por consiguiente debe hacerse referencia a las reivindicaciones anexas, en lugar de a la memoria descriptiva anterior, como indicativas del alcance de la invención.

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para preparar ansamitocinas purificadas, que comprende las etapas de:
- 5 a. cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;
- b. tratar el medio de cultivo para facilitar la extracción con disolvente de las ansamitocinas;
- c. extraer las ansamitocinas del medio de cultivo con un disolvente hidrocar-
- 10 bonado aromático;
- d. concentrar las ansamitocinas extraídas; y
- e. purificar las ansamitocinas por cristalización.
- 2.- Un método para preparar ansamitocinas purificadas, que comprende las etapas de:
- 15 a. cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;
- b. extraer ansamitocinas del medio de cultivo con un disolvente hidrocarbonado aromático;
- 20 c. concentrar las ansamitocinas extraídas; y
- d. purificar las ansamitocinas por cristalización.
- 3.- El método según la reivindicación 1 y 2, en el que microorganismo productor de ansamitocinas es *Actinosynnema spp.*
- 25 4.- El método según la reivindicación 3, en el que el *Actinosynnema spp.* es *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565.
- 5.- El método según la reivindicación 3, en el que el *Actinosynnema spp.* es
- 30 *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31281.
- 6.- El método según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es calentamiento a aproximadamente 75°C.

7.- Método según la reivindicación 1 y 2, en el que el disolvente es tolueno.

5 8.- Método según la reivindicación 7, en el que la relación de tolueno a medio de cultivo tratado con calor es aproximadamente 1:1.

9.- Método según la reivindicación 8, en el que la extracción es a aproximadamente 45°C.

10 10.- Método según la reivindicación 1 y 2, en el que el disolvente es xileno.

11.- Método según la reivindicación 10, en el que la relación de xileno a medio de cultivo tratado con calor es aproximadamente 1:1.

15 12.- Método según la reivindicación 11, en el que la extracción es a aproximadamente 45°C.

20 13.- Método según la reivindicación 1 y 2, en el que las ansamitocinas comprenden ansamitocinas aciladas que pueden experimentar escisión reductora para formar maitansinol.

14.- Ansamitocinas preparadas por el procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2.

25 15.- Un complejo de maitansinoide con un agente que se une a células, preparado convirtiendo las ansamitocinas preparadas por el procedimiento de la reivindicación 1 ó 2 en el complejo de maitansinoide con agente de fijación de células.

30 16.- El complejo de maitansinoide con agente que se une a células de la reivindicación 15, en el que el agente que se une a células es un anticuerpo.

RESUMEN

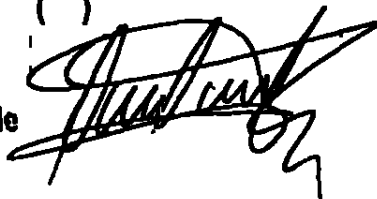
Se describen métodos mejorados de purificación para ansamitocinas.

22
19

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD ☒	()	()
Indicacion de que se solicita la concesion de una patente	☒	()
Datos de Identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
Descripción de la invencion.	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes ☒	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas ☒	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable



Fecha Radicacion 03055528 00000000 SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO Folios 21
Fecha (HH) 2003-07-02 14 21:15
Tramite 002 PATENTES D I REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 03-55528

Fecha: 14 de julio del 2003

Se informa que :

Desde 3 de agosto de 1993,
del folio 77.223 al folio 77.227 del
libro de Protocolo N° 261 , obra el poder
N° 15.346 conferido por SMITHKLINE
BEECHAM plc.

domiciliado(a) en Brentford, Middlesex.
Inglaterra

al doctor GERMAN CASTILLO G. y/o ADRIANA
CASTILLO GIBSONE y/o LUIS F. CASTILLO GIBSONE

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos.

Facultad para desistir Si .

Revisado 202027 .

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Folio 24

2020
Bogotá, D. C.

Doctor(a)
GERMAN CASTILLO GRAU
Apoderado(a)

Oficio No. **05709**

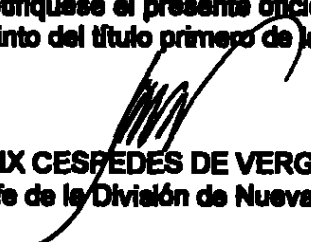
REFERENCIA:	Radicación	03-55528
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el(los) inventor(es) al solicitante o a su causante. (art. 26-k, Dec 486/2000).
- Debe indicarse el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art. 27-c, D 486/00).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha

24 JUL 2003

202027

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia