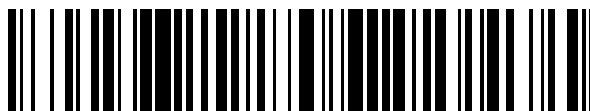


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 875**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2005** **E 12002069 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 2514828**

54 Título: **Procedimiento para preparar ansamitocinas purificadas**

30 Prioridad:

**19.01.2005 US 37104**

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

**29.04.2019**

73 Titular/es:

**IMMUNOGEN, INC. (100.0%)**  
**830 Winter Street**  
**Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**WIDDISON, WAYNE C.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 710 875 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar ansamitocinas purificadas

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a un procedimiento para preparar ansamitocinas purificadas. Ansamitocinas se refiere a una mezcla de ansamitocinas que difieren en su cadena lateral de éster en C-3. Las ansamitocinas se pueden convertir en maitansinol con alcohol en C-3.

**Antecedentes de la invención**

10 Las ansamitocinas son compuestos muy citotóxicos obtenidos de fermentación de microorganismos tales como *Actinosynnema pretiosum*. Las ansamitocinas se han convertido químicamente en maitansinoides que contienen tiol, cuyo uso terapéutico en forma de conjugados de agente de unión a células-maitansinoide se ha descrito (patentes de EE.UU. n° 5.208.020; 5.410.064; 6.333.410; y 6.441.163).

15 El procedimiento de fermentación con cepas del género *Actinosynnema* tales como *Actinosynnema pretiosum* produce varias especies de ansamitocinas que llevan distintos sustituyentes éster en C-3 (Fig. 1). Los diferentes ésteres en C-3 producidos incluyen P-3 (isobutirilo), P-3' (n-butirilo), P-2 (propionilo), P-4 (iso-valerilo), P-4' (n-valerilo). Todos estos ésteres se pueden escindir de forma reductora para dar el maitansinol con alcohol en C-3 (P-0), que es el precursor para la síntesis de maitansinoides que contienen tiol. Además, se producen pequeñas cantidades de ansamitocinas no deseadas que están modificadas en otros sitios, tales como N-desmetilo, 20-O-desmetilo y 19-descloro. Tras la desacilación reductora estas ansamitocinas no producen maitansinol.

20 Se han descrito procedimientos para producir ansamitocinas a partir de la fermentación del género *Actinosynnema* (Patentes de EE.UU. n° 4.162.940; 4.450.234; 4.228.239; 4.331.598; y 4.356.265). El rendimiento de ansamitocinas producidas varía, con valores que en general están en el intervalo de 12 mg/l a 100 mg/l. Las ansamitocinas típicamente se recuperan y purifican por un procedimiento de múltiples etapas que implican la adición de un coadyuvante de filtración y un disolvente orgánico al caldo de fermentación completo, seguido de concentración de la capa orgánica y precipitación con éter de petróleo. El precipitado se purificaba más usando cromatografía en sílice y cristalización, seguido de la purificación adicional por recristalización o cromatografía.

25 Por lo tanto, el procedimiento es difícil e implica varias etapas donde debe manejarse material muy tóxico. Esto hace que el aumento de escala de dicho procedimiento sea muy difícil. Además, se debe asegurar la seguridad del operador humano a lo largo de las diferentes etapas del procesamiento.

30 Una solicitud reciente (US 2002/0015984 A1) reivindica algunas mejoras en el procedimiento para la producción de ansamitocinas. Se describe que los valores de ansamitocinas en el caldo de fermentación están en el intervalo de 65 a 86 mg/l. Las mejoras reivindicadas incluían inactivación térmica del caldo a 75°C, extracción en un disolvente hidrocarbonado aromático tal como tolueno, cromatografía por columna de sílice abierta, seguido de cristalización.

35 Los documentos US 4.307.016 y US 4.361.650 enseñan el aislamiento de 20-desmetoxi-20-hidroxi-maitansinol por extracción en fase sólida aprovechando la propiedad débilmente ácida y lipófila de los compuestos de esta clase. El adsorbente preferido usado es gel de sílice.

40 Con el fin de reducir el coste de producción de ansamitocinas, se han producido nuevas cepas del género *Actinosynnema* que dan valoraciones significativamente mayores (hasta 400 mg/l en fermentadores) que las descritas previamente. Los procedimientos descritos previamente para la producción de ansamitocinas tienen varios inconvenientes, y por lo tanto no se pueden adaptar para las nuevas cepas de alta producción que se han desarrollado. Por ejemplo, la inactivación térmica a 75°C da como resultado algo de degradación de la ansamitocina y una pérdida de rendimiento de 10 a 20%. La extracción del caldo de fermentación que contiene alto contenido de ansamitocinas con hidrocarburos aromáticos es ineficaz e incompleta, puesto que las ansamitocinas no son muy solubles en dichos disolventes. La purificación de las ansamitocinas en columnas de sílice autoempaquetadas abiertas tiene dos inconvenientes: 1) variabilidad de un lote a otro en la pureza y recuperación, y 2) exposición humana significativa que produce problemas de seguridad.

