



No. 07-063336- -00000-0000

Fecha: 2007-06-22 15:42:08 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE/II Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 50

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

Capítulo II

SOLICITANTE (71) Nombre: **IMMUNOGEN, INC.**
Dirección: **128 Sidney Street**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647**
Domicilio: **CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02139-4239, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**
Lugar de constitución: **CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

REPRESENTANTE (74) Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17'192.062**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSI**

INVENTOR(ES) (72) Nombre y 1- **Cynthia KUO**
Dirección: **11 F, No. 33, Alley 57, Lane 38 Yung-le St., Lujou City, Taipei, TAIWAN**
2- **Graham S. BYNG**
19825 82nd Avenue Se,
Snohomish, Washington 98295, Estados Unidos de América
3- **Wayne C. WIDDISON**
72 Cedar Street,
Somerville, Massachusetts 02143, Estados Unidos de América

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2005/044783** Fecha **12 DE DICIEMBRE DE 2005**

Publicación Internacional No. **WO 2006/078368** Fecha **27 DE JULIO DE 2006**

TÍTULO (54) **"MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANSAMITOCINAS"**

Clasificación Internacional (51) **C12P17/18; A61K39/395; 39/40; 39/44; C12P17/14; 17/16**

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	19 DE ENERO DE 2005	US: 11/037,104

Comprobante de pago No. **07-43,616** Fecha: **31 DE MAYO DE 2007**

Bap

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL.:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: **IMMUNOGEN, INC.**
(30) PRIORIDAD: **ESTADOUNIDENSE**
(31) No. DE SOLICITUD: **US: 11/037,104** (72)INVENTORES: **Cynthia KUO
Graham S. BYNG
Wayne C. WIDDISON**
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: **19 DE ENERO DE 2005**
(33) PAÍS: **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA** (74)APODERADO: **Humberto RUBIO CAMACHO**

Solicitud Internacional No. **PCT/US2005/044783** Fecha **12 DE DICIEMBRE DE 2005**
Publicación Internacional No. **WO 2006/078368** Fecha **27 DE JULIO DE 2006**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANSAMITOCINAS

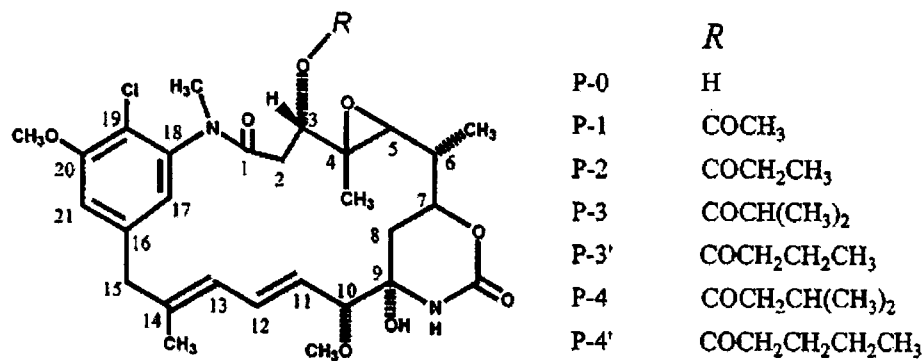
RESUMEN:
Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:
1) cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;
2) extraer ansamitocinas a partir del medio de cultivo con un solvente inmiscible en agua no aromático;
3) concentrar las ansamitocinas extraídas; y
4) purificar las ansamitocinas por medio de uno de a) y b):
a) cristalización, y
b) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

ANEXOS

- X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- X Poderes, si fuere el caso. *Copia autentica reposa en el Exp. 06-046036*
Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT
- X Copia informe búsqueda internacional.
Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- X Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 36.2.b PCT en Fase Nacional.
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.
- X De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- X Arte final 12 x 12
De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros *Opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional*

(11) Figura característica:

Fig. 1. Estructuras de Ansamitocinas



(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA

C.C.

17'192.062 de Bogotá

T.P.

50.007 Consejo Superior de La Judicatura

PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-063336- -00000-0000

Fecha: 2007-06-22 15:42:08 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 50

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 43.616
FECHA : MAYO 31 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	51110864	30/05/2007	4,448,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 July 2006 (27.07.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/078368 A1

(51) International Patent Classification:

C12P 17/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01) C12P 17/14 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01) C12P 17/16 (2006.01)

(74) Agents: MACK, Susan, J. et al.; SUGHRUE MION, PLLC, 2100 Pennsylvania Ave., Nw, Suite 800, Washington, District Of Columbia 20037-3213 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2005/044783

(22) International Filing Date:

12 December 2005 (12.12.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

11/037,104 19 January 2005 (19.01.2005) US

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US (patent), UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:

US 10/840,768 (CIP)
Filed on 7 May 2004 (07.05.2004)

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139-4239 (US).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KUO, Cynthia [CN/CN]; 11F, No.33, Alley 57, Lane 38 Yung-le St., Lujou City, Taipei (TW). BYNG, Graham, S. [GB/US]; 19825 82nd Avenue Se, Snohomish, Washington 98295 (US). WIDDISON, Wayne, C. [US/US]; 72 Cedar Street, Somerville, Massachusetts 02143 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR THE PRODUCTION OF ANSAMITOCINS

(57) Abstract: A process of the large-scale fermentation of a highly productive ansamitocin-producing strains. A method for isolating crude ansamitocins. A method for purifying ansamitocins.

WO 2006/078368 A1

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
SUSAN J. MACK
SUGHRUE MION, PLLC
2100 PENNSYLVANIA AVE., N.W.
SUITE 800
WASHINGTON, DC 20037-3213

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing **21 JUN 2006**
(day/month/year)

Applicant's or agent's file reference
F198922

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US05/44783

International filing date
(day/month/year) 12 December 2005 (12.12.2005)

Applicant
IMMUNOGEN, INC.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46).

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70.

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/ US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

HERBERT J. LILLING

Telephone No. (571) 272-1600

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference F198922	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US05/44783	International filing date (day/month/year) 12 December 2005 (12.12.2005)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 19 January 2005 (19.01.2005)
Applicant IMMUNOGEN, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed.



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (See Box No. III)

4. With regard to the **title**,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/44783

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: C12P 17/18(2006.01);A61K 39/40(2006.01),39/44(2006.01),39/395(2006.01)
C12P 17/14(2006.01),17/16(2006.01)

USPC: 435/118,119,120;424/179.1,181.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/118,119,120;424/179.1,181.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 4,294,757 A (ASAI) 13 October 1981 (13.10.1981), see entire disclosure.	1-5,17-36, 40-42,45-52, 53-73 ----- 6-16,37-39, 43-44
X --- Y	US 4,322,348 A (ASAI et al) 30 March 1982 (30.03.1982), see entire disclosure.	1-5,17-36,40-42,45-52,55-73 ----- 6-16,37-39,43-44
X --- Y	US 4,361,650 A (ASAI et al) 30 November 1982 (30.11.1982), see entire disclosure.	1-5, 17-36,40-42,45-52,55-73 ----- 6-16,37-39,43-44
X	US 5,208,020 A (CHARI et al) 04 May 1993 (04.05.1993), see combination product of the ansamitocin with an antibody.	53-54



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April 2006 (13.04.2006)

Date of mailing of the international search report

21 JUN 2006

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

HERBERT J. LILLING

Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/44783

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,416,064 A (CHARI et al) 16 May 1995 (16.05.1995), see the linking product of a ansamitocin with an antibody.	53-54
X	US 6,441,163 AB1 (CHARI et al) 27 August 2002 (27.08.2002), see the combination product of a linker with the antibody.	53-54

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
SUSAN J. MACK
SUGHRUE MION, PLLC
2100 PENNSYLVANIA AVE., N.W.
SUITE 800
WASHINGTON, DC 20037-3213

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Applicant's or agent's file reference F198922		Date of mailing (day/month/year) 21 JUN 2006
FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below		
International application No. PCT/US05/44783	International filing date (day/month/year) 12 December 2005 (12.12.2005)	Priority date (day/month/year) 19 January 2005 (19.01.2005)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC: Please See Continuation Sheet USPC: 435/118,119,120;424/179.1,181.1		
Applicant IMMUNOGEN, INC.		

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- | | | |
|-------------------------------------|--------------|--|
| ☒ | Box No. I | Basis of the opinion |
| ☐ | Box No. II | Priority |
| ☐ | Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☐ | Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ | Box No. V | Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☐ | Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ | Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☐ | Box No. VIII | Certain observations on the international application |

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Date of completion of this opinion 13 April 2006 (13.04.2006)	Authorized officer HERBERT J. LILLING <i>H. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600
--	---	---

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US05/44783

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

- ☐ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ on paper
- ☐ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed.
- ☐ filed together with the international application in electronic form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US05/44783

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims <u>6-16, 37-39, 43-44</u>	YES
	Claims <u>1-5, 17-36, 40-42, 45-73</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-73</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1-73</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-5, 17-36, 40-42, 45-52 and 55-73 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by Asai (U.S. 4,294,757), Asai et al. (U.S. 4,322,348) or Asai et al. (U.S. 4,361,650). Each of the references teaches the processing of purification of ansamitocins which includes the extraction with acetate, aldehydes or halogenated compounds within the scope of the claimed inventions. In addition, the references teaches the purification by crystallization and the use of silica gel. The references teaches the same pH which includes pH 7.2 as well as the temperature for carrying the fermentation.

