



DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

IMMUNOGEN, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección	Domicilio
Estados Unidos de America	830 Winter Street, 02451-1477	Waltham, Massachusetts Estados Unidos de America
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RUBIO CAMACHO HUMBERTO **17'192.062** **50.007 C.S.J.**

Apellidos y Nombre Documento de identificación Tarjeta profesional

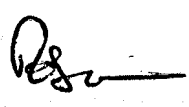
Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 7 # 74-64 Oficina 506	Bogotá, D.C.	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
<u>mail@rubiolawyers.com</u>	3131647	3132408

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general **Documento de poder reposa en el Expediente No. 06-046.036**

4. Datos del trámite		
CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente 07-063.336 _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No.	12-0078938 12-0078939	Fecha: 01/08/2012 01/08/2012
----------------------------	--------------------------	---------------------------------

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa. (2)
☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
	HUMBERTO RUBIO CAMACHO
Firma	Nombre y apellidos
17'192.062	50.007 C.S.J.
C.C	Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0078938

Bogotá D.C., Agosto 01 de 2012 - 10:24:11

RECIBIDO DE : HUMBERTO RUBIO

NI 8.300.000.228

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	495406251	01/08/2012	8.682.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

TASA DIVISIONAL PATENTE:
PATENTE: MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANSAMITOCINAS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-063336- -00007-0000

Fecha: 2012-08-01 15:09:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 32

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

. Agosto 1 de 2012 - 10:24:12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0078939
		Bogotá D.C., Agosto 01 de 2012 - 10:24:11

RECIBIDO DE : HUMBERTO RUBIO	NI 8.300.000.228
------------------------------	------------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	495406251	01/08/2012	8.682.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
23	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	690.000.00
				\$690.000.00

SON: ***SEISCIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

EXCESO DE REIVINDICACIONES:
PATENTE: MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANSAMITOCINAS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-063336- -00007-0000
Fecha: 2012-08-01 15:09:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 32

MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANSAMITOCINAS

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a procesos para la producción de Ansamitocinas. Ansamitocinas se refiere a una mezcla de ansamitocinas que difieren en su cadena lateral de éster C-3. Las ansamitocinas pueden ser convertidas en el maitansinol de alcohol C-3.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las ansamitocinas son compuestos altamente citotóxicos derivados a partir de la fermentación de microorganismos tales como *Actinosynnema pretiosum*. Las ansamitocinas ha sido convertidas químicamente en maitansinoides que contienen
15 tiol, cuyo uso terapéutico en la forma de conjugados de agente de enlace celular-maitansinoide se ha descrito (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; y 6,441,163).

 El proceso de fermentación con cepas *Actinosynnema* spp tales como *Actinosynnema pretiosum* produce varias especies de ansamitocina que tienen
20 diferentes sustituyentes de éster en C-3 (Fig. 1). Los diferentes ésteres C-3 producidos incluyen P-3 (iso-butililo), P-3' (n-butililo), P-2 (propionilo), P-4 (iso-valerilo), P-4' (n-valerilo). Todos estos ésteres pueden ser separados de manera reductiva para dar el maitansinol de alcohol C-3 (P-O), que es el precursor para la síntesis de maitansinoides que contienen tiol. Además, se producen cantidades
25 menores de ansamitocinas indeseables las cuales son modificadas en otros sitios, tales como N-demetilo, 20-O-demetilo, y 19- decloro. A la des-acilación reductiva, estas ansamitocinas no producen maitansinol.

 Se han descrito los procesos para la producción de ansamitocina a partir de la fermentación de *Actinosynnema* spp (Patentes de los Estados Unidos de
30 Norteamérica Nos. 4,162,940; 4, 450,234; 4,228,239; 4,331,598; y 4,356,265). El rendimiento de las ansamitocinas producidas varia, con títulos que varían de manera

general desde 12 mg/L hasta 100 mg/L. Las ansamitocinas son recuperadas y purificadas de modo común a través de un proceso multi-etapa que implica la adición de un auxiliar de filtro y un solvente orgánico al caldo de fermentación completo, seguida por la concentración de la capa orgánica y la precipitación con éter de petróleo. El precipitado fue purificado de manera adicional utilizando cromatografía de sílice y cristalización, seguida por purificación adicional por medio de recristalización o cromatografía.

Por lo tanto, el proceso es complicado e implica varias etapas en donde tiene que manejarse material altamente tóxico. Esto dificulta en gran medida el escalamiento de dicho proceso. Además, tiene que asegurarse la seguridad del operador a través de las diferentes etapas de procesamiento.

Una solicitud reciente (US 2002/0015984 A1) reclama ciertas mejoras en el proceso para la producción de ansamitocinas. Se reportó que los títulos de ansamitocina en el caldo de fermentación han variado desde 65 hasta 86 mg/L. Las mejoras reclamadas incluyeron desactivación térmica del caldo a 75°C, extracción en un solvente de hidrocarburo aromático tal como tolueno, cromatografía a través de una columna de sílice abierta, seguida por cristalización. A fin de reducir el costo de la producción de ansamitocina, se han producido nuevas cepas de *Actinosynnema* que proporcionan títulos significativamente más elevados (hasta 400 mg/L en fermentadores) que aquellas descritas con anterioridad. Los procesos antes descritos para la producción de ansamitocinas tienen varias desventajas, y por lo tanto no pueden ser adaptados para las nuevas cepas de alta producción que se han desarrollado. Por ejemplo, la desactivación térmica a 75°C resulta en alguna degradación de ansamitocina y una pérdida del 10 hasta el 20% en el rendimiento. La extracción del caldo de fermentación que contiene elevado contenido de ansamitocina con hidrocarburos aromáticos es ineficiente e incompleta, ya que las ansamitocinas no son altamente solubles en dichos solventes. La purificación de ansamitocinas en columnas de sílice auto-empacadas abiertas tiene dos desventajas: 1) variación de un lote a otro en pureza y recuperación, y 2) significativa exposición humana que resulta en problemas de seguridad. Por lo tanto, existe la necesidad de producir ansamitocinas en altos rendimientos y proporcionar también

un proceso eficiente para su aislamiento y purificación, en tanto que reducen al mínimo la exposición del trabajador al fármaco altamente tóxico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Un aspecto de la invención es un proceso para la fermentación a gran escala de microorganismos que producen ansamitocina, el proceso que es especialmente aplicable a una nueva cepa productora de ansamitocina, altamente productiva.