45 Por lo tanto, existe una necesidad de producir ansamitocinas con altos rendimientos y también de proporcionar un procedimiento eficaz para su aislamiento y purificación, a la vez que se minimiza la exposición del trabajador al fármaco altamente tóxico.

**Resumen de la invención**

50 Un procedimiento para preparar ansamitocinas purificadas que comprende las etapas de:

- 1) Cultivo de un microorganismo productor de ansamitocinas en un medio de cultivo líquido;
- 2) Tratamiento opcional del medio de cultivo para facilitar la extracción de ansamitocinas;

- 3) Extracción en fase sólida de ansamitocinas del medio de cultivo sobre una resina;
- 4) Elución isocrática o con gradiente de ansamitocinas de la resina usando un disolvente orgánico o un disolvente orgánico combinado con agua;
- 5) Concentración de las ansamitocinas extraídas; y
- 5 6) Opcionalmente purificación adicional de las ansamitocinas por una 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 de cristalización, y
  - d) cristalización seguida de cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina;
- 10 y en donde dichas ansamitocinas comprenden una mezcla de compuestos de la estructura de la figura 1, en donde R es COCH<sub>3</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, COCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. El procedimiento puede incluir opcionalmente:
  - (i) inactivación química o térmica de los microorganismos en el caldo de fermentación;
  - (ii) una etapa de lavado en la que una solución bruta de ansamitocinas en disolvente orgánico se lava con agua, una solución salina acuosa, un ácido acuoso o una base acuosa en cualquier combinación secuencial, sea antes o después de la precipitación cuando se lleva a cabo durante la purificación.

En los métodos descritos antes, se prefiere que el microorganismo productor de ansamitocinas sea del género *Actinosynnema*, más preferiblemente *Actinosynnema pretiosum*. El microorganismo productor de ansamitocinas también puede ser *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 o cepas derivadas del mismo o *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) o cepas derivadas del mismo. Como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.450.234, *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 se depositó en (i) el Instituto de la Fermentación, Osaka, 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón, el 20 de agosto, 1979, con el número de acceso de IFO 13963; (ii) Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (antes Instituto de Investigación de la Fermentación), Agencia de Tecnología y Ciencia Industriales, Ministerio de Comercio Internacional e Industria, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, Japón, el 29 de agosto, 1979, con el número de acceso de FERM-P NO. 5185; y (iii) la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU., el 11 de septiembre, 1979, con el número de acceso de ATCC 31565. Además, *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 se depositó bajo las disposiciones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU., el 11 de diciembre, 2001, y se ha concedido el nº de acceso de ATCC PTA-3921.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura de diferentes ésteres en C-3 de ansamitocinas que se pueden hacer por fermentación.

### Descripción detallada de la invención

35 Se describen métodos para el cultivo de un microorganismo altamente productivo para ansamitocinas en un medio de cultivo líquido en fermentadores grandes. Si es necesario, el microorganismo se puede inactivar por tratamiento térmico o tratamiento con cloroformo antes de la etapa de extracción.

Las ansamitocinas purificadas que podrían incluir una mezcla de diferentes ésteres en C-3, tales como ansamitocinas P-3, P- 3', P-4, P-4', P-2 y P-1 (Fig. 1), se pueden tratar con un agente de reducción para dar el compuesto con hidroxilo en C-3, maitansinol (P-0). Las ansamitocinas purificadas típicamente contienen solo cantidades minoritarias de ansamitocinas no deseadas que tienen modificaciones en sitios de la molécula distintos de la posición C-3. Preferiblemente, la cepa productora de ansamitocinas es del género *Actinosynnema*. Más preferiblemente, el microorganismo es *Actinosynnema pretiosum*. El microorganismo también puede ser *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) y sus derivados y *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31566 y sus derivados. El microorganismo se puede desarrollar por técnicas de cultivo de fermentación que son conocidas para los expertos en la técnica, usando los medios específicos descritos en la presente memoria o cualquier otro medio que se describa en la técnica (Patentes de EE.UU. nº 4.162.940; 4.450.234; 4.228.239; 4.331.598; y 4.350.265).

El microorganismo se puede cultivar en un medio de cultivo líquido. El crecimiento de la cepa bacteriana PF4-4 se lleva a cabo en condiciones controladas y se puede usar una amplia variedad de medios y condiciones. Por ejemplo, PF4-4 se puede cultivar en condiciones similares y con medios similares a los descritos para ATCC 31565 o ATCC 31281 en las patentes de EE.UU. publicadas nº 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. Chem.* 48, 1721-1729, 1984. Por lo tanto, la cepa PF4-4 tolera una amplia

## ES 2 710 875 T3

variedad de fuentes de carbono, que también soporta la producción fermentativa de ansamitocinas. Se dan medios de cultivo de ejemplo en las tablas 1 y 2. La tabla 1 muestra los medios que soportan la producción de ansamitocinas por microorganismos productores de ansamitocinas, tales como *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 y la tabla 2 muestra medios adicionales adecuados para la propagación y/o crecimiento de *Actinosynnema pretiosum* PF4-4, y otros microorganismos productores de ansamitocinas.