Claims 53-54 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by Chari et al I. U.S. 5,208,050; II. U.S. 5,416,064 or III. U.S. 6,441,163. Each of the references teaches a product which is a combination (complex or binding agent complex) of ansamitocins with a linking antibody that is considered to be within the scope of the claimed inventions.

Claims 6-16, 37-39 and 43-44 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Asai (U.S. 4,361,650) alone or further in view of hatano et al. (U.S. 4,356,2650 references that teaches the synthesis of various 3 substituted compounds with a "culture medium including a member selected from the group consisting of isobutyl aldehyde, isobutyl alcohol and a fatty acid ester of isobutyl alcohol: which disclosure renders obvious the claimed inventions.

Claims 1-73 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus the claimed inventions have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US05/44783

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of IPC:

C12P 17/18(2006.01);A61K 39/40(2006.01),39/44(2006.01),39/395(2006.01)

C12P 17/14(2006.01),17/16(2006.01)

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 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).

15 El proceso de fermentación con cepas *Actinosynnema* spp tales como *Actinosynnema pretiosum* produce varias especies de ansamitocina que tienen 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 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.

20 Se han descrito los procesos para la producción de ansamitocina a partir de la fermentación de *Actinosynnema* spp (Patentes de los Estados Unidos de 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 recrystalización o cromatografía.

35 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.

40

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

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.

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

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:

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

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

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 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,

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 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.

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;

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,

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

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;

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,

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:

(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) Desactivar 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 inmiscible 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 inmiscible 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.

5 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 inmiscible en agua no aromático.

El proceso anterior puede incluir de manera opcional:

10 (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:

15 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:

20 (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.

25 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; 4,228,239; 4,331,598; y 4,356,265).

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 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 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.

5

10

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 (Wako)	0.05	0.04			
K ₂ HPO ₄ (Wako)		0.05	0.06	0.06	0.06
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.5	0.5			
NaHCO ₃ (Wako)		0.2			
Zeolita	0.1				
FeSO ₄ 7H ₂ O (Wako)	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0002				
CoCl ₂ 6H ₂ O (Baker)	0.001			0.0005	0.0005
Ácido Nicotínico	0.0002				
MnSO ₄ H ₂ O	0.0002				

Isobutanol (Tedo)	0.1	0.5	0.5	0.3	0.3
SAG471 (Witco)		0	0.06	0.04	0.04
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: 121°C, 20 minutos	
	<u>Medio de Cultivo, YM.4-Y</u>	
	(%, p/v)	
	Almidón soluble (BDH)	2.0
15	Glucosa (Shuling)	1.0
	Alimento de soya (ADM)	1.0
	Licor de Maíz (Solulys)	0.5
10	Soytone (Difco)	0.5
	NaCl (Wako)	0.3
20	CaCO ₃ (Hayashi)	0.5
	pH 6.8; Esterilización: 121°C, 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:

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:

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.

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.

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:

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.

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 elusión 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 eluída 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 eluída 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.

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.

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:

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, 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:

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 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 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 tener una estructura amorfa o definida.

Complejos de Agente de Enlace Celular/Maitansinoide:

El proceso de la invención puede ser utilizado para elaborar complejos de agente de enlace celular/maitansinoide 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

5

describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,20S,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.

10

EJEMPLO 1 Producción de Ansamitocinas:

15

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.

20

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.

25

30

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 desactivar el microorganismo. Los fermentadores fueron enfriados a temperatura ambiente para extracción con

35

40

solvente orgánico.

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

5

10

15

20

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.

25

Desactivación Térmica. El fermentador fue calentado hasta 55°C y mantenido a esta temperatura durante 1 h para desactivar 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.

30

35

40

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.

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.

5

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

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 retiro 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.

10

15

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.

20

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

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;
- 3) concentrar las ansamitocinas extraídas; y
- 10 4) purificar las ansamitocinas por medio de uno de a) y b):
- a) cristalización, y
- b) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.
2. Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:
- 15 1) cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;
- 2) tratar el medio de cultivo para facilitar la extracción de solvente de ansamitocinas;
- 20 3) extraer las ansamitocinas a partir del medio de cultivo con un solvente inmiscible en agua no-aromático;
- 4) concentrar las ansamitocinas extraídas; y
- 5) purificar las ansamitocinas por medio de uno de a) y b):
- a) cristalización, y
- 25 b) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.
3. Un proceso para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:
- 30 1) cultivar un microorganismo productor de ansamitocina en un medio de cultivo líquido;
- 2) extraer las ansamitocinas a partir del medio de cultivo con un solvente inmiscible en agua no aromático;
- 3) filtrar para remover sólidos, permitiendo el aislamiento de la fase orgánica;
- 4) concentrar las ansamitocinas desde la fase orgánica; y
- 35 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,
- c) cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina seguida por cristalización, y
- 40 d) cristalización seguida por cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina.

4. El proceso de conformidad con la reivindicación 3, que comprende además el uso de un auxiliar de filtro durante la filtración.

