

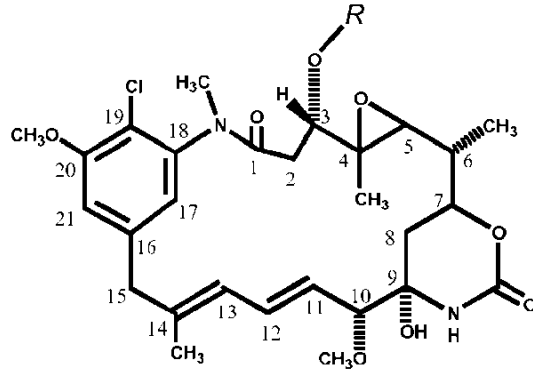
ÖZET
SAFLAŞTIRILMIŞ ANSAMİTOSİNLERİN HAZIRLANMASINA YÖNELİK
PROSES

- 5 Oldukça verimli ansamitosin üreten suşların büyük ölçekli fermantasyon prosesidir. Ham ansamitosinlerin izole edilmesine yönelik yöntemdir. Ansamitosinlerin saflaştırılmasına yönelik yöntemdir.

İSTEMLER

1. Saflaştırılmış ansamitosinlerin hazırlanmasına yönelik bir proses olup, özelliği aşağıdaki adımları içermesidir:

- 5 i. bir sıvı kültür ortamında ansamitosin üreten bir mikroorganizmanın kültürlenmesi;
 - ii. ansamitosinlerin kültür ortamında bir reçineye katı fazlı olarak ekstrakte edilmesi;
 - 10 iii. organik bir solvent veya su ile kombine bir organik solvent kullanılarak reçineden ansamitosinlerin izokratik veya gradyan elüsyonu;
 - iv. ekstrakte edilen ansamitosinlerin konsantre hale getirilmesi ve
 - vi. ansamitosinlerin aşağıdaki a), b), c) ve d)'den herhangi biri aracılığıyla isteğe bağlı olarak saflaştırılması:
 - 15 a. silika jel veya alümina üzerinde adsorpsiyon kromatografisi,
 - b. kristalleşme,
 - c. ardından kristalleşmenin geldiği silika jeli veya alümina üzerinde adsorpsiyon kromatografisi ve
 - 20 d. silika jeli veya alumina üzerinde adsorpsiyon kromatografisi tarafından izlenen kristalleşme;
- ve burada söz konusu ansamitosinler, aşağıdaki yapıya ait bileşiklerin bir karışımını içerir:



- 25 burada R, COCH_3 , COCH_2CH_3 , $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ veya $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 'dir.

2. İstem 1'e göre proses olup, özelliği ekstrakte etme işleminin, 6 ila 7 pH değerinde ve/veya 30 °C ila 45 °C'deki bir sıcaklıkta gerçekleştirilmesidir.
- 5 3. İstem 1 veya istem 2'ye göre proses olup, özelliği ansamitosin üreten mikroorganizmaların *Actinosynnema* spp veya *Actinosynnema pretiosum* olmasıdır.
- 10 4. İstem 3'e göre proses olup, özelliği ansamitosin üreten mikroorganizmaların *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31565 veya bundan türetilen bir suş veya *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) veya bundan türetilen bir suş olmasıdır.
- 15 5. İstemler 1-3'ten birine göre proses olup, özelliği söz konusu kültürleme işleminin, 6.5 ila 8 veya 7 ila 7.4 veya 7.2 aralığında bir pH değerinde olmasıdır ve/veya burada sıcaklık 15 °C ila 35 °C veya 25 °C ila 30°C veya 28 °C aralığındadır.
- 20 6. İstem 5'e göre proses olup, özelliği sıcaklığın 28°C ve pH değerinin 7.2 olmasıdır.
7. İstemler 1-6'dan herhangi birine göre proses olup, özelliği en az bir besin maddesinin söz konusu kültürleme esnasında sağlanmasıdır.
- 25 8. İstem 7'ye göre proses olup, özelliği en az bir besin maddesinin bir karbon kaynağı olmasıdır.
9. İstem 8'e göre proses olup, özelliği karbon kaynağının glikoz olmasıdır.
- 30 10.İstem 8 veya 9'a göre proses olup, özelliği en az bir besin maddesinin, bir protein besin maddesinin izlediği bir karbon kaynağı olmasıdır.
- 11.İstem 10'a göre proses olup, özelliği protein besin maddesinin pamuk tohum unu veya soya unu olmasıdır.

12. İstemler 7-11'den herhangi birine göre proses olup, özelliği bunun ayrıca, ansamitosinin bir C-3 ester yan zincirinin oluşumunu kolaylaştıran bir alkol veya bir aldehitin kültürlenmesi sırasında sağlanmasıdır.
- 5 13. İstem 12'ye göre proses olup, özelliği aldehit veya alkolün, izobütanol, izobütraldehit, n-bütanol, n-bütiraldehit, n-propanol, n-propionaldehit, izopropanol, izopropionaldehit, pentanol, valeraldehit, izopentanol ve izovaleraldehit içeren gruptan seçilmesidir.
- 10 14. İstemler 1-13'ten herhangi birine göre proses olup, özelliği ayrıca aşağıdaki adımlardan bir veya daha fazlasını içermesidir:
- i. kültür ortamındaki mikroorganizmaların kimyasal veya ısı ile etkisiz hale getirme işlemi ile etkisiz hale getirilmesi; ve
- ii. organik solventteki ansamitosinlerin bir ham solüsyonunun,
- 15 herhangi bir sıralı kombinasyonda olmak üzere su, bir aköz tuz solüsyonu, bir aköz asidi veya bir aköz baz ile yıkandığı, saflaştırma esnasında gerçekleştirildiğinde çökelmenin öncesinde veya sonrasında gerçekleştiği yıkama işlemi.

TARİFNAME

SAFLAŞTIRILMIŞ ANSAMİTOSİNLERİN HAZIRLANMASINA YÖNELİK PROSES

5 BULUŞUN SAHASI

Buluş, saflaştırılmış ansamitosinlerin hazırlanmasına yönelik bir proses ile ilgilidir. Ansamitosinler, C-3 ester yan zincirinde farklılık gösteren ansamitosinlerin bir karışımına refere eder. Ansamitosinler, C-3 alkol
10 maytasinole dönüştürülebilir.