10

Otro aspecto de la invención es un método para aislar la ansamitocina cruda, y para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las siguientes etapas:

15

1) desactivación opcional del cultivo, por ejemplo, mediante exposición a calor a aproximadamente 50° hasta 55°C o por medio de adición de 1% en volumen de cloroformo, 2) extracción con un solvente orgánico no-aromático, 3) concentración del extracto, 4) purificación del concentrado en una columna de sílice o alúmina, de preferencia una columna de cartucho de sílice pre-empaquetada, y 5) cristalización del producto.

Otros aspectos de la invención incluyen los siguientes:

Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

20

1) Cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;

2) Extraer ansamitocinas a partir del medio de cultivo con un solvente inmiscible en agua no aromático;

3) Concentrar las ansamitocinas extraídas; y

25

4) Purificar las ansamitocinas a través de cualquiera de a), b), c) y d):

a) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina,

b) cristalización,

c) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización, y

30

d) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

1) Cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;

5 2) Extraer ansamitocinas a partir del medio de cultivo con un solvente inmiscible en agua no-aromático;

3) Concentrar las ansamitocinas extraídas; y

4) Purificar las ansamitocinas a través de cualquiera de a), b), c) y d):

a) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina,

10 b) cristalización,

c) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización, y

d) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

15 Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

1) Cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;

20 2) Extraer ansamitocinas a partir del medio de cultivo con a solvente inmiscible en agua no aromático;

3) Concentrar las ansamitocinas extraídas; y

4) Purificar las ansamitocinas mediante cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización.

25 Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

1) Cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;

2) Extraer de ansamitocinas desde el medio de cultivo con un solvente inmiscible en agua no aromático;

30 3) Filtrar para remover sólidos, permitiendo el aislamiento de la fase orgánica

4) Concentrar ansamitocinas a partir de la fase orgánica; y

5) Purificar las ansamitocinas por medio de una de a), b), c) y d):

a) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina,

b) cristalización,

c) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización, y

d) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

1) Cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;

2) Extraer ansamitocinas desde el medio de cultivo con un solvente inmiscible en agua no aromático, utilizando varias técnicas de centrifugación;

3) Concentrar las ansamitocinas extraídas; y

4) Purificar las ansamitocinas por medio de uno de a), b), c) y d):

a) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina,

b) cristalización,

c) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización, y

d) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

1) Cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;

2) Centrifugar el caldo en presencia de uno o más solventes miscibles en agua para remover sólidos en tanto que se retienen las ansamitocinas en solución.

3) Agregar un solvente no aromático inmiscible en agua, a fin de permitir la extracción de ansamitocinas dentro de la capa orgánica. De manera opcional, varias sales u otros componentes también podrían ser agregados a la fase orgánica durante la extracción.

4) Concentrar las ansamitocinas extraídas; y

5) Purificar las ansamitocinas por medio de uno de a), b), c) y d):

a) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina,

b) cristalización,

5 c) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización, y

d) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

10 Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

1) Cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;

2) Tratar de manera opcional del medio de cultivo para facilitar la extracción de ansamitocinas;

15 3) Extraer la fase sólida de ansamitocinas a partir del medio de cultivo sobre una resina;

4) Hacer la elución isocrática o de gradiente de ansamitocinas a partir de la resina usando uno o más solventes orgánicos o uno o más solventes orgánicos combinados con agua;

20 5) Concentrar las ansamitocinas extraídas; y

6) Purificar de manera opcional las ansamitocinas adicionalmente por medio de uno de a), b), c) y d):

a) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina,

b) cristalización,

25 c) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización, y

d) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

En estas modalidades la invención puede incluir de modo opcional:

30 (i) desactivación química o térmica de los microorganismos en el caldo de fermentación;

(ii) tratamiento del medio de cultivo para facilitar la extracción de solvente de las ansamitocinas, antes de la etapa 2; o

(iii) una etapa de lavado en la cual una solución cruda de ansamitocinas en solvente orgánico es lavada con agua, una solución salina acuosa, un ácido acuoso o una base acuosa en cualquier combinación secuencial, ya sea antes o después de la precipitación. Esta etapa puede llevarse a cabo en varias etapas de la purificación.

Un proceso para extraer ansamitocinas a partir del caldo de fermentación, el proceso que comprende:

1) Inactivar de manera opcional el microorganismo productor de ansamitocinas en el caldo de fermentación; y

2) Extraer las ansamitocinas desde el caldo de fermentación con un solvente inmisible en agua no aromático.

El proceso anterior también puede incluir tratamiento del medio de cultivo para facilitar la extracción de solvente de las ansamitocinas, antes de la etapa 2.

Un proceso para extraer ansamitocinas desde el caldo de fermentación, el proceso que comprende:

1) Extracción de ansamitocinas desde el caldo de fermentación con un solvente inmisible en agua no aromático, y

2) Filtración para remover sólidos, permitiendo el aislamiento de la fase orgánica. El proceso anterior puede incluir de manera opcional:

(i) desactivación química o térmica de los microorganismos en el caldo de fermentación; y/o

(ii) tratamiento del medio de cultivo para facilitar la extracción de solvente de las ansamitocinas, antes de la etapa 2.

Un proceso para extraer ansamitocinas desde el caldo de fermentación, el proceso que comprende: extraer ansamitocinas desde el medio de cultivo a través de varias técnicas de centrifugación con un solvente inmisible en agua no aromático.

El proceso anterior puede incluir de manera opcional:

(i) inactivación química o térmica de los microorganismos en el caldo de fermentación; y/o

(ii) tratamiento del medio de cultivo para facilitar la extracción de solvente de

ansamitocinas, antes de o durante la centrifugación.