5. 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, utilizando una técnica de centrifugación;

3) concentrar las ansamitocinas extraídas; y

10 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

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

6. 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) centrifugar el medio de cultivo en presencia de un solvente orgánico miscible en agua para remover sólidos;

3) agregar un solvente no aromático inmiscible en agua y extraer las ansamitocinas dentro de una capa orgánica;

25 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,

30 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.

7. El proceso de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque se agrega una sal a la fase orgánica durante la extracción.

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

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

40 2) extraer las ansamitocinas a partir del medio de cultivo mediante extracción de fase sólida sobre una resina;

3) eluir las ansamitocinas desde la resina mediante elusión isocrática o de

gradiente con un solvente orgánico o un solvente orgánico combinado con agua;

4) concentrar las ansamitocinas eluidas; y

5) purificar de manera opcional las ansamitocinas por medio de uno de a), b), c) y d):

5 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

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

9. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el microorganismo productor de ansamitocina es *Actinosynnema spp.*

15 10. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el microorganismo productor de ansamitocina es *Actinosynnema pretiosum*.

11. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el microorganismo productor de ansamitocina es *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 o una cepa derivada del mismo.

20 12. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el microorganismo productor de ansamitocina es *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) o una cepa derivada del mismo.

25 13. El proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el tratamiento comprende la desactivación de los microorganismos mediante calentamiento del caldo de fermentación o por medio de adición de cloroformo al caldo de fermentación.

14. El proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el tratamiento comprende calentamiento, ajuste de pH, tratamiento enzimático o tratamiento químico.

30 15. El proceso de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el tratamiento químico comprende la adición de sulfato poli férrico, un agente de des-emulsificación, sílice ahumada o un cosolvente.

35 16. El de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque los microorganismos son desactivados mediante calentamiento a aproximadamente 50° hasta aproximadamente 55°C.

17. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 7.

40 18. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 30° hasta aproximadamente 45°C.

19. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no-aromático es seleccionado a partir del grupo que comprende acetatos de alquilo, en donde la cadena alquilo es lineal o ramificada y tiene 1-5 átomos de carbono, dialquil cetonas, y solventes halogenados.

20. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no-aromático es seleccionado a partir del grupo que comprende acetato de n-butilo, acetato de etilo, y acetato de metilo.

21. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no-aromático es metil isobutil cetona.

22. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no-aromático es diclorometano.

23. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no-aromático es acetato de n-butilo.

24. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 30° hasta aproximadamente 45°C y el solvente inmiscible en agua no aromático es acetato de n-butilo.

25. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la relación del medio de cultivo al solvente inmiscible en agua no aromático es 1:1 en volumen.

26. El proceso de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la relación del medio de cultivo al solvente inmiscible en agua no aromático es 1:1 en volumen.

27. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el cultivo está en el medio de producción a un pH en el rango de aproximadamente 6.5 hasta aproximadamente 8.

28. El proceso de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el pH está en el rango de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 7.4.

29. El proceso de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el pH es de aproximadamente 7.2.

30. El proceso de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque la temperatura está en el rango de aproximadamente 15° hasta aproximadamente 35°C.

31. El proceso de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque la temperatura está en el rango de aproximadamente 25° hasta aproximadamente 30°C.

32. El proceso de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado

porque la temperatura es de aproximadamente 28°C.

33. El proceso de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque la temperatura es de aproximadamente 28°C y el pH es de aproximadamente 7.2.

5 34. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque se proporciona por lo menos un nutriente adicional durante el cultivo.

35. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el nutriente adicional es una fuente de carbono.

10 36. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el nutriente adicional es una fuente de carbono seguida por una fuente de carbono y un nutriente de proteína.

15 37. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, 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.

38. El proceso de conformidad con la reivindicación 35, 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 39. El proceso de conformidad con la reivindicación 36, 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.

40. El proceso de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque la fuente de carbono es glucosa.

25 41. El proceso de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque la fuente de carbono es glucosa.

42. El proceso de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque el nutriente de proteína es harina de semilla de algodón o harina de soya.

30 43. El proceso de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el aldehído o alcohol es seleccionado a partir del grupo que comprende isobutanol, isobutiraldehído, n-butanol, n-butiraldehído, n-propanol, n-propionaldehído, isopropanol, isopropionaldehído, pentanol, valeraldehído, isopentanol, y isovaleraldehído.

35 44. El proceso de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque el aldehído o alcohol es seleccionado a partir del grupo que comprende isobutanol, isobutiraldehído, n-butanol, n-butiraldehído, n-propanol, n-propionaldehído, isopropanol, isopropionaldehído, pentanol, valeraldehído, isopentanol, e isovaleraldehído.

45. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cultivo está a un pH de aproximadamente 6.5 hasta aproximadamente 8.