BULUŞUN ALT YAPISI

Ansamitosinler *Actinosynnema pretiosum* gibi mikroorganizmaların
15 *fermantasyonunda türetilen yüksek derecede sitotoksik bileşiklerdir.* Ansamitosinler kimyasal olarak, terapötik kullanımı hücre bağlama ajanı maytansinoid formunda birleşen tiyol içeren maytansinoidlere dönüştürülür (U.S.Patent Nos. 5,208,020; 5,410,064; 6,333,410; ve 6,441,163).

Actinosynnema pretiosum gibi *Actinosynnema* spp suşlarına sahip fermentasyon
20 prosesi, C-3'te (Şekil 1) farklı ester sübstitüentlerini taşıyan birçok ansamitosin türünü üretir. Üretilen çeşitli C-3 esterleri P-3 (izobütiril), P-3 ' (n-bütiril), P-2 (propionil), P-4 (ISO-valeril), P-4 ' (n-valeril) içerir. Tüm bu esterler, tiyol içeren maytansinoidlerin sentezine yönelik prekürsör olan C-3 alkol maytansinolünü (P-0) vermek üzere indirgenerek bölünebilir. Buna ek olarak, N-demetil, 20-O-
25 demetil, ve 19-dekloro gibi diğer alanlarda değiştirilen istenmeyen ansamitosinler küçük miktarlarda üretilir. İndirgeyici deasilasyona göre bu ansamitosinler maytasinol üretmez.

Actinosynnema spp fermentasyonundaki ansamitosin üretimine yönelik
prosesler açıklanır (U.S.Patent No. 4.162.940; 4, 450.234; 4.228.239;
30 4.331.598; ve 4.356.265). Üretilen ansamitosin verimi, genellikle 12 mg/L 100 mg/L arasında değişen titreler ile değişir. Ansamitosinler tipik olarak, organik katman ile konsantre edilme ve petrol eteri ile çökelmenin takip ettiği bir filtre desteği ve bir organik sıvının eklenmesini içeren birçok adımlı proses ile geri

kazanılır ve saflaştırılır. Çökelme ayrıca, yeniden kristalleşme veya kromatografi yoluyla ileri derece saflaştırmanın izlediği üzere silika kromatografisi ve kristalleşme kullanılarak saflaştırılmıştır.

Dolayısıyla, proses kullanışsızdır ve son derecede toksik materyali ile çalışılmasının gerektiği birkaç adımı içerir. Bu, bu tür bir prosesin ölçeğinin büyütülmesini oldukça zorlaştırır. Buna ek olarak, insan operatörünün güvenliği, çeşitli işlem adımları boyunca sağlanmalıdır.

Yeni bir başvuru (US 2002/0015984 a1) ansamitosinlerin üretimine yönelik prodesteki belirli gelişmeleri öne sürer. Fermantasyon sıvısındaki ansamitosin titrelerin 65 ila 86 mg/L arasında değişkenlik gösterdiği gözlemlenir. Belirtilen iyileştirmeler, 75°C'de sıvının ısı ile etkisizleştirilmesini, toluen gibi bir aromatik hidrokarbon solventinin içerisine ekstrakte edilmesini, kristalleşmenin izlediği bir açık silika kolonu üzerinden yapılan kromatografiyi içerir.

US 4.307.016 ve US 4.361.650, bu sınıfa ait bileşiklerin zayıf asidik ve lipofil özelliğinden faydalanan katı faz ekstraksiyonu ile 20-Demetoksi-20-hidroksi-maytansinol izolasyonunu öğretir. Tercihen kullanılan adsorbent silika jelidir.

Ansamitosin üretiminin maliyetinin azaltılması amacıyla, daha önce açıklanana göre önemli ölçüde daha yüksek titreler (fermentörlerde 400 mg/L 'ye kadar) veren yeni Actinosinnema SPP suşları üretilir. Ansamitosinlerin üretimine yönelik olarak daha önceden açıklanan proseslerin birçok kusuru vardır ve dolayısıyla geliştirilen yeni yüksek üretimli suşlara yönelik olarak adapte edilemez. Örneğin, 75 °C'de ısı ile etkisizleştirme eylemi, ansamitosinin belirli bir oranda bozulması ve verimde %10 ila %20 oranında kayıp yaşanması ile sonuçlanır. Aromatik hidrokarbonlara sahip yüksek ansamitosin içeriğini içeren fermantasyon sıvısının ekstrakte edilmesi, ansamitosinlerin bu tür solventler içerisinde yüksek derecede solunabilir olmaması nedeniyle etkisiz ve eksiktir. Ansamitosinlerin, açık kendinden sızdırmaz silika kolonlarındaki saflaştırması iki kusura sahiptir:1) saflık ve geri kazanım bakımından lot arası değişkenlik ve 2) güvenlik endişelerine yol açan büyük ölçüde insan maruziyeti.

Dolayısıyla, yüksek verimli ansamitosinlerin üretilmesi ve yüksek oranda toksik ilaca karşı çalışan maruziyeti minimize edilirken aynı zamanda onun izolasyonu ve saflaştırılmasına yönelik olarak verimli bir süreç sağlanmasına ihtiyaç duyulur.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Saflaştırılmış ansamitosinlerin hazırlanmasına yönelik bir proses aşağıdaki adımları içerir:

- 1) sıvı kültür ortamında ansamitosin üreten bir mikroorganizmanın kültürlenmesi;
 - 2) ansamitosinlerin ekstrakte etme işlemlerinin kolaylaştırılması amacıyla kültür ortamının isteğe bağlı olarak işlem görmesi;
 - 3) Ansamitosinlerin kültür ortamında bir reçineye katı fazlı olarak ekstrakte edilmesi;
 - 4) organik bir solvent veya su ile kombine bir organik solvent kullanılarak reçineden ansamitosinlerin izokratik veya gradyan elüsyonu;
 - 5) Ekstrakte edilen ansamitosinlerin konsantre hale getirilmesi ve
 - 6) Ansamitosinlerin ayrıca b), c) ve d)'den herhangi biri aracılığıyla isteğe bağlı olarak saflaştırılması:
 - a) silika jel veya alümina üzerinde adsorpsiyon kromatografisi,
 - b) kristalleşme,
 - c) ardından kristalleşmenin geldiği silika jeli veya alümina üzerinde adsorpsiyon kromatografisi ve
 - d) silika jeli veya alumina üzerinde adsorpsiyon kromatografisi tarafından izlenen kristalleşme;
- ve burada söz konusu ansamitosinler, şekil 1'deki yapıya ait bileşiklerin bir karışımını içerir, burada R, COCH_3 , COCH_2CH_3 , $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ veya $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 'dir. Proses isteğe bağlı olarak aşağıdakileri içerebilir:
- (i) fermantasyon sıvısında mikroorganizmaların kimyasal veya ısı ile etkisizleştirilmesi;
 - (ii) Saflaştırma esnasında gerçekleştirildiğinde, herhangi bir ardışık kombinasyonda, organik solventte bulunan ansamitosinlerin bir katı solüsyonunun su, bir aköz tuz solüsyonu, bir aköz asit veya bir aköz baz ile yıkandığı bir yıkama adımı.

Yukarıda açıklanan yöntemlerde, ansamitosin üreten mikroorganizmanın *actinosinnema* spp., daha fazla tercih edildiği üzere *actinosinnema pretiosum* olması tercih edilir. Ansamitosin üreten mikroorganizma ayrıca, *Actinosinnema pretiosum* ATCC 31565 veya bunlardan türetilen suşlar veya *Actinosinnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) veya bunlardan türetilen suşlar olabilir. Bu, U.S'de açıklanır. Pat. No. 4,450,234, *Actinosinnema pretiosum* ATCC 31565, 20 Ağustos 1979 tarihinde, IFO 13963 erişim numarası altında (i) Osaka Fermantasyon Enstitüsü, 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japonya'da; (ii) 29 Ağustos 1979 tarihinde, FERM-P NO. 5185 erişim numarası altında Ulusal Biyobilim ve İnsan Teknolojisi Enstitüsü (eski Fermantasyon Araştırma Enstitüsü), Endüstriyel Bilim ve Teknoloji Ajansı, Uluslararası Ticaret ve Sanayi Bakanlığı, 1-3, higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, Japonya'da ve (iii) 11 Eylül 1979 tarihinde, ATCC 31565 erişim numarası altında Amerikan tipi Kültür Koleksiyonu, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, ABD'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca, *Actinosinnema pretiosum* PF4-4 Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, ABD ile 11 Aralık 2001 tarihinde Budapeşte Antlaşması hükümleri altında muhafaza edilmiştir ve ATCC PTA-3921 numarası verilmiştir.

20

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1 fermantasyon aracılığıyla gerçekleştirilebilen çeşitli ansamitosin C-3 esterlerine ait yapıyı gösterir.

25

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Yöntemler, büyük fermentörlerde bir sıvı kültür ortamında ansamitosinlere yönelik olarak son derecede üretken bir mikroorganizmanın kültürlenmesine yönelik olarak açıklanır. Gerekli olması halinde mikroorganizma, ekstraksiyon adımından önce ısıtma işlemi veya kloroform ile işlem yapılması yoluyla etkisiz hale getirilebilir.

30

- P-3, P-3', P-4, P-4', P-2 ve P-1 (Şekil 1) ansamitosinleri gibi çeşitli C-3 esterlerinin bir karışımına içerebilen saflaştırılmış ansamitosinler, istenen C-3 hidroksil bileşimini, maytasinolü (P-0) vermek üzere bir indirgeme ajanı ile işlenebilir. Saflaştırılmış ansamitosinler tipik olarak, C-3 konumu dışında
- 5 molekül alanı üzerinde modifikasyonlara sahip olan yalnızca küçük miktarlarda istenmeyen ansamitosinleri içerir. Tercihen, ansamitosin üreten suş *Actinosynnema spp.*'dir. Daha fazla tercih edildiği üzere mikroorganizma *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 (ATCC PTA-3921) ve bunların türevleri ve *Actinosynnema pretiosum*
- 10 ATCC 31566 ve bunların türevleri olabilir. Mikroorganizma, burada açıklanan spesifik ortam veya teknikte açıklanan diğer herhangi bir ortamın kullanılmasıyla teknikte uzman kişilerce bilinen fermantasyon kültür teknikleri ile yetiştirilebilir. (U.S Patent Numaraları. 4,162,940; 4, 450,234; 4228,239; 4,331,598; ve 4,350,265).
- 15 Mikroorganizma, sıvı kültür ortamında kültürlenebilir. Bakteriyel suşun PF4-4'ün büyümesi kontrollü koşullar altında gerçekleştirilir ve buna yönelik olarak çok çeşitli ortam ve koşullar kullanılabilir. Örneğin, PF4-4, yayınlanan U.S'de ATCC 31565 veya ATCC 31281'e yönelik olarak açıklananlar ile benzer koşullar ve benzer ortamlar altında yetiştirilebilir. Patent Numaraları. 4,137,230; 4,162,940;
- 20 4,331,598; 4,356,265; ve 4,450,234; ve Hatano et al., Agric.Biol. Chem.48, 1721-1729, 1984'te açıklanır. Dolayısıyla, suş PF4-4, ayrıca ansamitosinlerin fermente edici üretimini destekleyen geniş kapsamlı bir karbon kaynağını tolere edebilir. Örnek büyüme ortamları Tablo 1 ve 2' de gösterilir. Tablo 1, *Actinosynnema pretiosum* PF4-4 gibi ansamitosin üreten mikroorganizmaların
- 25 üretimini destekleyen ortamı gösterir ve Tablo 2, *Actinosynnema pretiosum* PF4-4, ve ansamitosin üreten diğer mikroorganizmaların yayılma ve/veya büyümesine yönelik olarak uygun olan diğer ortamları gösterir.

Tablo 1.Üretim Ortamı Bileşimi (girdiler % w/v).

	FM 44	27- FM 37	112- FM 4-4	FM 4-6	FM 4-7
Dextrin (Lodex-5)	6	6	5	5	5

	FM 44	27- FM 37	112- FM 4-4	FM 4-6	FM 4-7
Maltoz (Difco)	4	4	2	2	2
Proflo (Traders)			2.0	2.5	2.75
Soya unu (ADM)	1.5	2.0			
Pharmamedia (Traders)	0,5				
CSP (Roquette)	0,5	0,5	0,5	0.15	0.15
P.Kuru Maya (Difco)	0,25				
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Wako)	0,06				
CaCO ₃ (Hayashi)		0,5	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 (Wako)	0,5	0,5			
NaHCO ₃ (Wako)		0,2			
Zeolit	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
Nikotin Asidi	0,0002				
MnSO ₄ · H ₂ O	0,0002				
İzobütanol ¹ (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

Sterilizasyon 20 dakika boyunca 121 °C'de yapılmıştır. ¹ Son olarak

FM 27- FM 112- FM 4-4 FM 4-6 FM 4-7
44 37

eklenmiştir.

TABLO 2 İlgili Ortam

Eğim ve kap kültürü.CM4-1 Agar

(%, w/v)

Maya ekstraktı (Difco)	0,3
Malt ekstraktı (Difco)	0,3
Soytone (Difco)	0,5
Gliserol (Difco)	1.0
Bacto agar (Difco)	2.0
Sterilizasyon öncesinde pH değerini 6,5'e ayarlama;	121 °C, 20
Sterilizasyon:	dakika

Tohum Ortamı.VM4-1'

(%, w/v)

Çözünür nişasta (BDH)	2.0
Glikoz (Shuling)	1.0
Soya yemeği (ADM)	1.0
Mısır Maserasyon Sıvısı (Solulys)	0,5
Soytone (Difco)	0,5
NaCl (Wako)	0,3
CaCO ₃ (Hayashi)	0,5
pH 6.8; Sterilizasyon:	121 °C, 20
	dakika

Ansamitosinlerin PF4-4 suşundan fermente edici biçimde üretilmesine yönelik olarak tercih edilen yöntemler ayrıca, aşağıda bulunan ÖRNEKLER 1 ve 2'de açıklanır.

5 **Fermantasyon:**

[0017] Kültivasyon, sabit, sallama, aerobik batırılmış gibi kültür koşulları veya diğer tüm kültür koşulları ile yürütülebilir. İyi kültür büyümesi ve ansamitosinlerin büyük tank fermentörler içerisindeki yüksek üretimine yönelik olarak aerobik batık kültür tercih edilir. Ansamitosin üretimi, fermantasyon sırasında besinler ile beslenerek daha fazla oranda geliştirilebilir. Örneğin, organizma FM4-6 ortamında yetiştirildiğinde, fermantasyon süresince ilave glikoz beslemesi veya yaklaşık ilk 24 ila 72 saat boyunca, tercihen yaklaşık ilk 48 saat boyunca glikoz beslemesi, akabinde glikoz ve bir pamuk tohumu unu (örneğin Trader's Protein, Memphis, TN çıkışlı Proflo veya Pharmamedia) veya soya unu gibi bir protein besin maddesi ve fermantasyonun sonuna kadar izobütanol, izobütraldehit, n-bütanol, n-bütiraldehit, n-propanol, n-propionaldehit, izopropanol, izopropionaldehit, pentanol, valeraldehit, izopentanol, izovaleraldehit gibi C-3 ester yan zincirinin oluşumunu kolaylaştırmak üzere bir alkol veya bir aldehit ile beslenmesi, ansamitosin üretiminin iki katına çıkması ile sonuçlanabilir. Kültür koşulları, kullanılan ortam ve üretim ölçeğine bağlı olurken, fermantasyonun normal olarak 5 ila 9 arasında bir pH değerinde, tercihen 6.5 ila 8.0 başlangıç pH'ına sahip olarak yürütülmesi tercih edilir. Daha fazla tercih edildiği üzere pH aralığı 7 ila 8, daha fazla tercih edildiği üzere ise 7 ila 7.4'tür. En çok tercih edilen pH 7,2'dir. Sıcaklık 15 ° ila 35 °C arasında, tercih edilen 25 ° ile 30 °C arasında değişir. Daha fazla tercih edildiği üzere sıcaklık 28 °C ' dir. Fermantasyon maksimum ansamitosin birikimi elde edildiği sürece devam eder. Kültivasyon süresi, kültür yöntemi, ortam bileşimi ve sıcaklık dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır ve buna göre değişebilir. Tipik olarak, fermantasyon süresi 96 ila 336 saat arasında değişkenlik gösterir.

Ansamitosinlerin analizi:

U.S.Patent Numaraları. 4,331,598 ve 4,450,234'te, parental suş ATCC 31565, C-14'te (Şekil 1) bir metil veya hidrometil grubunun varlığı ile ayrıştırılabilen iki sınıf ansamitosinlerin üretimi açıklanır. Her iki sınıfa yönelik olarak, birçok farklı ansamitosin, ilgili asil yan zincirinin C-3 oksijen atomuna bağlanmasına ve C-14'ün bir metil veya hidroksimetil (veya sonraki çalışmalar, N- demetil) grubunu taşıyıp taşımadığı hususunda farklılık gösterecek şekilde üretilir. Burada değiştirilmiş bileşiklere yönelik olarak kullanılan terminoloji, Şekil 1'e verilen referans ile yukarıda tanımlanır.

10 Ansamitosin P-3, belirli büyüme koşulları altında olmak üzere PF4-4 ve parental suş ATCC 31565'in ana ürünüdür. Bakterinin, valin veya izobütirik asit (bakınız U.S.Patent No. 4.228.239), varlığında veya izobütil alkol veya İzobütiraldehit (bakınız U.S.Patent No. 4.356.265), varlığında büyümesi halinde, diğer ansamitosin bileşikleri, yalnızca küçük miktarlarda mevcuttur.

15 PF4-4 suşu, hepsi izobütil alkol içeren farklı fermantasyon ortamında (Tablo 1'de belirtilen FO) büyüdüğünde, ansamitosin P-3, üretilen baskın ansamitosindir. Ansamitosin miktarının analiz edilmesine yönelik bir yöntemde, fermantasyon sıvılarının numuneleri, etanol ve asetonitril ile seyreltilir, daha sonra kuvvetli bir şekilde sallanır ve nihai olarak santrifüjlenir. Süpernatant daha sonra ansamitosin P-3 içeriğine yönelik olarak analiz edilir.

20 Ansamitosinler tercihen ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile parçalanır ve analiz edilir, ancak örneğin MALDI-TOF veya ince tabaka kromatografisi gibi herhangi bir uygun teknik kullanılabilir.