5

Tabla 1. Composición de los medios de producción (las entradas son % en p/v)

	FM 27-44	FM 112-37	FM 4-4	FM 4-6	FM 4-7
Dextrina (Lodex-5)	6	6	5	5	5
Maltosa (Difco)	4	4	2	2	2
Proflo (Traders)			2,0	2,5	2,75
Harina de soja (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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Wako)	0,06				
CaCO <sub>3</sub> (Hayashi)		0,5	0,5	0,5	0,6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Wako)		0,05			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Wako)	0,05	0,04			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Wako)		0,05	0,06	0,06	0,06
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Wako)	0,5	0,5			
NaHCO <sub>3</sub> (Wako)		0,2			
Zeolita	0,1				
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Wako)	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0002				
COCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Baker)	0,001			0,0005	0,0005
Ácido nicotínico	0,0002				
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0002				
Isobutanol <sup>1</sup> (Tedoa)	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
La esterilización era a 121 °C durante 20 minutos. <sup>1</sup> Añadido el último.					

Tabla 2 Medios relacionados

Cultivo inclinado y en placa. Agar CM4-1

(%, p/v)

Extracto de levadura (Difco)	0,3
Extracto de malta (Difco)	0,3
Soytone (Difco)	0,5

10

## ES 2 710 875 T3

	Glicerol (Difco)	1,0
	Bacto Agar (Difco)	2,0
	Ajustado a pH 6,5 antes de esterilización; Esterilización: 121°C, 20 minutos	
	Medio de siembra. VM4-1'	
5	(% , p/v)	
	Almidón soluble (BDH)	2,0
	Glucosa (Shuling)	1,0
	Harina de soja (ADM)	1,0
	Licor de maíz fermentado (Solulys)	0,5
10	Soytone (Difco)	0,5
	NaCl (Wako)	0,3
	CaCO <sub>3</sub> (Hayashi)	0,5
	pH 6,8; Esterilización:	121°C, 20 minutos

15 Los métodos preferidos para la producción fermentativa de ansamitocinas a partir de la cepa PF4-4 se describen más en los ejemplos 1 y 2 más adelante.

### Fermentación:

20 El cultivo se puede llevar a cabo mediante condiciones de cultivo tales como condiciones de cultivo estacionario, agitado, sumergido aeróbico o cualesquiera otras. Para un buen crecimiento del cultivo y alta producción de ansamitocinas en fermentadores de tanques grandes, se prefiere el cultivo sumergido aeróbico. La producción de ansamitocinas se puede potenciar además mediante alimentación de nutrientes durante la fermentación. Por ejemplo, cuando se cultiva el organismo en medio FM4-6, la alimentación adicional de glucosa durante la duración de la fermentación o de glucosa durante aproximadamente las primeras 24 a 72 horas, preferiblemente durante aproximadamente las primeras 48 h, seguido de alimentación con glucosa y un nutriente proteico tal como harina de semilla de algodón (por ejemplo, Proflo o Pharmamedia de Trader's Protein, Memphis, TN) o harina de soja, y un alcohol o un aldehído para facilitar la formación de la cadena lateral de éster en C-3, tal como isobutanol, isobutiraldehído, n-butanol, n-butiraldehído, n-propanol, n-propionaldehído, isopropanol, isopropionaldehído, pentanol, valeraldehído, isopentanol, isovaleraldehído, hasta el final de la fermentación, puede dar como resultado la duplicación de la producción de ansamitocinas. Aunque las condiciones de cultivo dependen de los medios usados y la escala de producción, normalmente se prefiere llevar a cabo la fermentación en el intervalo de pH de 5 a 9, preferiblemente con un pH inicial de 6,5 a 8,0. Más preferiblemente, el intervalo de pH es de 7 a 8, incluso más preferiblemente de 7 a 7,4. El pH más preferido es 7,2. La temperatura puede estar en el intervalo de 15° a 35°C, con un intervalo preferido de 25° a 30°C. Más preferiblemente, la temperatura es 28°C. La fermentación se continua hasta que se ha logrado la acumulación máxima de ansamitocinas. El tiempo de cultivo puede variar y depende de varios factores que incluyen el método de cultivo, la composición del medio y la temperatura. Típicamente, el tiempo de la fermentación está en el intervalo de 96 a 336 h.

### Análisis de ansamitocinas:

40 En las patentes de EE.UU. n° 4.331.598 y 4.450.234, se describe la cepa original ATCC 31565 como productora de dos clases de ansamitocinas que se distinguen por la presencia de un grupo metilo o hidroximetilo en C-14 (véase la fig. 1). Para ambas clases, se producen varias ansamitocinas diferentes que difieren en su respectiva cadena lateral de acilo unida al átomo de oxígeno de C-3, y con respecto a si C-14 lleva un grupo metilo o hidroximetilo (o, en posteriores estudios, N-desmetilo). La nomenclatura usada en la presente memoria para los compuestos permutados se ha definido antes con respecto a la fig. 1.

45 La ansamitocina P-3 es el producto principal de PF4-4 y la cepa original ATCC 31565, en determinadas condiciones de crecimiento. Si las bacterias se cultivan en presencia de valina o ácido isobutírico (véase la patente de EE. UU. n° 4.228.239), o alcohol isobutílico o isobutiraldehído (véase la patente de EE.UU. n° 4.356.265), otros compuestos ansamitocinas están presentes solo en cantidades minoritarias.

Cuando la cepa PF4-4 se cultiva en diferentes medios de fermentación (denominados FM en la tabla 1), los cuales contienen todos alcohol isobutílico, la ansamitocina P-3 es la ansamitocina predominante producida. En un método para determinar la cantidad de ansamitocinas, muestras de los caldos de fermentación se diluyen con etanol

o acetonitrilo, después se agitan fuertemente y finalmente se centrifugan. Después se determina en el líquido sobrenadante el contenido de ansamitocina P-3.

Las ansamitocinas preferiblemente se fraccionan y analizan por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC), pero se puede usar cualquier técnica adecuada, tal como, por ejemplo, se puede usar MALDI-TOF o cromatografía en capa fina.

Extracción de ansamitocinas:

Las ansamitocinas se pueden extraer del caldo de fermentación por métodos usados en general para la recuperación de metabolitos secundarios. Puesto que las ansamitocinas son fácilmente solubles en disolventes no aromáticos, se pueden extraer fácilmente por agitación con disolventes inmiscibles con el agua no aromáticos tales como acetatos de alquilo, en donde la cadena de alquilo es lineal o ramificada y tiene 1-5 átomos de carbono, dialquilcetona y disolventes halogenados. Los 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 metilisobutilcetona. Un ejemplo de un disolvente halogenado adecuado es diclorometano. Se prefiere la extracción con acetato de n-butilo. Preferiblemente, la relación del caldo de fermentación al disolvente inmiscible con el agua no aromático es 1:1 en volumen.

Las ansamitocinas de acuerdo con la invención son adsorbidas del caldo de fermentación sobre diferentes resinas, tales como Amberlite XAD-4, XAD-16 disponibles en el mercado en Rohm and Haas Company, Diaion HP20, HP21, Sepabeads SP825, SP850, SP70, SP700 disponibles en el mercado en Mitsubishi Chemical Industries Ltd. Estos ejemplos no limitan el alcance, también se pueden usar otras resinas conocidas por el experto en la técnica para el propósito anterior. La resina también se puede usar como un recubrimiento sobre una estructura secundaria tal como un imán o un material de alta densidad de modo que el polímero se puede recuperar del caldo por métodos magnéticos o por métodos que se basan en la densidad adsorbente tales como cromatografía de lecho expandido. Una vez que las ansamitocinas son adsorbidas sobre la resina, se eluyen usando uno o más disolventes orgánicos mediante elución isocrática o con gradiente. En una realización la resina se puede añadir directamente al caldo para extraer las ansamitocinas.

Las ansamitocinas se pueden recuperar de la resina por varios medios. En una realización, la resina se puede recuperar por filtración. En una segunda realización, la resina se puede recuperar por centrifugación y el sedimento después se puede eluir con uno o más disolventes orgánicos o con uno o más disolventes orgánicos combinados con agua. En una tercera realización, la fase acuosa y los residuos sólidos se pueden retirar de la resina por cromatografía de lecho expandido. Después la resina se puede comprimir en la columna de lecho expandido y eluir con uno o más disolventes orgánicos o con uno o más disolventes orgánicos combinados con agua por elución isocrática o con gradiente. En una cuarta realización, la resina puede extraer las ansamitocinas mientras se está separando del caldo de fermentación mediante una membrana parcialmente permeable. Por ejemplo, se puede agitar una membrana de diálisis empaquetada con resina con caldo de fermentación, el agua y los componentes de bajo peso molecular pueden pasar a través de la membrana, permitiendo que las ansamitocinas se unan a la resina. Después se puede retirar la bolsa de diálisis del caldo y la resina recuperada después se puede eluir como se ha descrito antes.

Antes de la extracción, los microbios en el caldo de fermentación se pueden inactivar, si se desea, por exposición a calentamiento suave de aproximadamente 50° a 55°C durante de aproximadamente 30 minutos a 2 horas, o por adición de cloroformo al 1% (v/v) (Toru Hasegawa et al. 1983, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:314-320).

También, antes o durante la extracción, el procedimiento puede incluir tratamiento del medio de cultivo para facilitar la extracción de ansamitocinas con disolvente. El tratamiento puede incluir, pero no se limita a calentamiento, ajuste de pH, o tratamiento enzimático o químico, tal como la adición de polisulfato férrico, agentes desmenuzantes, sílice de combustión o codisolventes tales como acetona o alcoholes tales como metanol.

En el caso de extracción de la fase orgánica, la extracción se lleva a cabo a un pH entre 2,0-13,0, pero preferiblemente a un pH de aproximadamente 6,0 a 7,0, y más preferiblemente a un pH de aproximadamente 6,5 a 7,0, y preferiblemente con acetato de n-butilo. Con el fin de mejorar la eficacia de la extracción, el caldo se puede mantener a una temperatura entre 5°C y 80°C, preferiblemente entre 30°C y 45°C durante el procedimiento de extracción.

El tiempo de extracción depende de varios factores que incluyen la composición del caldo, la temperatura del caldo y el disolvente de extracción, el método de mezclado del caldo y el disolvente, y el disolvente usado para la extracción. El tiempo de extracción está en el intervalo de 1 hora a 120 horas, dependiendo del método de extracción. Por ejemplo, cuando se elige un procedimiento de extracción y filtración rápido, el tiempo de extracción puede estar en el intervalo entre 1-12 horas.

Se pueden usar coadyuvantes de filtración durante la filtración. Dichos coadyuvantes incluyen, pero no se limitan a Celpure P1000, Celatom FW- 80, Hyflo Super Cel y Celite. Opcionalmente, los coadyuvantes de filtración se pueden añadir directamente al caldo durante la filtración. Opcionalmente, los filtros también pueden estar pre-

recubiertos con un coadyuvante de filtración. Los métodos de filtración que se pueden usar en este procedimiento incluyen, pero no se limitan a filtración de flujo tangencial, filtración por tambor con rascadores recubierto de coadyuvante de filtración y filtración discontinua.

5 En los casos donde la extracción se lleva a cabo a pH extremos tales como pH 1 - pH 5 o pH 8 - pH 13, o a temperaturas muy elevadas tales como 60°C - 90°C, la extracción debería completarse a una velocidad que evite la descomposición excesiva de las ansamitocinas. Si es necesario, la extracción también se puede llevar a cabo de forma extremadamente rápida por centrifugación continua. En dicho caso, el pH o temperatura del caldo de fermentación se ajustaría según entrara el caldo en la centrífuga de modo que se evite la exposición prolongada a condiciones duras. Los ejemplos de equipamiento de centrifugación que se han usado en el procesamiento de la fermentación y se podrían usar para extraer ansamitocinas, incluyen, pero no se limitan a decantadores centrífugos y centrífugas de discos apilados. Después, el extracto de disolvente orgánico retenido se puede concentrar a presión reducida para dar un residuo que contiene las ansamitocinas. Alternativamente, se puede mezclar un disolvente miscible con agua con el caldo de fermentación y centrifugar para separar sólidos dando una solución sin sólidos, de una sola fase. La solución después se puede procesar, por ejemplo, por adición de un disolvente inmiscible con el agua para producir la separación de las fases orgánicas y acuosas seguido de concentración de la fase orgánica.

Lavado acuoso de las ansamitocinas en solución

Las ansamitocinas en una solución de disolvente orgánico inmiscible con el agua se pueden lavar con agua, ácido acuoso, base acuosa, agua parcial o totalmente saturada con sal o una combinación de cualquiera de los lavados acuosos descritos. Los 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. El ácido acuoso también incluye un sistema tamponado acuoso ácido. Los ejemplos de sistemas tamponados ácidos incluyen, pero no se limitan a fosfato sódico, fosfato potásico, acetato amónico y formiato amónico, ajustándose el pH de cada uno para usar en sus respectivos intervalos de tamponamiento ácido. Los ejemplos de bases acuosas incluyen, pero no se limitan a soluciones acuosas de bicarbonato sódico, bicarbonato potásico, carbonato sódico, hidróxido sódico, hidróxido amónico y fosfato sódico a un pH entre 7,1-13. La base acuosa también incluye un sistema tamponado acuoso básico. Los ejemplos de sistemas tamponados básicos incluyen, pero no se limitan a fosfato sódico, fosfato potásico, borato sódico y carbonato amónico, ajustándose el pH de cada uno para usar en sus respectivos intervalos de tamponamiento básico.

Los lavados ácidos o básicos deben completarse sin descomposición apreciable de las ansamitocinas, que variaría con el pH. Si es necesario, se pueden llevar a cabo extracciones extremadamente rápidas por técnicas centrífugas. Los ejemplos de agua parcial o totalmente saturada con sal incluyen, pero no se limitan a cloruro sódico acuoso en diferentes niveles de saturación, sulfato sódico acuoso en diferentes niveles de saturación, y cloruro potásico acuoso en diferentes niveles de saturación. También se pueden llevar a cabo lavados acuosos en los que se combina una mezcla de una solución salina acuosa total o parcialmente saturada con una base acuosa o un ácido acuoso.

Filtración antes de extracción:

Alternativamente, antes de la extracción, los sólidos en el caldo de fermentación que contiene las ansamitocinas se pueden separar por filtración o centrifugación. Las ansamitocinas en la masa de células sólidas se pueden recuperar por lavado con un disolvente tal como etanol, etanol acuoso u otros disolventes orgánicos, tales como acetato de etilo, acetato de butilo, diclorometano o acetona, y es bien conocido para el experto en la técnica. Las ansamitocinas en el filtrado se pueden recuperar por extracción con un disolvente orgánico aromático conocido como se describe en otra parte en esta solicitud.

Purificación de las ansamitocinas:

El producto bruto se puede someter a procedimientos de purificación tales como cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina, seguido de recristalización si es necesario. Preferiblemente, la cromatografía se lleva a cabo en una columna preempaquetada, tal como un cartucho de gel de sílice Biotage usando el sistema de cromatografía Biotage. Las ansamitocinas deseadas se pueden eluir de la columna usando un gradiente de disolvente empezando con una mezcla de acetato de etilo y hexano y añadiendo cantidades crecientes de metanol. Las fracciones que contienen las ansamitocinas deseadas se pueden juntar y concentrar. Si se desea, las ansamitocinas se pueden purificar más por cristalización usando un disolvente tal como acetato de etilo para disolver el producto, y después adición de un disolvente no polar tal como heptano o hexano para cristalizar el producto puro. El término cristalización como se usa en la presente memoria abarca el término precipitación, en cuanto que el sólido formado a partir de la solución puede tener una estructura amorfa o definida.

Complejos de agente de unión a célula/maitansinoide:

55 El procedimiento de la invención se puede usar para hacer complejos de agente de unión a célula/maitansinoide que son útiles como profármacos activados por tumor. Las ansamitocinas preparadas por el procedimiento de la invención pueden sufrir escisión reductora a maitansinol, el cual se puede usar como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.208.020. 5.416.064. 6.333.410 y 6.441.163 para producir derivados de

maitansinoide que contienen N-metil-L-alanina. Estos derivados después se conjugan con agentes de unión a células, preferiblemente anticuerpos, mediante diferentes conectores tales como conectores que contienen disulfuro.

### Ejemplos

La invención se ilustrará ahora por referencia a ejemplos no limitantes.

#### 5 Ejemplo 1 de referencia. Producción de ansamitocinas:

Siembra primaria: Se vertió medio de cultivo de siembra VM4-1' (400 ml/matraz) que comprendía almidón soluble al 2%, glucosa al 1%, harina de soja al 1%, licor de maíz fermentado al 0,5%, (Roquette) Soytone al 0,5%, cloruro sódico al 0,3% y carbonato de calcio al 0,5%, en cada uno de once matraces Erlenmeyer de 2 litros de capacidad. Después de esterilización, cada uno de los matraces se inoculó con el cultivo de PF4-4 (ATCC PTA-3921). Los matraces se incubaron a 28°C en un agitador orbital a 230 rpm durante 48 h.

Siembra secundaria: El contenido de los matraces de siembra primaria se juntaron. Un fermentador de 300 litros se cargó con 100 litros del medio de siembra VM4-1'. Después de esterilización, el fermentador se inoculó con 4 litros del cultivo de siembra primaria reunido. El fermentador se mantuvo a 28°C, con agitación a 80 rpm. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima de 30% de saturación por aireación y mayor agitación si era necesaria. Después de incubación durante 24 h, el cultivo de siembra secundaria estaba listo para ser transferido a los recipientes de producción.

Producción: Se cargaron dos fermentadores de producción de 300 litros cada uno con 250 litros de medio de producción FM4-6 (véase la tabla 1). Después de esterilización, se inoculó en cada uno de los fermentadores 15 litros del cultivo de siembra secundaria. Los fermentadores se mantuvieron a 28°C con agitación a  $107 \pm 5$  rpm y aireación a 0,4 vvm. Después del día 2, el contenido de oxígeno disuelto se mantuvo por encima de 30% aumentando la velocidad de agitación a un máximo de  $170 \pm 5$  rpm, y la tasa de aireación a un máximo de 1 vvm. Se midió el valor de ansamitocinas diariamente por extracción de una muestra del caldo de fermentación y dilución en etanol, seguido de cuantificación por análisis por HPLC. La fermentación se continuó hasta el día 10, momento en el que la acumulación de ansamitocinas se estabilizó. El valor de ansamitocinas el día 10 en los dos fermentadores era 251 mg/l y 244 mg/l respectivamente. El pH del caldo de fermentación se ajustó a 6,5 por adición de ácido fosfórico. Los fermentadores se calentaron hasta 55°C y se mantuvieron a esta temperatura durante 1 h para inactivar el microorganismo. Después los fermentadores se enfriaron a temperatura ambiente por extracción con un disolvente orgánico.

Ejemplo de referencia 2: Producción de ansamitocinas usando un procedimiento de alimentación discontinua.

Un fermentador de producción de 1500 litros se cargó con 900 litros de medio de producción FM4-6 (véase la tabla 1). Después de esterilización, se inocularon en el fermentador 54 litros de cultivo de siembra secundaria, preparado como se ha descrito antes. El fermentador se mantuvo a 28°C con agitación a  $107 \pm 5$  rpm y aireación a 0,4 vvm. De 0 a 48 h, se alimentó una solución acuosa de glucosa al 28,5% a una velocidad de 0,39 ml/l/h. De 48 a 288 h la alimentación se cambió a una solución madre que comprendía glucosa al 21,5%, Proflo al 7,1% e isobutanol al 7,1%, que se alimentó a una velocidad de 0,51 ml/l/h. Después de 2 días, el contenido de oxígeno disuelto se mantuvo por encima de 20% aumentando la velocidad de agitación a un máximo de  $170 \pm 5$  rpm, y la tasa de aireación a un máximo de 1 vvm. Se midió el valor de ansamitocinas diariamente por extracción de una muestra del caldo de fermentación y dilución en etanol, seguido de análisis cuantitativo por HPLC. La fermentación se continuó hasta el día 13, momento en el que la acumulación de ansamitocinas se había estabilizado. El valor de ansamitocinas el día 13 en el fermentador era 304 mg/l. El pH del caldo de fermentación se ajustó a 6,5 por adición de ácido fosfórico.

Inactivación térmica. El fermentador se calentó a 55°C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 h para inactivar el microorganismo. Después los fermentadores se enfriaron a entre 30 y 40°C para la extracción con un disolvente orgánico.

#### 45 Ejemplo 3 (comparativo): Extracción y purificación cromatográfica de ansamitocinas.

El caldo de fermentación del ejemplo 2 se mezcló con un volumen igual de acetato de n-butilo. La mezcla se mantuvo entre 30 y 40°C a 45°C, y se agitó suavemente de modo que la mezcla de las dos fases se producía justo en la interfase del disolvente. La extracción se continuó durante hasta 5 días, o hasta que el análisis por HPLC de la capa orgánica indicaba que se había extraído >80% de las ansamitocinas. Después se separó la capa orgánica, y se evaporó usando un evaporador de película descendente hasta un volumen final de entre 20 y 50 litros. El extracto concentrado se transfirió a un matraz que contenía 2,2 kg de gel de sílice. Las ansamitocinas brutas se aplicaron como recubrimiento sobre el gel de sílice por evaporación del disolvente hasta sequedad usando un rotavapor, funcionando a presión reducida. Después la sílice recubierta se transfirió a un módulo de inyección de muestra (SIM), obtenido de Blotage, Inc., Charlottesville, VA. El SIM se lavó con una mezcla de ciclohexano y hexano (2:1 v/v), y después se conectó a un sistema Biotage 150M equipado con un cartucho de sílice. El producto deseado se eluyó de la columna usando una mezcla de acetato de etilo:hexano:metanol (29,4:68,6:2,0, v/v/v). Las fracciones



que contenían ansamitocinas se juntaron y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto se secó más con alto vacío durante 24 h.

Ejemplo de referencia 4: Recristalización de ansamitocinas

5 El producto seco de la etapa anterior se disolvió en acetato de etilo caliente (23 ml/g de residuo). La mezcla se mantuvo entre 60-75°C hasta que se logró la disolución completa de las ansamitocinas. Se añadió lentamente heptano (80 ml/g de residuo), mientras se mantenía la temperatura del lote entre 60-75°C. Después de haber añadido todo el heptano, el lote se dejó enfriar a temperatura ambiente. Los cristales se recuperaron por filtración y después se secaron con alto vacío para dar 221 gramos de ansamitocinas puras.

Ejemplo 5 (comparativo): Extracción del caldo de fermentación con filtración.

10 El caldo de fermentación (200 ml) preparado como se describe en el ejemplo 2, se mezcló enérgicamente durante 5 minutos con 200 ml de acetato de n-butilo (200 ml), dando como resultado una emulsión. Se añadió el coadyuvante de filtración Cellatom FW-80 (20 g) y la mezcla se filtró con vacío a través de un embudo buchner que se había recubierto previamente con coadyuvante de filtración Cellatom FW-80. La torta de filtración se lavó con 40 ml de acetato de n-butilo. El filtrado, ahora sin contaminantes sólidos, que comprendía una capa orgánica y acuosa  
15 transparente se transfirió a un embudo de separación. Se drenó la fase acuosa. Se retuvo la fase orgánica que contenía las ansamitocinas.

Ejemplo 6 (comparativo): Extracción del caldo de fermentación con centrifugación usando un disolvente inmiscible con el agua.

20 Una parte de caldo de fermentación, preparado como se describe en el ejemplo 2, se mezcló enérgicamente con una parte de acetato de n-butilo durante 2 min. La emulsión resultante se centrifugó durante 1 minuto y se extrajo la capa orgánica que contenía las ansamitocinas, exenta de los contaminantes sólidos.

Ejemplo 7 (comparativo): Extracción del caldo de fermentación con centrifugación usando un disolvente miscible con el agua.

25 Una parte de caldo de fermentación, preparado como se describe en el ejemplo 2, se mezcló enérgicamente con una parte de acetona. La mezcla se centrifugó durante 1 minuto para sedimentar los sólidos. El líquido sobrenadante se extrajo y se mezcló con media parte de hexanos. Se separó la capa acuosa dejando una fase orgánica transparente que contenía las ansamitocinas.

Ejemplo 8. Extracción en fase sólida de ansamitocinas usando perlas hidrófobas XAD-16.

30 Un litro de caldo de fermentación, preparado como se describe en el ejemplo 2, se agitó con 10 gramos de perlas XAD-16 durante seis horas. Después la mezcla se centrifugó y se separó el líquido sobrenadante. El sedimento se transfirió a una columna pequeña y se eluyó con agua desionizada, seguido de agua desionizada:acetonitrilo 90:10. Se combinaron las fracciones que contenían ansamitocinas y el disolvente se evaporó para dar 112 mg de extracto concentrado. El análisis por HPLC indicaba que el extracto contenía 50 g de ansamitocinas.

35 Aunque la invención se ha descrito con detalle y con referencia a sus realizaciones específicas, será evidente para un experto en la técnica que se pueden hacer en la misma diferentes cambios y modificaciones.

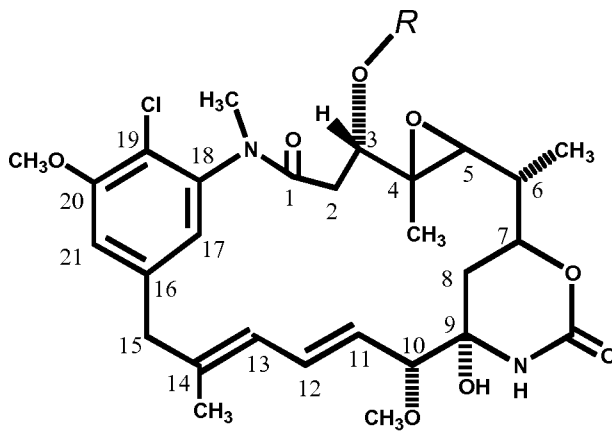
REIVINDICACIONES

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

- 1) cultivo de un microorganismo productor de ansamitocinas en un medio de cultivo líquido;
- 2) extracción en fase sólida de ansamitocinas del medio de cultivo sobre una resina;
- 3) elución isocrática o con gradiente de ansamitocinas de la resina usando un disolvente orgánico o un disolvente orgánico combinado con agua;
- 4) concentración de las ansamitocinas extraídas; y
- 5) opcionalmente purificación de las ansamitocinas por una 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 de cristalización, y
- d) cristalización seguida de cromatografía de adsorción sobre gel de sílice o alúmina;

y en donde dichas ansamitocinas comprenden una mezcla de compuestos de la siguiente estructura:



15 en donde R es COCH<sub>3</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, COCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la extracción se lleva a cabo a un pH de 6 a 7; y/o a una temperatura de 30°C a 45°C.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el microorganismo productor de ansamitocinas es del género *Actinosynnema* o *Actinosynnema pretiosum*.

20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en donde el microorganismo productor de ansamitocinas es *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 o una cepa derivada del mismo o *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) o una cepa derivada del mismo.

25 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho cultivo es a un pH en el intervalo de 6,5 a 8 o de 7 a 7,4 o es 7,2; y/o en donde la temperatura está en el intervalo de 15°C a 35°C o de 25°C a 30°C o es 28°C.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en donde la temperatura es 28°C y el pH es 7,2.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde se proporciona al menos un nutriente durante dicho cultivo.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en donde el al menos un nutriente es una fuente de carbono.

30 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en donde la fuente de carbono es glucosa.

10. El procedimiento de la reivindicación 8 o reivindicación 9, en donde el al menos un nutriente es una fuente de carbono seguido de una fuente de carbono y un nutriente proteico.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde el nutriente proteico es harina de semilla de algodón o harina de soja.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en donde además se proporciona durante el cultivo un alcohol o un aldehído que facilita la formación de una cadena lateral de éster en C-3 de la ansamitocina.
- 5 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en donde el aldehído o alcohol se selecciona del grupo que consiste en isobutanol, isobutiraldehído, n-butanol, n-butiraldehído, n-propanol, n-propionaldehído, isopropanol, isopropionaldehído, pentanol, valeraldehído, isopentanol y isovaleraldehído.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que además comprende uno o más de:
- (i) inactivación de los microorganismos en el medio de cultivo por inactivación química o térmica; y
- 10 (ii) lavado, en el que una solución bruta de ansamitocinas en el disolvente orgánico se lava con agua, una solución salina acuosa, un ácido acuoso o una base acuosa en cualquier combinación secuencial, antes o después de la precipitación cuando se lleva a cabo durante la purificación.

**Fig. 1. Estructuras de ansamitocinas**