40 46. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cultivo está a un pH de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 7.4.

47. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cultivo está a un pH de aproximadamente 7.2.

48. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cultivo está a una temperatura de aproximadamente 15° hasta 35°C.

49. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cultivo está a una temperatura de aproximadamente 25° hasta aproximadamente 30°C.

50. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cultivo está a una temperatura de aproximadamente 28°C.

51. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cultivo está a una temperatura de aproximadamente 28°C y a un pH de aproximadamente 7.2.

52. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende uno o más de:

(i) desactivar los microorganismos en el medio de cultivo a través de desactivación química o térmica;

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

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

53. Un complejo maitansinoide de agente de enlace celular preparado mediante el enlace de un maitansinoide derivado a partir de una ansamitocina preparada a través del proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para un agente de enlace celular.

54. El complejo maitansinoide de agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 53, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo.

55. Un proceso para extraer ansamitocinas a partir de un caldo de fermentación, el proceso que comprende:

1) desactivar el microorganismo productor de ansamitocinas en el caldo de fermentación; y

2) extraer las ansamitocinas a partir del caldo de fermentación con un solvente inmiscible en agua no aromático.

56. El proceso de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque la desactivación es mediante calentamiento del caldo de fermentación o por medio de adición de cloroformo al caldo de fermentación.

57. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque la desactivación es mediante calentamiento del caldo de fermentación desde aproximadamente 50° hasta aproximadamente 55 °C.

58. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 7.

59. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 30° hasta aproximadamente 45°C.

60. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no aromático es seleccionado a partir del grupo que consta de acetatos de alquilo, en donde la cadena alquilo es lineal o ramificada y tiene 1-5 átomos de carbono, dialquil cetonas, y solventes halogenados.

61. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no aromático es seleccionado a partir del grupo que comprende acetato de n-butilo, acetato de etilo y acetato de metilo.

62. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no aromático es metil isobutil cetona.

63. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no aromático es diclorometano.

64. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque el solvente inmiscible en agua no aromático es acetato de n-butilo.

65. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque la extracción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 30° hasta aproximadamente 45°C y el solvente inmiscible en agua no aromático es acetato de n-butilo.

66. El proceso con la reivindicación 55, caracterizado porque la relación del caldo de fermentación al solvente inmiscible en agua no aromático es 1:1 en volumen.

67. El proceso con la reivindicación 55, que comprende además tratar el caldo de fermentación para facilitar la extracción de solvente de ansamitocinas, antes de la etapa 2.

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

1) extraer ansamitocinas desde un caldo de fermentación con un solvente inmiscible en agua no-aromático; y

2) filtrar para remover sólidos, permitiendo el aislamiento de una fase orgánica.

69. El proceso de conformidad con la reivindicación 68, que comprende además uno o ambos de:

(i) desactivar los microorganismos en el caldo de fermentación químicamente o a través de calentamiento; y

(ii) tratar el caldo de fermentación para facilitar la extracción de solvente de ansamitocinas, antes de la etapa 1.

70. Un proceso para extraer ansamitocinas desde un caldo de fermentación, el proceso que comprende: extraer ansamitocinas desde un caldo de fermentación mediante centrifugación con un solvente inmiscible en agua no-aromático.

71. El proceso de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado porque el

proceso de extracción comprende además uno o ambos de:

(i) desactivación de los microorganismos en el caldo de fermentación a través de medios químicos o térmicos; y

(ii) tratar el caldo de fermentación para facilitar la extracción de solvente de ansamitocinas, antes de o durante la centrifugación.

72. Un proceso para remover los desechos sólidos desde un caldo de fermentación, el proceso que comprende:

centrifugar el caldo de fermentación en presencia de un solvente orgánico miscible en agua para remover sólidos en tanto que se retienen las ansamitocinas en la solución.

73. El proceso de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque el proceso para remover desechos sólidos desde el caldo de fermentación comprende además uno o ambos de:

(i) desactivación de microorganismos en el caldo de fermentación químicamente o mediante calentamiento; y

(ii) tratar el caldo de fermentación para facilitar la extracción de solvente de ansamitocinas, antes de o durante la centrifugación.

•
•
•
•

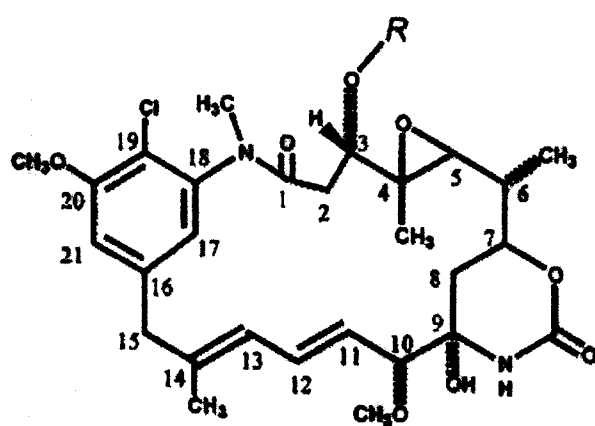
RESUMEN

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.