Ansamitosinlerin ekstraksiyonu:

25

Ansamitosinler genellikle ikincil metabolitlerin geri kazanılmasına yönelik olarak kullanılan yöntemler aracılığıyla fermantasyon sıvısından ekstrakte edilebilir. Ansamitosinlerin aromatik olmayan solventler içerisinde kolayca çözünür olması nedeniyle, alkil asetatlar gibi aromatik olmayan, suyla karışmayan çözücüler ile 30 karıştırılarak kolay bir şekilde ekstrakte edilebilir, burada alkil zinciri, lineer veya dallıdır ve 1-5 karbon atomuna, dialkilketonlara ve halojenli solventlere sahiptir. Uygun alkil asetatlara ait örnekler, n-bütil asetat, etil asetat ve metil asetatı içerir. Uygun bir dialkilketona ait bir örnek metil izobütil ketondur. Uygun bir halojenli

solvente ait bir örnek diklorometandır. N-bütil asetat ile ekstraksiyon tercih edilir. Tercihen, fermantasyon sıvısının aromatik olmayan suyla karışmayan solvente olan oranı hacimce 1: 1'dir.

Buluşa göre ansamitosinler, Rohm and Haas Company'den tedarik edilebilen
 5 Amberlite XAD-4, XAD-16, Mitsubishi Chemical Industries Ltd.'den elde edilen Diaion HP20, HP21, Sepabeads SP825, SP850, SP70, SP700 gibi çeşitli reçineler üzerindeki fermantasyon sıvısından adsorbe edilir. Bu örnekler kapsamı kısıtlayıcı değildir, teknikte uzman kişilerce bilinen diğer reçineler aynı zamanda yukarıda belirtilen amaca yönelik olarak kullanılabilir. Reçine ayrıca
 10 mıknatıs veya yüksek yoğunluklu bir materyal gibi ikincil bir yapı üzerine kaplama olarak kullanılabilir, böylelikle polimer, manyetik olarak veya geniş yatak kromatografisi gibi adsorban yoğunluğuna dayanan yöntemler ile geri kazanılabilir. Ansamitosinler reçine üzerine adsorbe edildiğinde, izokratik veya gradyan elüsyon aracılığıyla bir veya daha fazla organik solventler kullanılarak
 15 birbirinden ayrılır. Bir düzenlemede reçine, ansamitosinlerin ekstrakte edilmesine yönelik olarak doğrudan sıvıya eklenebilir.

Ansamitosinler, birçok araç ile reçineden geri kazanılabilir. Bir düzenlemede, reçine filtrasyon ile geri kazanılabilir. Bir ikinci düzenlemede, reçine santrifüjleme ile geri kazanılabilir ve pelet daha sonra, bir veya daha fazla
 20 organik solvent veya su ile kombine edilen bir veya daha fazla organik solvent ile birbirinden ayrıştırılabilir. Bir üçüncü düzenlemede, aköz faz ve katı birikinti, reçine üzerinden geniş yatak kromatografisi kullanılarak giderilebilir. Reçine daha sonra geniş yatak kolonunda sıkıştırılabilir ve bir veya daha fazla organik solvent veya izokratik veya gradyan elüsyon yoluyla su ile kombine edilen bir
 25 veya daha fazla organik solvent ile birbirinden ayrıştırılabilir. Bir dördüncü düzenlemede, reçine, kısmi olarak geçirgen olan bir membran aracılığıyla fermantasyon sıvısından ayrıştırılırken ansamitosinleri ekstrakte edebilir. Örneğin reçine ile doldurulmuş bir diyaliz membranı, fermantasyon sıvısı ile karıştırılabilir, su ve düşük molekül ağırlığına sahip bileşenler membran
 30 üzerinden geçebilir, ansamitosinlerin reçineye tutunmasına olanak sağlar. Diyaliz çantası daha sonra sıvıdan giderilebilir ve geri kazanılan reçine bunun ardından yukarıda açıklandığı üzere ayrıştırılabilir.

Ekstraksiyon öncesinde, mikroplar, istenmesi halinde, yaklaşık 30 dakika ila 2 saat boyunca yaklaşık 50° ila 55 °C'de hafif ısıtmaya maruz bırakılarak veya %1 (v/v) kloroform (Toru Hasegawa et al. 1983, Int. J. Syst.Bacteriol.33:314-320) eklenerek etkisiz hale getirilebilir.

- 5 Ayrıca, ekstraksiyon sırasında veya bundan önce, proses, anamitosinlerin solvent ekstraksiyonunu kolaylaştırmak üzere kültür ortamının işlenmesini içerebilir. İşlem, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, ısıtma, pH ayarlaması veya poli ferrik sülfat eklenmesi gibi enzimatik işlem veya kimyasal işlem, de-emülsifiye ajanlar, aseton veya metanol gibi alkoller gibi isli silika
- 10 orkosolventlerini içerebilir.

- Organik faz ekstraksiyonu durumunda, ekstraksiyon, 2.0 ila 13.0 arasında bir pH'ta, ancak tercihen yaklaşık 6.0 ila 7.0 arasında bir pH'ta ve daha fazla tercih edildiği üzere yaklaşık 6.5 ila 7.0 arasında bir pH'ta ve tercihen n-bütil asetat ile gerçekleştirilir. Ekstraksiyonun verimliliğini artırmak amacıyla, sıvı, ekstraksiyon
- 15 sırasında tercihen 30° ile 45°C arasında 5°C ile 80°C arasında bir sıcaklıkta korunabilir.

- Ekstraksiyon süresi, sıvı bileşimi, sıvı ve ekstraksiyon solventinin sıcaklığı, sıvı ve solventin karıştırılma yöntemi ve ekstraksiyona yönelik olarak kullanılan solvent dahil olmak üzere çeşitli faktörlere dayanır. Ekstraksiyon süresi,
- 20 ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak 1 saat ile 120 saat arasında değişir. Örneğin, hızlı bir ekstraksiyon ve filtrasyon işlemi seçildiğinde, ekstraksiyon süresi 1-12 saat arasında değişebilir.

- Filtrasyon süresince filtre destekleri kullanılabilir. Bu tür destekler, bunlar ile sınırlı olmamak üzere Celpure P1000, Celatom FW-80, Hyflo Super Cel ve
- 25 Celite'i içerebilir. İsteğe bağlı olarak filtre destekleri, filtrasyon süresinde sıvıya doğrudan eklenebilir. İsteğe bağlı olarak, filtreler aynı zamanda filtre desteği ile önceden kaplanmış olabilir. Bu proste kullanılacak filtrasyon yöntemleri, bunlar ile sınırlı olmamak üzere teğet akış filtrasyonu, filtre desteği kaplamalı kazıma tambur filtrasyonu veya yığın filtrasyonunu içerir.

- 30 Ekstraksiyonun pH 1 - pH 5 veya pH 8 - pH 13 gibi aşırı uçlarda veya 60 ° C - 90 ° C gibi yüksek sıcaklıklarda yapıldığı durumlarda, ekstraksiyon anamitosinlerin aşırı ayrışmasını engelleyen bir oranda tamamlanmalıdır. Gerekli olması halinde, ekstraksiyon ayrıca, devamlı santrifüjleme ile son

derece hızlı bir şekilde yapılabilir. Bu tür bir durumda, fermantasyon sıvısının pH'ı veya sıcaklığı, sıvı santrifüje girerken sert koşullara uzun süre maruz kalınmasının engellenmesi amacıyla ayarlanacaktır. Fermantasyon işleminde kullanılmış olabilen ve ansamitosinlerin ekstrakte edilmesine yönelik olarak

5 kullanılan santrifüj ekipmanına ait örnekler bunlar ile sınırlı olmamak üzere santrifüj süzme kaplarını ve yığılmış disk santrifüjlerini içerir. Tutulan organik solvent ekstraktı daha sonra ansamitosinleri içeren bir tortuyu vermek amacıyla düşük basınç altında konsantre edilebilir. Alternatif olarak su ile karışabilen bir solvent, fermantasyon sıvısı ile karıştırılabilir ve tek fazlı, katı içermeyen bir

10 solventi veren katıları çıkarmak amacıyla santrifüjlenebilir. Solüsyon daha sonra, örneğin, akabinde organik fazın konsantrasyonunun geliştiği organik ve aköz fazın ayrıştırılmasına yol açmak üzere su ile karışabilen bir solventin eklenmesiyle işlenebilir.

15 **Ansamitosinlerin solüsyon içerisinde aköz olarak yıkanması.**

Su ile karışabilen organik bir solventin bir solüsyonu içindeki ansamitosinler, su, aköz asit, aköz baz, kısmen veya tamamen tuza doymuş suyla veya açıklanan aköz yıkamaların herhangi birinin bir kombinasyonu ile yıkanabilir. Aköz asitlerin

20 örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, 1 ila 6.9 arasında bir pH'ta aköz solüsyonlu hidroklorik asit, sülfürik asit, asetik asit, formik asit ve fosforik asit solventleri bulunur. Aköz asit ayrıca bir asidik aköz tamponlu sistemi içerir. Asidik tamponlu sistemlerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, her biri kendi asidik tamponlama aralıklarında kullanılmak üzere pH ayarlaması

25 yapılmış sodyum fosfat, potasyum fosfat, amonyum asetat ve amonyum format bulunur. Aköz bazların örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, 7.1 ila 13 arasında bir pH'ta aköz solüsyonlu sodyum bikarbonat, potasyum bikarbonat, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, amonyum hidroksit ve sodyum fosfat solventleri bulunur. Aköz baz aynı zamanda, bir bazik aköz tamponlama

30 sistemini içerir. Bazik tamponlu sistemlerin örnekleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, her biri kendi bazik tamponlama aralıklarında kullanılmak üzere pH'ı ayarlanan sodyum fosfat, potasyum fosfat, sodyum borat ve amonyum karbonat bulunur.

Asidik veya bazik yıkamalar, ansamitosinlerin pH'ına göre değişeceği üzere gözle görülür bir şekilde bozulmadan tamamlanmak zorundadır. Gerekli olması halinde, bu, son derece hızlı ekstraksiyon santrifüj teknikleri ile yapılabilir. Kısmen veya tamamen tuza doymuş su örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, çeşitli doygunluk seviyelerinde aköz sodyum klorür, çeşitli doygunluk seviyelerinde aköz sodyum sülfat ve çeşitli doygunluk seviyelerinde aköz potasyum klorür içerir. Aynı zamanda tamamen veya kısmen doymuş bir sulu tuz solüsyonunun bir karışımının bir aköz baz veya bir aköz asitle birleştirildiği sulu yıkamalar gerçekleştirilebilir.

10

Ekstraksiyon öncesinde filtrasyon:

Alternatif olarak, ekstraksiyon öncesinde, fermantasyon sıvısı içeren ansamitosinlerde bulunan katılar, filtrasyon veya santrifüjleme ile ayrılabilir. Katı hücre kütlesindeki antamitosinler, etanol , aköz etanol gibi bir solvent veya etil asetat, bütil asetat, diklorometan veya aseton gibi diğer organik solventler ile yıkanarak geri kazanılabilir ve teknikte uzman olan kişilerce iyi bilinir.

15

Ansamitosinlerin saflaştırılması:

20

Ham ürün, akabinde gerekli olması halinde yeniden kristalleştirmenin gerçekleştiği silika jeli veya alümina üzerinde adsorpsiyon kromatografisi gibi saflaştırma prosedürlerine tabi tutulabilir. Tercihen kromatografi, Biotage kromatografi sistemi kullanılarak bir Biotage silika jel kartuşu gibi önceden paketlenmiş bir kolon üzerinde gerçekleştirilir. Arzu edilen ansamitosinler, bir etil asetat ve heksan karışımı ile başlayan ve artan miktarlarda metanol eklenerek ve bir solvent gradyanı kullanılarak kolondan ayrıştırılabilir. İstenen ansamitosinleri içeren fraksiyonlar toplanabilir ve konsantre edilebilir. İstenmesi halinde, ansamitosinler, ürünü çözmek amacıyla etil asetat gibi bir solvent kullanılarak ve daha sonra saf ürünü kristalize etmek amacıyla heptan veya heksan gibi polar olmayan bir solvent ilave edilerek kristalleştirme yoluyla daha fazla oranda saflaştırılabilir. Burada kullanılan kristalleşme ifadesi ayrıca

25

30

solüsyondan oluşan katının, amorf veya tanımlanmış bir yapıya sahip olabilmesi amacıyla çökelme terimini kapsar.

Hücre Bağlayıcı Ajan/Maytansinold Kompleksleri:

5

Buluşun prosesi, tümörle etkileşime sahip pro ilaçlar olarak faydalı olan hücre bağlayıcı ajan/maytansinold komplekslerini yapmak amacıyla kullanılabilir. Buluşun prosesi ile hazırlanan ansamitosinler, U.S içerisinde açıklandığı üzere kullanılabilen maytansinole indirgeyici bölünmeyi geçirebilir. Patent Numaraları.

10 5,208,020, 5,416,064, 6,333,410 ve 6,441,163 maytansinold türevlerini içeren N-metil-alaninin üretilmesi amacıyla mevcuttur. Bu türevler daha sonra disülfid içeren bağlayıcılar gibi çeşitli bağlayıcılar vasıtasıyla hücre bağlayıcı ajanlara, tercihen antikorlara bağlanır.

15 **ÖRNEKLER**

Buluş artık kısıtlayıcı olmayan örneklere verilen referans ile gösterilecektir.

Referans ÖRNEĞİ 1 Ansamitosinlerin üretimi:

20

Primer Tohum: %2 çözünebilir nişasta, %1 glikoz, %1 soya küspesi, %0.5 mısır maserasyon sıvısı, (Roquette) %0.5 Soytone, %0.3 sodyum klorid ve %0.5 kalsiyum karbonatı içeren tohum kültür ortamı VM4-1 (400ml/şişe), 2 L kapasiteye sahip on bir Erlenmeyer şişe

25 içersine dökülmüştür. Sterilizasyondan sonra, şişelerden her biri PF4-4 (ATCC PTA-3921) kültürü ile aşılantmıştır. Şişeler, 48 saat boyunca 230 rpm'de bir orbital karıştırıcıda 28 °C'de inkübe edilmiştir.

25

İkinci Tohum: Birincil tohum şişelerinin içeriği daha sonra toplanmıştır. A 300 L fermentörü, 100 L VM4-1 tohum ortamı ile doldurulmuştur.

30 Sterilizasyondan sonra, fermentör, 4 L toplanmış primer tohum kültürü ile aşılantmıştır. Fermentör, 80 rpm'de karıştırılarak 28°C'de muhafaza edilmiştir. Çözünmüş oksijen seviyesi, havalandırma ve istenmesi halinde artan karıştırma ile % 30 oranından fazla doygunluk ile muhafaza

edilmiştir.24 saat boyunca inkübasyonun sonrasında, ikinci tohum kültürü, üretim tanklarına taşınmak üzere hazır durumda olmuştur.

Üretim: İki 300 L üretim fermentörünün her birine, 250 L üretim ortamı FM4-6 (bakınız Tablo 1) doldurulmuştur. Sterilizasyon sonrasında, fermentörlerin her biri, 15 L ikinci tohum kültürü ile aşılanmıştır. Fermentörler, 107 ± 5 rpm'de karıştırma ve 0.4 vvm'de havalandırma ile 28°C 'de muhafaza edilmiştir.2. günün sonrasında, çözünen oksijen içeriği, karıştırma hızını maksimum 170 ± 5 rpm'ye ve havalandırma hızını maksimum 1 vvm'ye yükselterek %30'un üzerinde bir oranda muhafaza edilmiştir. Ansamitosin titresi, akabinde HPLC analizi ile yapılan miktar tayininin gerçekleşeceği şekilde günlük olarak bir fermantasyon sıvısına ait numunenin geri çekilmesi ve etanole seyreltilmesi ile ölçülmüştür. Fermantasyona 10 gün boyunca devam edilmiştir, bu noktada, ansamitosin birikimi sabit olarak kalmıştır.10. günde iki fermentördeki ansamitosin titresi sırasıyla 251 mg/L ve 244 mg/L olmuştur. Fermantasyon sıvısının pH değeri, fosforik asidin eklenmesiyle 6.5'e ayarlanmıştır. Fermentörler, 55°C 'ye ısıtılmıştır ve mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesine yönelik olarak 1 saat boyunca bu sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Fermentörler daha sonra bir organik solvent ile ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesine yönelik olarak ortam sıcaklığına düşürülerek soğutulmuştur.

Referans ÖRNEK 2: Bir besleme kesikli proses kullanılarak Ansamitosinlerin üretilmesi.

Bir 1500 L üretim fermentörü 900 L üretim ortamı FM4-6 (bakınız Şekil 1) ile doldurulmuştur. Sterilizasyonun ardından fermentör, yukarıda belirtildiği üzere hazırlanan 54 L ikinci tohum kültürü ile aşılanmıştır. Fermentör, 107 ± 5 rpm'de karıştırma ve 0,4 WM'de havalandırma ile 28°C 'de muhafaza edilmiştir.0 ila 48 saat boyunca %28.5 oranında glikozun bir aköz solüsyonu, 0.39 mL/L/h bir oranda beslenmiştir.48 saat ila 288 saat boyunca, beslemeden, %21.5 glikoz, %7.1 Proflo ve %7.1 izobütanolü içeren, 0.51 mL/L/h oranında beslenmiş olan bir doygun çözeltiye geçilmiştir.2. günün sonrasında, çözünen

oksijen içeriği, karıştırma hızını maksimum 170 ± 5 rpm'ye ve havalandırma hızını maksimum 1 vvm'ye yükselterek %20'un üzerinde bir oranda muhafaza edilmiştir. Ansamitosin titresi, akabinde HPLC analizi ile yapılan miktar tayininin gerçekleşeceği şekilde günlük olarak bir fermantasyon sıvısına ait numunenin

5 geri çekilmesi ve etanole seyreltilmesi ile ölçülmüştür. Fermantasyona 13 gün boyunca devam edilmiştir, bu noktada, ansamitosin birikimi sabit olarak kalmıştır. 13. günde fermentördeki ansamitosin titresi 304 mg/L olmuştur. Fermantasyon sıvısının pH değeri, fosforik asidin eklenmesiyle 6.5'e ayarlanmıştır.

10 **Isı ile etkisiz hale getirme.** Fermentör, 55 °C'ye ısıtılmıştır ve mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesine yönelik olarak 1 saat boyunca bu sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Fermentörler daha sonra organik bir solvent ile ekstraksiyona yönelik olarak 30 ile 40°C arasında soğutulmuştur.

15 **Örnek 3 (karşılaştırmalı): Ansamitosinlerin ekstraksiyonu ve Kromatografik Saflaştırması.**

Örnek 2'de yer alan fermantasyon sıvısı, eşit hacimli bir n-bütül asetat ile karıştırılmıştır. Karışım 30 ile 40°C ila 45°C'de muhafaza edilmiştir ve iki fazın

20 karıştırılmasının yalnızca solvent arayüzünde ortaya çıkması amacıyla yavaşça karıştırılmıştır. Ekstraksiyon 5 gün boyunca veya ansamitosinlerin % 80'inin ekstrakte edildiğinin belirtildiği organik katmanın HPLC analizi gerçekleştirilene kadar devam etmiştir. Organik katman daha sonra ayrıştırılmıştır ve düşen film evaporatörü kullanılarak 20 ile 50 L arasındaki bir nihai hacme

25 buharlaştırılmıştır. Konsantre ekstrakt, 2.2 kg silika jelini içeren bir şişeye aktarılmıştır. Ham ansamitosinler, indirgenmiş basınç altında çalışan bir döner buharlaştırıcı kullanılarak solventin kuruyana kadar buharlaştırılmasıyla silika jel üzerine kaplanmıştır. Kaplanmış silika daha sonra Biotage, Inc., Charlottesville, VA'dan tedarik edilen bir numune enjeksiyon modülüne (SIM) aktarılmıştır. SIM,

30 sikloheksan ve heksan karışımı ile yıkanmıştır (2:1 v/v), ve daha sonra bir silika kartuşu ile donatılan bir Biotage 150M sistemine bağlanmıştır. İstenen ürün etil asetat:heksan:metanol (29.4:68.6:2.0, v/v/v) karışımı kullanılarak kolondan ayrıştırılmıştır. Ansamitosin içeren fraksiyonlar toplanmıştır ve solvent,

indirgenmiş basınç altında buharlaştırılmıştır. Ürün ayrıca, 24 saat boyunca yüksek vakum altında kurutulmuştur.

Referans Örnek 4:Ansamitosionlerin yeniden kristalleşmesi.

5

Yukarıda belirtilen adımdaki kuru ürün, sıcak etil asetat (23 ml/g kalıntı) içerisinde çözülmüştür. Karışım, ansamitosinler tam olarak çözülene kadar 60-75 °C arasında muhafaza edilmiştir. Heptan (80 mL/g kalıntı), yığının sıcaklığı 60-75°C'de muhafaza edilirken yavaş bir şekilde eklenmiştir. Tüm heptanın eklenmesinin ardından yığının oda sıcaklığına soğutulmasına olanak sağlanmıştır. Kristaller filtrasyon aracılığıyla geri kazanılmıştır ve akabinde 221 gram saf ansamitosinin sağlanması amacıyla yüksek vakum altında kurutulmuştur.

15 **Örnek 5 (karşılaştırmalı):Filtrasyonlu fermantasyon sıvısının ekstraksiyonu.**

Örnek 2'de açıklandığı üzere hazırlanan fermantasyon sıvısı (200 ml), 200 ml n-bütil asetat (200 ml) ile 5 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırılmış, bir emülsiyon ile sonuçlanmıştır. Cellatom FW-80 filtre desteği (20g) eklenmiştir ve karışım, Cellatom FW-80 filtre desteğiyle önceden kaplanmış olan bir buchner hunisi boyunca vakum ile filtrelenmiştir. Filtre çamuru, 40 mL n-bütil asetat ile yıkanmıştır. Hâlihazırda katı kirleticilerden arındırılan, bir temiz organik ve aköz katmanı içeren filtrat, bir ayırma hunisine aktarılmıştır. Aköz faz boşaltılmıştır.

25 Ansamitosinleri içeren organik faz tutulmuştur.

Örnek 6 (karşılaştırmalı):Fermantasyon sıvısının suyla karışmayan bir solvent kullanılarak ekstraksiyonu.

30 Örnek 2'de açıklandığı üzere hazırlanan fermantasyon sıvısının bir kısmı, n-bütil asetatın bir kısmı ile 2 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Elde edilen emülsiyon 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir ve katı kirletici maddeleri içermeyen ansamitosinleri içeren organik katman geri çekilmiştir.

Örnek 7 (karşılaştırmalı):Fermantasyon sıvısının su ile karışmayan bir solvent kullanılarak ekstraksiyonu.

- 5 Örnek 2'de açıklandığı üzere hazırlanan fermantasyon sıvısının bir kısmı asetonun bir parçası ile kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Karışım, katıların peletlenmesi amacıyla 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant geri çekilmiştir ve heksanların bir yarı parçası ile karıştırılmıştır. Aköz katman, ansamitosinleri içeren temiz bir organik fazı bırakarak ayrıştırılmıştır.

10

ÖRNEK 8.Ansamitosinlerin XAD-16 hidrofobik boncuklar kullanılarak katı faz ekstraksiyonu.

- 15 Örnek 2'de açıklandığı üzere hazırlanan bir litre fermantasyon sıvısı, altı saat boyunca 10 gram XAD-16 boncuk ile karıştırılmıştır. Karışım daha sonra santrifüjlenmiştir ve süpernatant kaldırılmıştır. Pelet, küçük bir kolona aktarılmıştır ve akabinde 90:10 deiyonize su:asetonitrili izleyerek deiyonize su ile ayrıştırılmıştır. Ansamitosinleri içeren fraksiyonlar kombine edilmiştir ve solvent, 112 mg konsantre ekstraktın sağlanması amacıyla buharlaştırılmıştır.
- 20 HPLC analizi, 50 mg ansamitosini içeren ekstraktı ifade etmiştir.

Buluş ayrıntılı olarak ve bunların spesifik düzenlemelerine verilen referans ile açıklanırken, teknikte uzman kişilerce, burada çeşitli değişikliklerin ve modifikasyonların yapılabileceği anlaşılabacaktır.

Şekil 1 Ansamitosinlerin Yapıları