Un proceso para remover desechos sólidos desde el caldo de fermentación, el proceso que comprende:

1) Centrifugación del caldo de fermentación en presencia de un solvente orgánico miscible en agua para remover sólidos en tanto que se mantienen las ansamitocinas en solución.

El proceso anterior puede incluir de manera opcional:

(i) inactivación química o térmica de los microorganismos en el caldo de fermentación; y/o

(ii) tratamiento del medio de cultivo para facilitar la extracción de solvente de ansamitocinas, antes de o durante la centrifugación.

En los métodos antes descritos, se prefiere que el microorganismo productor de ansamitocina sea *Actinosynnema* spp., de manera más preferible *Actinosynnema pretiosum*. El microorganismo productor de ansamitocina puede ser también *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 o cepas derivadas de las mismas o *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) o cepas derivadas de la misma. Como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,450,234, *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 fue depositado con el (i) Institute of Fermentation, Osaka, 17-85, Juso-honmachi 2- chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón, el 20 de agosto de 1979, bajo el número de acceso de IFO 13963; (ii) National Institute of Bioscience and Human Technology (anteriormente Fermentation Research Institute), Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, Japan, el 29 de agosto de 1979, bajo el número de acceso de FERM-P NO. 5185; y (iii) la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, USA, el 11 de septiembre de 1979, bajo el número de acceso de ATCC 31565. Además, *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 fue depositado bajo las disposiciones del Budapest Treaty con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, USA, el 11 de diciembre de 2001, y ha sido acordado el No. de Acceso ATCC PTA-3921.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la estructura de varios ésteres de ansamitocina C-3 que pueden elaborarse por medio de fermentación, así como el alcohol C-3, maitansinol (P-O).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan métodos para cultivar un microorganismo altamente productivo de ansamitocinas en un medio de cultivo líquido en fermentadores grandes. Se proporcionan también métodos para la extracción de la ansamitocina desde el caldo de cultivo y el microorganismo dentro de a solvente inmiscible en agua no-aromático en el cual la ansamitocina es altamente soluble, y para la purificación de la ansamitocina mediante el paso a través de una columna de sílice o alúmina si es necesario, de preferencia estas columnas son cartuchos pre-empacados, seguido por la cristalización del producto. Si es necesario, el microorganismo puede ser inactivado por medio de tratamiento térmico o tratamiento con cloroformo antes de la etapa de extracción.

Las ansamitocinas purificadas podrían incluir una mezcla de varios ésteres C-3, tales como las ansamitocinas P-3, P-3', P-4, P-4', P-2 y P-1 (Figura 1), que pueden ser tratadas con un agente reductor para proporcionar el compuesto de hidroxilo C-3 deseado, maitansinol (P-O). Las ansamitocinas purificadas contienen de manera común solo cantidades menores de ansamitocinas indeseables que tienen modificaciones en sitios de la molécula distintos de la posición C-3. De manera preferible la cepa productora de ansamitocina es *Actinosynnema* spp. De modo más preferible, el microorganismo es *Actinosynnema pretiosum*. El microorganismo puede ser también *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) y derivados del mismo y *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 y derivados del mismo. El microorganismo puede ser cultivado a través de técnicas de cultivo de fermentación

que son conocidas por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica, utilizando los medios específicos descritos en la presente o cualquier otro medio que se describe en la técnica (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,162,940; 4,450,234; 4228,239; 4,331,598; y 4,356,265).

5 Una modalidad del método de la invención es el cultivo del microorganismo en un medio de cultivo líquido. El cultivo de la cepa bacterial PF4-4 se llevo a cabo bajo condiciones controladas y puede emplear una amplia variedad de medios y condiciones. Por ejemplo, PF4-4 puede ser cultivado bajo condiciones similares y con medios similares a aquellos descritos para ATCC 31565 o ATCC 31281 en las

10 Patentes publicadas de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,137,230; 4,162,940; 4,331,598; 4,356,265; y 4,450,234; y como se describe en Hatano et al., Agric. Biol. Chew. 48, 1721- 1729, 1984. Por lo tanto, la cepa PF4-4 tolera una amplia variedad de fuentes de carbono, las cuales soportan también la producción por fermentación de las ansamitocinas. Los medios de cultivo ilustrativos se

15 proporcionan en los Cuadros 1 y 2. El Cuadro 1 muestra medios que soportan la producción de ansamitocinas a través de microorganismo productor de ansamitocinas, tal como Actinosynnema pretiosum PF4-4 y el Cuadro 2 muestra medios adicionales adecuados para la propagación y/o cultivo de Actinosynnema pretiosum PF4-4, y otro microorganismo productor de ansamitocinas.

20

Cuadro 1. Composición del Medio de Producción (los registros están en % p/v).

	FM 24-44	FM 112-37	FM 4-4	FM 4-6	FM 4-7
Dextrina (Lodex 5)	6	6	5	5	5
Maltosa (Disco)	4	4	2	2	2
Proflo (Traders)			2.0	2.5	2.75
Harina de Frijol de Soya (ADM)	1.5	2.0			
Pharmamedia (Traders)	0.5				
CSP (Roquette)	0.5	0.5	0.5	0.15	0.15
Levadura Seca P. (Difco)	0.25				
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05				
CaCO ₃ (Hayashi)			0.5	0.5	0.6
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Wako)		0.05			
KH ₂ PO ₄	0.05	0.04			

(Wako)					
K ₂ HPO ₄		0.05	0.06	0.06	0.06
(Wako)					
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.5	0.5			
NaHCO ₃		0.2			
(Wako)					
Zeolita	0.1				
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
(Wako)					
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0002				
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.001			0.0005	0.0005
(Baker)					
Ácido Nicotínico	0.0002				
MnSO ₄ H ₂ O	0.0002				
Isobutanol	0.1	0.5	0.5	0.3	0.3
(Tedoa)					
SAG471		0	0.06	0.04	0.04
(Witco)					
pH	6.8	6.8	6.8	7.2	7.35

CUADRO 2. Medios Relacionados

Inclinación y cultivo de placa, CM4-1 Agar

5	(%, p/v)	
	Extracto de levadura (Difco)	0.3
	Extracto de malta (Difco)	0.3
	Soytone (Difco)	0.5
	Glicerol (Difco)	1.0
10	Bacto Agar (Difco)	2.0

Ajustar pH a 6.5 antes de la esterilización; Esterilización: 121⁰C, 20 minutos

Medio de Cultivo, YM.4-Y

	(%, p/v)	
	Almidón soluble (BDH)	2.0
15	Glucosa (Shuling)	1.0
	Alimento de soya (ADM)	1.0
	Licor de Maíz (Solulys)	0.5
	Soytone (Difco)	0.5
	NaCl (Wako)	0.3
20	CaCO ₃ (Hayashi)	0.5

pH 6.8; Esterilización: 121⁰C, 20 minutos

Los métodos preferidos para producción por fermentación de ansamitocinas a

partir de la cepa PF4-4 se describen de manera adicional en los EJEMPLOS 1 y 2 a continuación.

Fermentación:

5

10

15

20

25

30

El cultivo puede ser conducido por las condiciones de cultivo tales como, estacionarias, con agitación, aeróbico sumergido o cualesquiera otras condiciones de cultivo. Para un buen desarrollo de cultivo y alta producción de ansamitocinas en grandes fermentadores de tanque, se prefiere el cultivo sumergido aeróbico. La producción de ansamitocina puede ser mejorada de manera adicional a través de la alimentación de nutrientes durante la fermentación. Por ejemplo, cuando se cultiva el organismo en el medio FM4-6, la alimentación adicional de glucosa durante el curso de la fermentación o de glucosa durante aproximadamente las primeras 24 a 72 horas, de preferencia durante aproximadamente las primeras 48 h, seguida por la alimentación con glucosa y un nutriente de proteína tal como harina de semilla de algodón (por ejemplo Proflo o Pharmamedia de Trader's Protein, Memphis, TN) o harina de soya, y un alcohol o un aldehído para facilitar la formación de la cadena lateral de éster C-3, tal como isobutanol, isobutiraldehído, n-butanol, n-butiraldehído, n-propanol, n-propionaldehído, isopropanol, isopropionaldehído, pentanol, valeraldehído, isopentanol, isovaleraldehído hasta la terminación de la fermentación puede resultar en la duplicación de la producción de ansamitocina. En tanto que las condiciones de cultivo dependen del medio utilizado y la escala de producción, se prefiere de manera normal llevar a cabo la fermentación en el rango de pH de aproximadamente 5 a 9, de preferencia con un pH inicial de aproximadamente 6.5 hasta 8.0. De modo más preferible, el rango de pH es de aproximadamente 7 a 8, incluso más preferible aproximadamente 7 hasta 7.4. El pH de mayor preferencia es de aproximadamente 7.2. La temperatura puede variar desde aproximadamente 15° hasta 35 °C, con un rango preferido de aproximadamente 25° hasta 30°C. De manera más preferible, la temperatura es de aproximadamente 28°C. La fermentación se continúa hasta que se ha logrado la máxima acumulación de ansamitocina. El tiempo de cultivo puede variar y depende de varios factores que

incluyen el método de cultivo, la composición del medio, y la temperatura. De manera común, el tiempo de fermentación varía desde 96 hasta 336 h.

Análisis de ansamitocinas:

5

En las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,331,598 y 4,450,234, la cepa padre ATCC 31565 está descrita como la producción de dos clases de ansamitocinas que se distinguen por la presencia de un grupo metilo o hidroximetilo en C-14 (véase la Figura 1). Para ambas clases, se producen varias ansamitocinas diferentes que difieren en su enlace de cadena lateral acilo respectivo al átomo de oxígeno C-3 y con respecto a si C-14 transporta un grupo metilo o hidroximetilo (o, en estudios subsecuentes, N- demetilo). La nomenclatura utilizada en la presente para los compuestos permutados está definida antes con referencia a la Figura 1.

10

15

La ansamitocina P-3 es el principal producto de PF4-4 y la cepa padre ATCC 31565, bajo ciertas condiciones de crecimiento. Si las bacterias son cultivadas en presencia de valina o ácido isobutírico (véase la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,228.239), o alcohol de isobutilo o isobutiraldehído (véase la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,356,265), otros compuestos de ansamitocina están presentes sólo en cantidades menores. Cuando la cepa PF4-4 es cultivada en diferentes medios de fermentación (designado FM en el Cuadro 1), los cuales contienen todos alcohol de isobutilo, la ansamitocina P-3 es la ansamitocina predominante producida. En un método para probar la cantidad de ansamitocinas, las muestras del caldo de fermentación son diluidas con etanol o acetonitrilo, agitadas con fuerza después y finalmente centrifugadas. El sobrenadante es probado después para el contenido de ansamitocina P-3.

20

25

30

Las ansamitocinas son fraccionadas de manera preferible y analizadas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC), aunque se puede utilizar cualquier técnica adecuada, por ejemplo, MALDI-TOF o cromatografía de capa delgada. En un método, los caldos de fermentación son extraídos con solventes orgánicos, tales como acetato de etilo, cloruro de metileno o

cloroformo, y el contenido de P-3 en el solvente orgánico es determinado por medio de HPLC, utilizando columnas C18 o C8 de fase inversa.

Extracción de ansamitocinas:

5

10

15

Las ansamitocinas pueden ser extraídas a partir del caldo de fermentación a través de métodos empleados de manera general para la recuperación de metabolitos secundarios. Ya que las ansamitocinas son fácilmente solubles en solventes no-aromáticos, pueden ser extraídas con facilidad mediante agitación con solventes inmiscibles en agua no aromáticos tales como acetato de alquilo en donde la cadena de alquilo es lineal o ramificada y tiene 1-5 átomos de carbono, dialquilcetonas y solventes halogenados. Ejemplos de acetatos de alquilo adecuados incluyen acetato de n-butilo, acetato de etilo, y acetato de metilo. Un ejemplo de una dialquilcetona adecuada es metil isobutil cetona. Un ejemplo de un solvente halogenado adecuado es diclorometano. Se prefiere la extracción con acetato de n-butilo. De preferencia, la relación del caldo de fermentación al solvente inmiscible en agua no aromático es 1:1 por volumen.

20

25

30

Las ansamitocinas también pueden ser adsorbidas a partir del caldo de fermentación sobre varias resinas, tales como, Amberlite XAD-4, XAD-16 comercialmente disponibles de Rohm and Haas Company, Diaion HP20, HP21, Sepabeads SP825, SP850, SP70, SP700 comercialmente disponibles de Mitsubishi Chemical Industries Ltd. Estos ejemplos son de alcance no limitante, también pueden utilizarse otras resinas conocidas por alguien con experiencia en la técnica para el propósito anterior. La resina también puede ser utilizada como un recubrimiento sobre una estructura secundaria tal como un imán o un material de alta densidad de manera que el polímero puede ser recuperado magnéticamente desde el caldo o a través de métodos que se apoyan en la densidad adsorbente tal como la cromatografía de lecho expandido. Una vez que las ansamitocinas son adsorbidas sobre la resina, pueden ser eluidas utilizando uno o más solventes orgánicos a través de elución isocrática o de gradiente. En una modalidad, la resina puede ser agregada de manera directa al caldo para extraer las ansamitocinas.

Las ansamitocinas pueden ser recuperadas desde la resina a través de varios medios. En una modalidad, la resina puede ser recuperada mediante filtración. En una segunda modalidad, la resina puede ser recuperada por centrifugación y la pella puede ser eluida entonces con uno o más solventes orgánicos o con uno o más solventes orgánicos combinados con agua. En una tercera modalidad, la fase acuosa y los desechos sólidos pueden ser removidos de la resina a través de cromatografía de lecho expandido. La resina puede ser comprimida después en la columna de lecho expandido y eluida con uno o más solventes orgánicos o con uno o más solventes orgánicos combinados con agua por medio de elusión isocrática o de gradiente. En una cuarta modalidad, la resina puede extraer ansamitocinas mientras está siendo separada desde el caldo de fermentación a través de una membrana parcialmente permeable. Por ejemplo, una membrana de diálisis empacada con resina puede ser ahitada con el caldo de fermentación, agua y componentes de bajo peso molecular pueden pasar a través de la membrana, permitiendo que las ansamitocinas se unan a la resina. La bolsa de diálisis puede ser retirada después desde el caldo y la resina recuperada puede ser eluida después como se describió con anterioridad.

Antes de la extracción, los microbios en el caldo de fermentación pueden ser inactivados, si se desea, mediante exposición a calentamiento moderado a aproximadamente 50° hasta 55°C durante aproximadamente 30 minutos hasta 2 horas, o mediante adición de 1% (v/v) cloroformo (Toru Hasegawa et al. 1983, Int. J. Syst. Bacteriol. 53:314-320).

Asimismo, antes de o durante la extracción, el proceso puede incluir tratamiento del medio de cultivo para facilitar la extracción de solvente de ansamitocinas. El tratamiento puede incluir aunque no está limitado a calentamiento, ajuste de pH, o tratamiento enzimático o tratamiento químico, tal como la adición de sulfato poliférrico, agentes de des-emulsificación, sílice ahumada o cosolventes tales como acetona o alcoholes tales como metanol.

En el caso de la extracción de fase orgánica, la extracción se lleva a cabo a un pH entre 2.0-13.0, aunque de preferencia a un pH de aproximadamente 6.0 hasta 7.0, y de modo más preferible a un pH de aproximadamente 6.5 hasta 7.0, y de

preferencia con acetato de n-butilo. A fin de mejorar la eficiencia de la extracción, el caldo puede ser mantenido a una temperatura entre 5°C y 80°C, de preferencia entre 30° y 45°C durante el proceso de extracción.

El tiempo de extracción depende de varios factores que incluyen la composición del caldo, la temperatura del caldo y el solvente de extracción, el método de mezclado del caldo y el solvente utilizado para la extracción. El tiempo de extracción varía desde 1 hora hasta 120 horas, dependiendo del método de extracción. Por ejemplo, cuando se selecciona un tiempo de extracción y filtración rápido, el tiempo de extracción puede variar entre 1-12 horas.

Se pueden utilizar auxiliares de filtro durante la filtración. Dichos auxiliares incluyen aunque no están limitados a Celpure P1000, Celatom FW-80, Hyflo Super Cel y Celite. De manera opcional, los auxiliares de filtro pueden estar pre-recubiertos con un auxiliar de filtro. Los métodos de filtración que pueden ser utilizados en este proceso incluyen aunque no están limitados a filtración de flujo tangencial, filtración de tambor raspador recubierto con auxiliar de filtración o filtración de lote.

En casos en donde la extracción se lleva a cabo en pH extremos tales como pH 1 - pH 5 o pH 8 - pH 13 o temperaturas sumamente elevadas tales como 60°C-90°C, la extracción será completada a una velocidad que evita la descomposición excesiva de las ansamitocinas. Si es necesario, la extracción también puede ser ejecutada de manera extremadamente rápida a través de centrifugación continua. En dicho caso, el pH o temperatura del caldo de fermentación sería ajustada a medida que el caldo entra al dispositivo centrífugo de manera que se evita la exposición prolongada a condiciones adversas. Los ejemplos de equipo centrífugo que se han utilizado en el procesamiento por fermentación y podrían emplearse para extraer ansamitocinas incluyen aunque no se limitan a decantadores centrífugos y centrífugas de disco apiladas. El extracto de solvente orgánico retenido puede ser concentrado después bajo presión reducida que contiene las ansamitocinas. De manera alternativa, un solvente miscible en agua puede ser mezclado con el caldo de fermentación y centrifugado para remover sólidos proporcionando una solución libre de sólidos, de fase individual. La solución puede entonces ser procesada mediante, por ejemplo, adición de un solvente inmiscible en agua para ocasionar la

separación de fases orgánica y acuosa seguida por la concentración de la fase orgánica.

Lavado acuoso de ansamitocinas en solución.

5

10

15

20

Las ansamitocinas en una solución de solvente orgánico inmiscible en agua pueden ser lavadas con agua, ácido acuoso, base acuosa, agua parcial o totalmente saturada con sal o una combinación de cualesquiera de los lavados acuosos antes descritos. Ejemplos de ácidos acuosos incluyen, pero no se limitan a, soluciones acuosas de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido fórmico, y ácido fosfórico a un pH entre 1-6.9. En el contexto de esta invención, un ácido acuoso también incluye un sistema regulado en su pH acuoso ácido. Ejemplos de sistemas regulados en su pH ácidos incluyen, pero no se limitan a, fosfato de sodio, fosfato de potasio, acetato de amonio, y formato de amonio, cada uno siendo ajustado en su pH ajustado para uso en sus rangos de regulación de pH ácido respectivos. Los ejemplos de base acuosas incluyen, pero no se limitan a, soluciones acuosas de bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, y fosfato de sodio a un pH entre 7.1-13. En el contexto de esta invención, una base acuosa también incluye un sistema regulado en su pH acuoso básico. Ejemplos de sistemas regulados en su pH básicos incluyen, pero no se limitan a, fosfato de sodio, fosfato de potasio, borato de sodio, y carbonato de amonio cada uno siendo ajustado en pH para uso en sus respectivos rangos de regulación de pH básico.

25

30

Los lavados ácidos o básicos serán completados sin descomposición apreciable de las ansamitocinas que variarían con el pH. Si es necesario, pueden ejecutarse extracciones extremadamente rápidas a través de técnicas centrífugas. Ejemplos de agua parcial o totalmente saturada con sal incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio acuoso en varios niveles de saturación, sulfato de sodio acuoso en varios niveles de saturación, y cloruro de potasio acuoso en varios niveles de saturación. Se pueden efectuar también lavados acuosos en los cuales una mezcla de una solución salina acuosa parcial o totalmente saturada es combinada con una

base acuosa o un ácido acuoso.

Filtración previa a la extracción:

5 De manera alternativa, antes de la extracción, los sólidos en las ansamitocinas que contienen caldo de fermentación pueden ser separados por medio de filtración o centrifugación. Las ansamitocinas en la masa celular sólida pueden ser recuperadas mediante lavado con un solvente tal como etanol, etanol acuoso, u otros solventes orgánicos, tales como acetato de etilo, acetato de butilo, 10 diclorometano o acetona, y son bien conocidos por alguien con experiencia ordinaria en la técnica. Las ansamitocinas en el filtrado pueden ser recuperadas por medio de extracción con un solvente orgánico conocido como se describe en la solicitud.

Purificación de ansamitocinas:

15 El producto crudo puede ser sometido a procedimientos de purificación tales como cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina, seguido por recristalización si es necesario. De manera preferible, la cromatografía es conducida en una columna preempaquetada, tal como un cartucho de gel de sílice Biotage 20 utilizando el sistema de cromatografía Biotage. Las ansamitocinas deseadas pueden ser eluidas desde la columna utilizando un gradiente de solvente que inicia con una mezcla de acetato de etilo y hexano y agregando cantidades crecientes de metanol. Las fracciones que contienen las ansamitocinas deseadas pueden ser depositadas y concentradas. Si se desea, las ansamitocinas pueden ser purificadas de manera 25 adicional por medio de cristalización usando un solvente tal como acetato de etilo para disolver el producto, y agregando después un solvente no polar tal como heptano o hexano para cristalizar el producto puro. El término cristalización como se emplea en la presente abarca también el término precipitación, ya que el sólido formado a partir de la solución puede una estructura amorfa o definida.

30

Complejos de Agente de Enlace Celular/Maitansinoide:

El proceso de la invención puede ser utilizado para elaborar complejos de agente de enlace celular/maitasinoide que son útiles como pro-fármacos activados por tumor. Las ansamitocinas preparadas por medio del proceso de la invención pueden experimentar separación reductiva a maitansinol el cual puede ser utilizado como se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,205,020, 5,416,064, 6,333,410 y 6,441,163 a fin de producir N- metil-L-alanina que contiene derivados de maitansinoide. Estos derivados son conjugados después a agentes de enlace celular, de preferencia anticuerpos, a través de varios enlazadores tales como enlazadores que contienen disulfuro.

EJEMPLOS

Se ilustrará ahora la invención mediante referencia a ejemplos no-limitantes.

EJEMPLO 1 Producción de Ansamitocinas:

Semilla Primaria: Medio de cultivo de semilla VM4-1' (400 ml/matraz) que comprende 2% de almidón soluble, 1% de glucosa, 1% de alimento de soya, 0.5% de licor de maíz, (Roquette) 0.5 % de Soytone, 0.3% de cloruro de sodio, y 0.5% de carbonato de calcio fue vertido dentro de cada uno de los once matraces Erlenmeyer de 2 L de capacidad. Después de la esterilización, cada uno de los matraces fue inoculado con el cultivo PF4-4 (ATCC PTA-3921). Los matraces fueron incubados a 28°C en un agitador orbital a 230 rpm durante 48 h.

Semilla Secundaria: Los contenidos de los matraces de semilla primaria fueron depositados después. Un fermentador de 300 L fue llenado con 100 L del medio de semilla VM4-1'. Después de la esterilización, el fermentador fue inoculado con 4 L del cultivo de semilla primaria depositado. El fermentador se mantuvo a 28°C, con agitación a 80 rpm. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo sobre 30% de saturación mediante aeración y agitación incrementada si es necesaria. Después de la incubación durante 24 h, el cultivo de semilla secundaria estuvo listo para ser transferido dentro de los recipientes de producción.

Producción: Dos fermentadores de producción de 300 L fueron llenados cada uno con 250 L de medio de producción FM4-6 (véase el Cuadro 1). Después de la esterilización, cada uno de los fermentadores fue inoculado con 15 L del cultivo de semilla secundaria. Los fermentadores fueron mantenidos a 28°C con agitación a 107 ± 5 rpm y aeración a 0.4 vvm. Después del día 2, el contenido de oxígeno disuelto se mantuvo sobre 30% al incrementar la velocidad de agitación a un máximo de 170 ± 5 rpm, y la velocidad de aeración hasta un máximo de 1 wm. El título de ansamitocina fue medido diariamente mediante el retiro de una muestra del caldo de fermentación y diluyendo en etanol, seguido por la cuantificación a través de análisis HPLC. La fermentación se continuo hasta el día 10, en cuyo punto, se había nivelado la acreción de ansamitocina. El título de ansamitocina en el día 10 en los dos fermentadores fue de 251 mg/L y 244 mg/L respectivamente. El pH del caldo de fermentación se ajustó a 6.5 mediante la adición de ácido fosfórico. Los fermentadores fueron calentados hasta 55°C y mantenidos a esta temperatura durante 1 h para inactivar el microorganismo. Los fermentadores fueron enfriados a temperatura ambiente para extracción con solvente orgánico.

EJEMPLO 2: Producción de Ansamitocinas usando un proceso de lote de alimentación.

Un fermentador de producción de 1500 L fue llenado con 900 L del medio de producción FM4-6 (véase el Cuadro 1). Después de la esterilización, el fermentador fue inoculado con 54 L del cultivo de semilla secundaria, preparado como se describió con anterioridad. El fermentador fue mantenido a 28°C con agitación a 107 ± 5 rpm y aeración a 0.4 wm. Desde 0 hasta 48 h, una solución acuosa de 28.5% de glucosa fue alimentada a una velocidad de 0.39 mL/L/h. Desde 48 hasta 288 h la alimentación fue cambiada a una solución de existencia que comprende 21.5% de glucosa, 7.1% de Proflo y 7.1% de isobutanol, que fue alimentada a la velocidad de 0.51 mL/L/h. Después del día 2, el contenido de oxígeno disuelto fue mantenido sobre el 20% al incrementar la velocidad de agitación hasta un máximo de 170 ± 5 rpm, y la velocidad de aeración hasta un máximo de 1 wm. El título de ansamitocina

fue medido diariamente a través del retiro de una muestra del caldo de fermentación y diluyendo en etanol, seguido por análisis cuantitativo por medio de HPLC. La fermentación fue continuada hasta el día 13, en cuyo punto, se había nivelado la acreción de ansamitocina. El título de ansamitocina en el día 13 en el fermentador fue de 304 mg/L. El pH del caldo de fermentación fue ajustado hasta 6.5 mediante la adición de ácido fosfórico.

Desactivación Térmica. El fermentador fue calentado hasta 55°C y mantenido a esta temperatura durante 1 h para inactivar el microorganismo. Los fermentadores fueron enfriados hasta una temperatura entre 30 y 40°C para extracción con un solvente orgánico.

EJEMPLO 3: Extracción y Purificación Cromatográfica de Ansamitocinas.

El caldo de fermentación del Ejemplo 2 fue mezclado con un volumen igual de acetato de n-butilo. La mezcla se mantuvo entre 30 y 40°C hasta 45°C, y agitada de manera moderada de forma que el mezclado de las dos fases ocurrió justamente en la interfaz de solvente. La extracción se continuo hasta por 5 días, o, hasta que el análisis HPLC de la capa orgánica indicó que >80% de las ansamitocinas habían sido extraídas. La capa orgánica fue separada después y evaporada utilizando un evaporador de película descendente hasta un volumen final entre 20 y 50 L. El extracto concentrado fue transferido dentro del matraz que contiene 2.2 kg de gel de sílice. Las ansamitocinas crudas fueron recubiertas sobre el gel de sílice mediante evaporación del solvente hasta deshidratación utilizando un evaporador giratorio, operando bajo presión reducida. El sílice recubierto fue transferido después a un módulo de inyección de muestra (SIM), obtenido de Biotage, Inc., Charlottesville, VA. El SIM fue lavado con una mezcla de ciclohexano y hexano (2:1 v/v), y después conectado a un sistema Biotage 150M equipado con un cartucho de sílice. El producto deseado fue eluido a partir de la columna utilizando una mezcla de acetato de etilo:hexano:metanol (29.4:68.6:2.0, v/v/v). Las fracciones que contienen ansamitocinas fueron depositadas y el solvente fue evaporado bajo presión reducida. El producto fue secado de manera adicional bajo alto vacío durante 24 h.

EJEMPLO. Recristalización of Ansamitocinas.

El producto seco de la etapa anterior fue disuelto en acetato de etilo caliente (23 mL/g residuo). La mezcla se mantuvo entre 60-75°C, hasta que se logró la disolución completa de las ansamitocinas. Se agregó heptano (80 mL/g residuo) lentamente, mientras se mantenía la temperatura del lote entre 60-75 °C. Después de que se había agregado todo el heptano, se dejó enfriar el lote a temperatura ambiente. Los cristales fueron recuperados mediante filtración y después secados bajo alto vacío para dar 221 gramos de ansamitocinas puras.

EJEMPLO 5: Extracción de caldo de fermentación con filtración.

El caldo de fermentación (200 mL) preparado como se describió en el Ejemplo 2, fue mezclado de manera vigorosa durante 5 minutos con 200 mL de acetato de n-butilo (200 mL), dando como resultado una emulsión. Se agregó el auxiliar de filtración Cellatom FW-80 (20 g), y la mezcla fue filtrada al vacío a través de un embudo de Buchner que fue previamente recubierto con auxiliar de filtración Cellatom FW-80. La masa de filtro fue lavada con 40 mL de acetato de n-butilo. El filtrado, ahora libre de contaminantes sólidos, que comprende una capa orgánica transparente y una acuosa fue transferido hacia un embudo de separación. La fase acuosa fue drenada. Se retuvo la fase orgánica que contiene las ansamitocinas.

EJEMPLO 6: Extracción de caldo de fermentación con centrifugación usando un solvente inmiscible en agua.

Una parte del caldo de fermentación, preparada como se describió en el Ejemplo 2, fue mezclada de manera vigorosa con una parte de acetato de n-butilo durante 2 min. La emulsión resultante fue centrifugada durante 1 minuto y la capa orgánica que contiene las ansamitocinas, libre de contaminantes sólidos, fue retirada.

EJEMPLO 7: Extracción de caldo de fermentación con centrifugación usando un solvente miscible en agua.

5 Una parte del caldo de fermentación, preparada como se describió en el Ejemplo 2, fue mezclada de manera vigorosa con una parte de acetona. La mezcla fue centrifugada durante 1 minuto para formar en pella los sólidos. El sobrenadante fue retirado y mezclado con una mitad de los hexanos. La capa acuosa separada deja una fase orgánica transparente que contiene las ansamitocinas.

10

EJEMPLO 8: Extracción de fase sólida de ansamitocinas usando lechos hidrofóbicos XAD-16.

15 Un litro de caldo de fermentación, preparado como se describió en el Ejemplo 2, fue sometido a agitación con 10 gramos de lechos XAD-16 durante seis horas. La mezcla fue centrifugada después y se retiró el sobrenadante. La pella fue transferida a una columna pequeña y eluida con agua desionizada, seguida por 90:10 agua desionizada:acetonitrilo. Las fracciones que contienen ansamitocinas fueron combinadas y se evaporó el solvente para dar 112 mg de extracto concentrado. El análisis HPLC indicó que el extracto contenía 50 mg de ansamitocinas.

20

En tanto que se ha descrito la invención en detalle y con referencia a las modalidades específicas de la misma, será evidente para alguien con experiencia ordinaria en la técnica que se pueden hacer varios cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

25 Todas las publicaciones referidas en la presente están incorporadas de forma expresa mediante referencia.

27

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

5 1) cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;

2) extraer ansamitocinas a partir del medio de cultivo con un solvente inmiscible en agua no aromático, usando varias técnicas de centrifugación;

3) concentrar las ansamitocinas extraídas; y

10 4) purificar opcionalmente las ansamitocinas por medio de uno de a), b), c) y d), donde:

a) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina,

b) cristalización,

15 c) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización, y

d) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

2. El proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo productor de ansamitocina es *Actinosynnema spp.*

20 3. El proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo productor de ansamitocina es *Actinosynnema pretiosum*.

4. El proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo productor de ansamitocina es *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 o una cepa derivada del mismo.

25 5. El proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo productor de ansamitocina es *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) o una cepa derivada del mismo.

6. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo a un pH desde 6 hasta 7.

30 7. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo a una temperatura desde 30° hasta 45°C.

8. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque dicho cultivo está en medios de cultivo a un pH en el rango desde 6.5 hasta 8.

9. El proceso según la reivindicación 8, caracterizado porque el pH está en el rango de 7 hasta 7.4.

10. El proceso según la reivindicación 9, caracterizado porque el pH es de 7.2.

11. El proceso según la reivindicación 8, caracterizado porque la temperatura está en el rango desde 15° hasta 35°C.

12. El proceso según la reivindicación 8, caracterizado porque la temperatura está en el rango desde 25° hasta 30°C.

13. El proceso según la reivindicación 8, caracterizado porque la temperatura es de 28°C.

14. El proceso según la reivindicación 13, caracterizado porque la temperatura es de 28°C y el pH es de 7.2.

15. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque se proporciona por lo menos un nutriente adicional durante dicho cultivo.

16. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el nutriente adicional es una fuente de carbono.

17. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el nutriente adicional es una fuente de carbono seguida por una fuente de carbono y un nutriente de proteína.

18. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque se proporciona además durante el cultivo un alcohol o un aldehído que facilita la formación de una cadena lateral de éster C-3 de la ansamitocina.

19. El proceso según la reivindicación 16, caracterizado porque se proporciona además durante el cultivo un alcohol o un aldehído que facilita la formación de una cadena lateral de éster C-3 de la ansamitocina.

20. El proceso según la reivindicación 17, caracterizado porque se proporciona además durante el cultivo un alcohol o un aldehído que facilita la formación de una cadena lateral de éster C-3 de la ansamitocina.

21. El proceso según la reivindicación 16, caracterizado porque la fuente de carbono es glucosa.

22. El proceso según la reivindicación 17, caracterizado porque la fuente de carbono es glucosa.

5 23. El proceso según la reivindicación 17, caracterizado porque el nutriente de proteína es harina de semilla de algodón o harina de soya.

10 24. El proceso según la reivindicación 19, caracterizado porque el aldehído o alcohol se selecciona a partir del grupo que consiste de isobutanol, isobutiraldehído, n-butanol, n-butiraldehído, n-propanol, n-propionaldehído, isopropanol, isopropionaldehído, pentanol, valeraldehído, isopentanol, e isovaleraldehído.

15 25. El proceso según la reivindicación 20, caracterizado porque el aldehído o alcohol se selecciona a partir del grupo que consiste de isobutanol, isobutiraldehído, n-butanol, n-butiraldehído, n-propanol, n-propionaldehído, isopropanol, isopropionaldehído, pentanol, valeraldehído, isopentanol, e isovaleraldehído.

26. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo está a un pH desde 6.5 hasta 8.

20 27. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo está a un pH desde 7 hasta 7.4.

28. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo está a un pH de 7.2.

29. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo está a una temperatura desde 15° hasta 35°C.

25 30. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo está a una temperatura desde 25° hasta 30°C.

31. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo está a una temperatura de 28°C.

30 32. El proceso según la reivindicación 15, caracterizado porque el cultivo está a una temperatura de 28°C y a un pH de 7.2.

33. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que

comprende uno o más de:

(i) inactivar los microorganismos en el medio de cultivo mediante inactivación química o térmica;

5 (ii) tratar el medio de cultivo para facilitar la extracción del solvente de las ansamitocinas, antes de la etapa 2; y

(iii) lavar, en el cual una solución cruda de ansamitocinas en el solvente orgánico se lava con agua, una solución salina acuosa, un ácido acuoso o una base acuosa en cualquier combinación secuencial, antes o después de la precipitación que puede ser ejecutada durante la purificación.

RESUMEN

Un proceso de fermentación a gran escala de una cepa productora de ansamitocina altamente productiva. Un método para aislar ansamitocinas crudas. Un método para purificar ansamitocinas.