5

1/1

Fig. 1. Estructuras de Ansamitocinas



	<i>R</i>
P-0	H
P-1	COCH ₃
P-2	COCH ₂ CH ₃
P-3	COCH(CH ₃) ₂
P-3'	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
P-4	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
P-4'	COCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃

PCT REQUESTOriginal (for **SUBMISSION**)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.175)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	F198922
I	Title of Invention	METHODS FOR THE PRODUCTION OF ANSAMITOCINS
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	IMMUNOGEN, INC.
II-5	Address	128 Sidney Street Cambridge, Massachusetts 02139-4239 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	202-293-7060
II-9	Facsimile No.	202-293-7860

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	KUO, Cynthia
III-1-5	Address	11F, No.33, Alley 57, Lane 38 Yung-le St. Lujou City Taipei Taiwan, Province of China
III-1-6	State of nationality	CN
III-1-7	State of residence	CN
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	BYNG, Graham, S.
III-2-5	Address	19825 82nd Avenue SE Snohomish, Washington 98295 United States of America
III-2-6	State of nationality	GB
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	WIDDISON, Wayne, C.
III-3-5	Address	72 Cedar Street Somerville, Massachusetts 02143 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	MACK, Susan, J.
IV-1-2	Address	SUGHRUE MION, PLLC 2100 Pennsylvania Ave., NW Suite 800 Washington, District of Columbia 20037-3213 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	202-293-7060
IV-1-4	Facsimile No.	202-293-7860
IV-1-6	Agent's registration No.	30
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	LIU, Fang (51,283); KASPER, Alan, J. (25,426)
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
V-3	Identification of parent application or patent grant	
V-3-1	Designation	US
V-3-1-1	Kind of parent application or grant	continuation-in-part
V-3-1-2	Parent application or grant No.	10/840,768
V-3-1-3	Parent application or grant date	07 May 2004 (07.05.2004)
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	19 January 2005 (19.01.2005)
VI-1-2	Number	11/037,104
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description	26	-
IX-3	Claims	14	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	1	-
IX-7	TOTAL	47	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-15	Separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other	Transmittal Sheet	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	MACK, Susan, J.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

PCT REQUESTOriginal (for **SUBMISSION**)**FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY**

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PCT

Original (for SUBMISSION)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.175)
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	F198922

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	10
1-2	line	8
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	ATCC American Type Culture Collection
1-3-2	Address of depositary institution	10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
1-3-3	Date of deposit	11 December 2001 (11.12.2001)
1-3-4	Accession Number	ATCC PTA-3921
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designations
2	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
2-1	page	9
2-2	line	18
2-3	Identification of deposit	
2-3-1	Name of depositary institution	ATCC American Type Culture Collection
2-3-2	Address of depositary institution	10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
2-3-3	Date of deposit	11 September 1979 (11.09.1979)
2-3-4	Accession Number	ATCC 31565
2-5	Designated States for Which Indications are Made	all designations

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

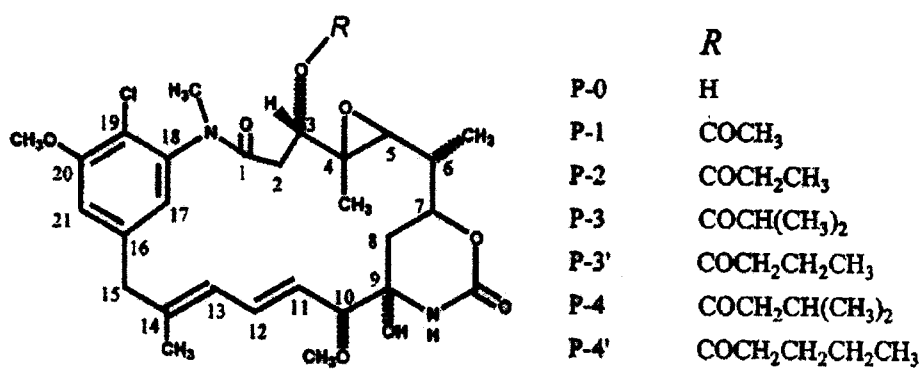
0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the International Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

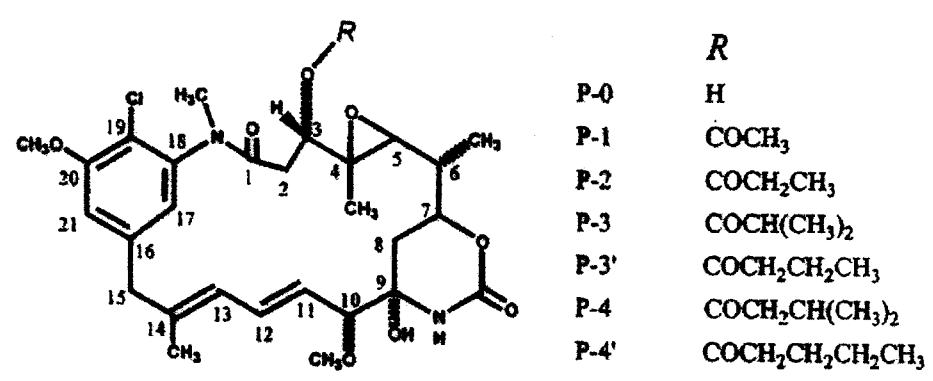
1/1

Fig. 1. Estructuras de Ansamitocinas



1/1

Fig. 1. Estructuras de Ansamitocinas



81 9

HUMBERTO RUBIO & CIA LTDA.
ABOGADOS

PODER

El abajo firmado, en nombre y representación de
IMMUNOGEN, INC

Domiciliado en:

**128 Sidney Street, Cambridge,
Massachusetts, Estados Unidos
de América**

por el presente conferimos poder amplio y suficiente a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO domiciliados en Bogotá, Colombia, para solicitar de las oficinas y autoridades correspondientes la obtención de registros, renovaciones, traspasos y en general todo lo relacionado con el mantenimiento, obtención y protección de sus marcas de fábrica, denominaciones comerciales, marcas de comercio y patentes, licencias sanitarias a cuyo efecto le faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios en cumplimiento del objeto indicado; elevar solicitudes, descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos; abonar todos los impuestos y cuotas de cualquier otros pagos determinados por la Ley; recibir todos los documentos presentados, solicitar testimonios, desistir y enmendar solicitudes, cobrar y percibir para oponerse y protestar contra cualquier solicitud, que a juicio del apoderado, pudieran prestarse a confusión o infringir o de cualquier modo perjudicar las marcas, denominaciones o patentes del Mandante. A los mandatarios se les otorga autorización amplia y bastante para contestar todos los reclamos y las demandas presentadas ante autoridades administrativas y judiciales, desistir de procedimientos, transar conflictos, pudiendo así mismo sustituir este Poder en todo o en parte y revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado hoy

En

Firma(s)/ Signature(s)

W. Blattler
Walter A. Blattler, Vice-President, Research

Nombre de cada firmante/
Name of each signor

Executive Vice President,
Science and Technology

Cargo de cada firmante/
Position of each signor

POWER OF ATTORNEY

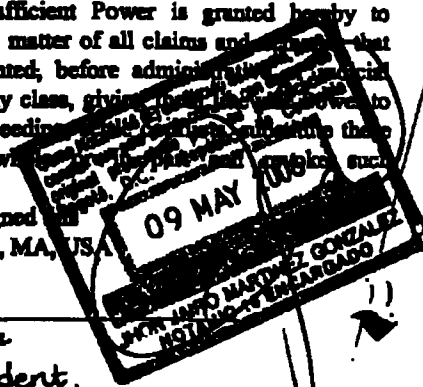
The undersigned, in the name and on behalf of
IMMUNOGEN, INC.

with domicile at:

**128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139-4239, US**

hereby grant full and sufficient Power of Attorney to a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO from Bogotá, Colombia, to apply to the proper officers and authorities for the issue of registrations, renewals, assignments, proofs of renewals and in general all that is related to the maintenance, obtention and protection of its trademarks, tradenames, commercial marks, patents and sanitary licenses; to which end it empowers them to take all steps necessary before said authorities for the object stated; to file petitions, prepare descriptions; make protests, declarations, appeals and objections; pay taxes and other charges required by law; apply for certifications, receive documents and take testimony abandon and amend applications and collect refunds; to oppose, ask for the cancellation of and protest any application or registration which in their judgment could lead to confusion or could be considered an infringement or could in any form prejudice the undersigned's trademarks, tradenames, patents and commercial marks. To the said mandatory sufficient Power is granted hereby to answer in the matter of all claims and suits that maybe presented; before administrative and judicial officers of any class, giving power and authority to abandon proceedings and to transact and settle these present in whatever manner and making such substitutions.

Given and signed
in Cambridge, MA, USA



HUMBERTO RUBIO & CIA LTDA.
ABOGADOS

52 8.

CERTIFICADO NOTARIAL (Individuo)

A los días del mes de ante mi,
Notario Público de compareció personalmente

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento
que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para
otorgarlo.

NOTARIAL CERTIFICATE (Individual)

On this 8 day of March before me, a Notary
Public of 01901, MA personally appeared to

me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has
(have) legal capacity to execute it.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 8 de Marzo de 2005
compareció(eron) personalmente

Walter A. Blattler

a quien(es) conozco como la(s) persona(s) que
firma(n) este documento en representación de la
sociedad/compañía denominada

IMMUNOGEN, INC.

Certifico:

a) Que

IMMUNOGEN, INC.

es una sociedad/compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las Leyes de U.S.A.

b) Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es
120 Sidney Street, Cambridge
Massachusetts U.S.A.

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada sociedad/compañía.

d) Que

Walter A. Blattler

está autorizado para otorgar el presente poder
anterior está probado por medio de los documentos
que certifico he visto.

Ciudad hoy 8 de Marzo de 2005.

NOTARIAL CERTIFICATE (Corporation)

On this 8 day of March, 2005
personally appeared Walter Blattler

whom I know to be the person(s) who signed this
document as representative(s) of the
corporation/company named

ImmunoGen, Inc.

I Certify:

a) That

ImmunoGen, Inc.

is a corporation/company legally constituted and in
existence accordance with the law of U.S.A.

b) That the domicile of said corporation/company is

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are comprised
within the object set forth in the charter of the
mentioned corporation/company.

d) That Mr(s).

Walter Blattler PI

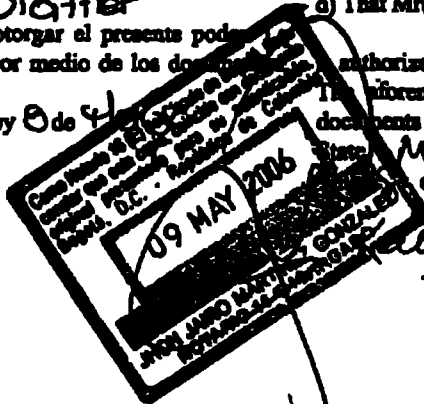
is authorized to grant the present Power of Attorney.
The aforementioned was duly proven through the
documents and I duly verify having seen them.

State MA

day of March, 2005

Jelly A. Dannelly

7-18-08 Comm 1551



53 9

TRADUCCION OFICIAL No. 084-05, DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, SELLADO CON EL SELLO DEL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL, HOY MARZO 28, 2005, EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA.

La Comunidad de Massachusetts
William Francis Galvin
Secretario de la Comunidad
Apostilla
(Convention de la Haya du 5 octobre 1961)

1. Ciudad: Estados Unidos de América
Este documento publico
2. Ha sido firmado por: KELLY DONNELLY
3. Actuando como: NOTARIO PUBLICO
4. Porta el sello y estampilla de:
El Estado de Massachusetts, cuyo nombramiento vence Julio 18, 2008

CERTIFICADO

5. En: Boston-Massachusetts
7. por: el Secretario de la Comunidad
8. No. 1055182
9. Sello y estampilla:

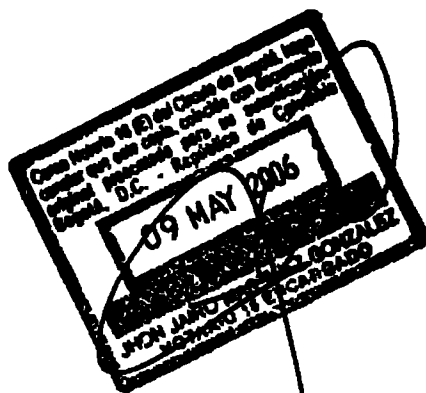
6. El 16 de Marzo del 2005

10. Firma:

Gran Sello de la Comunidad

William Francis Galvin
Secretario de la Comunidad

NO SE ASUME
LA VERACIDAD DEL TEXTO
2005 MAR 20 A 9 46
Jefe de LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

Sergio Montoya
CITA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Sergio Montoya Montoya
Traductor e Interprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1991

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Lawrence

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

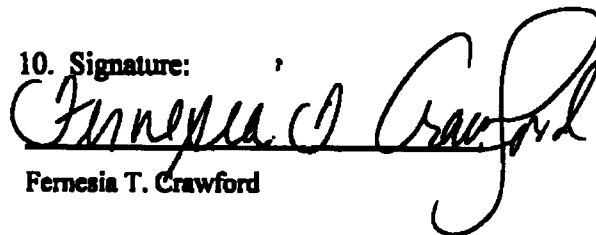
6. the seventh of March, 2006

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 06013764-3

9. Seal/Stamp:

10. Signature:


Fernesia T. Crawford



No. 07-063336- -00000-0000

Fecha: 2007-06-22 15:42:08 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE Y M. EYE 378 FASENACIONALI
Act. 41 PRESENTACION FOLIOS: 50



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

[X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- ◆ Descripción de la invención [X]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [X]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

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 []

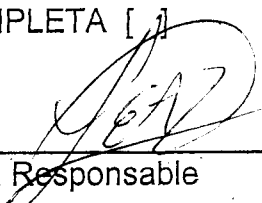
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se 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 trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha 22 JUN. 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia