



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 695**

51 Int. Cl.:

**C07D 417/06** (2006.01)

**C07D 493/04** (2006.01)

**A01N 43/90** (2006.01)

**C12P 17/16** (2006.01)

**A61K 31/427** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03016552 .6**

96 Fecha de presentación : **18.11.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1367057**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54 Título: **Epotilones E y F.**

30 Prioridad: **18.11.1996 DE 196 47 580**  
**25.02.1997 DE 197 07 506**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2009**

73 Titular/es: **Gesellschaft für Biotechnologische  
Forschung mbH (GBF)**  
**Mascheroder Weg 1**  
**38124 Braunschweig, DE**

72 Inventor/es: **Reichenbach, Hans;**  
**Höfle, Gerhard;**  
**Gerth, Klaus y**  
**Steinmetz, Heinrich**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

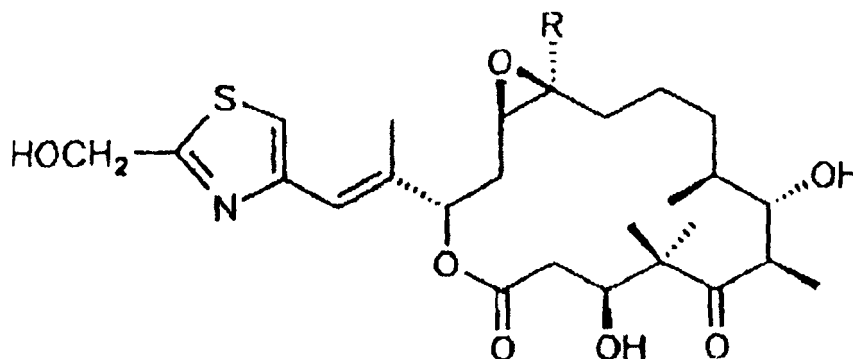
**Aviso:** En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Epotilones E y F.

El presente invento se refiere a los epotilones E y F así como a un agente terapéutico.

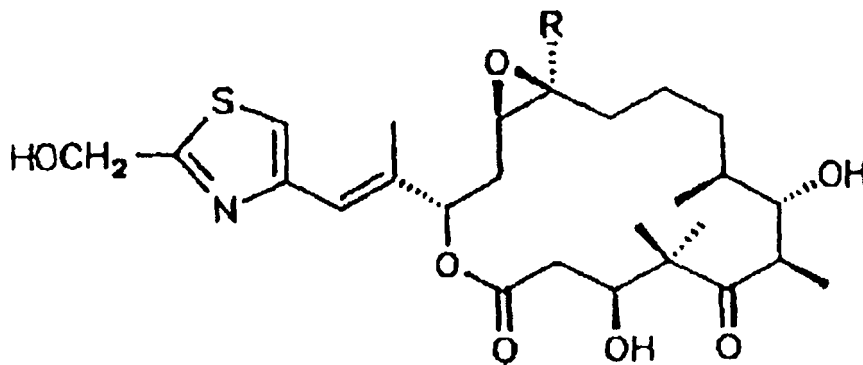
Así, el invento se refiere a un compuesto (epotilón E) de la fórmula:



Epotilón E      R = H.

Además, el invento se refiere a un compuesto de la fórmula empírica  $C_{26}H_{39}NO_7S$ , que está caracterizado por el siguiente espectro de  $^1H$ -RMN (resonancia magnética nuclear de protones de hidrógeno) (300 MHz,  $CDCl_3$ ): delta = 2,38 (2- $H_a$ ), 2,51 (2- $H_b$ ), 4,17 (3-H), 3,19 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30 - 1,70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2,89 (12-H), 3,00 (13-H), 1,88 (14- $H_a$ ), 2,07 (14- $H_b$ ), 5,40 (15-H), 6,57 (17-H), 7,08 (19-H), 4,85 (21- $H_2$ ), 1,05 (22- $H_3$ ), 1,32 (23- $H_3$ ), 1,17 (24- $H_3$ ), 0,97 (25- $H_3$ ), 2,04 (27- $H_3$ ).

Además, el invento se refiere a un compuesto (epotilón F) de la fórmula:



Epotilón F      R =  $CH_3$

Además, el invento se refiere a un compuesto de la fórmula empírica  $C_{27}H_{41}NO_7S$ , que está caracterizado por el siguiente espectro de  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ): delta = 2,37 (2- $H_a$ ), 2,52 (2- $H_b$ ), 4,20 (3-H), 3,27 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30 - 1,70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2,78 (13-H), 1,91 (14-H), 2,06 (14- $H_b$ ), 5,42 (15-H), 6,58 (17-H), 7,10 (19-H), 4,89 (21- $H_2$ ), 1,05 (22- $H_3$ ), 1,26 (23- $H_3$ ), 1,14 (24- $H_3$ ), 0,98 (25- $H_3$ ), 1,35 (26- $H_3$ ), 2,06 (27- $H_3$ ).

Finalmente, el invento se refiere a un agente terapéutico, que se compone de uno o varios de los compuestos precedentemente expuestos, o que se compone de uno o varios de los compuestos precedentemente expuestos junto a uno o varios vehículo(s) usual(es) y/o agente(s) diluyente(s) usual(es). Este agente puede mostrar en particular actividades citotóxicas y/o producir una inmunosupresión y/o ser empleado para la represión de tumores malignos, siendo utilizable de manera preferida como agente citostático.

El invento se explica y describe con mayor detalle a continuación por medio de la descripción de algunos Ejemplos seleccionados de realización.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 5 *Epotilones E y F, nuevos productos de biotransformación de los epotilones A y B*

##### *Cepa de producción*

10 La cepa de producción *Sorangium cellulosum* So ce90 se aisló en Julio de 1985 en la GBF a partir de una muestra de suelo de las orillas del río Zambesi y se depositó el 28.10.91 en la Colección Alemana de Microorganismos (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen) bajo el número de DSM 6773.

La caracterización de los organismos productores así como las condiciones de cultivo se describen en:

15 **Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach:** Epotilones, sus procedimientos de preparación así como agentes que los contienen. Documento de solicitud de patente alemana DE 41.38.042 A1, divulgado el 27 de Mayo de 1993.

##### *Formación de los epotilones E y F durante la fermentación*

20 Una fermentación típica discurre de la siguiente manera: Un biorreactor con una capacidad de 100 l se llena con 60 l de un medio (0,8 de un almidón; 0,2 de glucosa; 0,2% de harina de soja; 0,2% de un extracto de levadura, 0,1% de  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1% de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 8 mg/l de Fe-EDTA; de pH 7,4). Adicionalmente, se añade 2% de una resina adsorbente (XAD-16, Rohm & Haas). El medio es esterilizado mediante tratamiento en un autoclave (durante 2 horas, a 120°C). Se inocula con 10 l de un cultivo preliminar que se cultiva en el mismo medio (adicionalmente 50 mM de un tampón HEPES de pH 7,4) en un matraz con sistema de sacudimiento (160 rpm, 30°C). Se fermenta a 32°C con una velocidad del agitador de 500 rpm (revoluciones por minuto) y con una aireación de 0,2 NI (litros en condiciones normales) por  $\text{m}^3$  y hora (h.), el valor del pH es mantenido en 7,4 por adición de KOH. La fermentación dura de 7 a 10 días. Los epotilones formados son fijados continuamente durante la fermentación a la resina adsorbente. Después de haber separado el caldo de cultivo (p. ej. por tamizado en un filtro de proceso) la resina se lava con 3 volúmenes de lecho de agua y se eluye con 4 volúmenes de lecho de metanol. El material eluido se concentra por evaporación hasta sequedad y se recoge en 700 ml de metanol.

##### *Análisis por HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) del material eluido con la XAD*

35 Frente al volumen inicial del reactor (70 l) el material eluido es concentrado a 100:1. El análisis se lleva a cabo con una instalación para HPLC 1090 de la entidad Hewlett Packard. Para la separación de las sustancias constituyentes se utiliza una columna Microbore (125/2 Nucleosil 120-5  $\text{C}_{18}$ ) de la entidad Machery-Nagel (Düren). Se eluye con un gradiente de mezclas de agua y acetonitrilo desde inicialmente 75:25 hasta 50:50 después de 5,5 minutos. Esta relación es mantenida hasta el 7º minuto, para luego, hasta el 10º minuto, subir a 100% de acetonitrilo.

45 Se mide con una longitud de onda de 250 nm y con una anchura de banda de 4 nm. Los espectros de agrupación (en inglés array) de diodos se miden en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 400 nm. En el material eluido con la XAD llaman la atención dos nuevas sustancias con  $R_f$  5,29 y  $R_f$  5,91, cuyos espectros de adsorción son idénticos a los de los epotilones A y respectivamente B (Fig. 1; E corresponde a A; F corresponde a B). Estas sustancias se forman solamente en unas cantidades de vestigios en las condiciones de fermentación señaladas.

##### *Biotransformación de los epotilones A y B en los epotilones E y F*

50 Para la biotransformación planificada se utilizan 500 ml de un cultivo de So ce90 con una antigüedad de 4 días, mantenidos con la resina adsorbente. De éstos se transfieren 250 ml, dejando atrás a la XAD, a un matraz de Erlenmeyer estéril con una capacidad de 1l. Después de esto se añade una solución metanólica de una mezcla de 36 mg de epotilón A y de 14 mg de epotilón B en total, y el matraz se incuba durante dos días a 30°C y 200 rpm sobre un arca con sistema de sacudimiento. La formación de los epotilones E y F es analizada directamente a partir de 10  $\mu\text{l}$  del material sobrenadante de cultivo centrifugado (Fig. 2). La transformación se efectúa solamente en presencia de las células y es dependiente de la densidad celular empleada y del tiempo. Una cinética de la transformación se representa para el epotilón A en la Fig. 3.

##### *Aislamiento de los epotilones E y F*

60 Para el aislamiento de los epotilones E y F se reúnen tres tandas del matraz con sistema de sacudimiento, procedentes de la biotransformación (véase más arriba) y se sacuden durante 1 h con 20 ml de la XAD-16. La XAD se obtiene mediante separación por tamizado y se eluye con 200 ml de metanol. El material eluido se concentra por evaporación en vacío para dar 1,7 g de un extracto bruto. Éste se reparte entre 30 ml de acetato de etilo y 100 ml de agua. A partir de la fase de acetato de etilo se obtienen, al concentrar por evaporación en vacío, 330 mg de un residuo oleoso, que se transforma en cinco pasadas a través de una columna RP-18 de 250 x 20 mm (agente eluyente: mezcla de metanol y agua 58:42, detección a 254 nm).

## ES 2 312 695 T3

Rendimiento: Epotilón E 50 mg

Epotilón F 10 mg

### Efecto biológico del epotilón E

En cultivos celulares se determinó la concentración que reduce en un 50% el crecimiento ( $CI_{50}$ ) y se comparó con los valores obtenidos para el epotilón A.

#### Linaje celular

#### $CI_{50}$ (ng/ml)

#### Epotilón E

#### Epotilón A

HeLa, KB-3.1 (humano)

5

1

Fibroblastos de ratón L929

20

4

### Epotilón E

$C_{26}H_{39}NO_7S$  [509]

ESI-MS: (iones positivos): 510,3 para  $[M+H]^+$

DC:  $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Agente eluyente: Mezcla de diclorometano y metanol = 9:1

Detección: Extinción de rayos UV a 254 nm. Atomizar con un reactivo de vainillina y ácido sulfúrico, tinción de color gris azulado al calentar a 120°C.

[ESI-MS = espectrometría de masas con ionización por proyección de electrones DC: cromatografía de capa fina; DC-Alufolie = lámina de aluminio para cromatografía de capa fina]

HPLC:  $R_t = 5,0$  min

Columna: Nucleosil 100 C-18 7  $\mu m$ , 250 x 4 mm

Agente eluyente: mezcla de metanol y agua = 60:40

Caudal: 1,2 ml/min

Detección: con agrupación de diodos

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 2,38$  (2- $H_a$ ), 2,51 (2- $H_b$ ), 4,17 (3-H), 3,19 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30 - 1,70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2,89 (12-H), 3,00 (13-H), 1,88 (14- $H_a$ ), 2,07 (14- $H_b$ ), 5,40 (15-H), 6,57 (17-H), 7,08 (19-H), 4,85 (21- $H_2$ ), 1,05 (22- $H_3$ ), 1,32 (23- $H_3$ ), 1,17 (24- $H_3$ ), 0,97 (25- $H_3$ ), 2,04 (27- $H_3$ )

### Epotilón F

$C_{27}H_{41}NO_7S$  [523]

ESI-MS: (iones positivos): 524,5 para  $[M+H]^+$

DC:  $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Agente eluyente: Mezcla de diclorometano y metanol = 9:1

Detección: Extinción de rayos UV a 254 nm. Atomizar con un reactivo de vainillina y ácido sulfúrico, tinción de color gris azulado al calentar a 120°C.

## ES 2 312 695 T3

HPLC:  $R_t = 5,4$  min

Columna: Nucleosil 100 C-18  $7\ \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4$  mm

5 Agente eluyente: mezcla de metanol y agua = 60:40

Caudal: 1,2 ml/min

10 Detección: con agrupación de diodos

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2,37$  (2- $\text{H}_a$ ), 2,52 (2- $\text{H}_b$ ), 4,20 (3-H), 3,27 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30 - 1,70 (8-H, 9- $\text{H}_2$ , 10- $\text{H}_2$ , 11- $\text{H}_2$ ), 2,78 (13-H), 1,91 (14-H), 2,06 (14- $\text{H}_b$ ), 5,42 (15-H), 6,58 (17-H), 7,10 (19-H), 4,89 (21- $\text{H}_2$ ), 1,05 (22- $\text{H}_3$ ), 1,26 (23- $\text{H}_3$ ), 1,14 (24- $\text{H}_3$ ), 0,98 (25- $\text{H}_3$ ), 1,35 (26- $\text{H}_3$ ), 2,06 (27- $\text{H}_3$ ).

### Ejemplo 2

Preparación de epotilones E y F mediante biotransformación con *Sorangium cellulosum* So ce90

#### 1) Realización de la biotransformación

Para la biotransformación se utiliza un cultivo de *Sorangium cellulosum* So ce90, que fue sacudido durante cuatro días en presencia de 2% de la resina adsorbente XAD 16 (de la entidad Rohm und Haas, Frankfurt/M.) a  $30^\circ\text{C}$  y 160 rpm. El medio de cultivo tiene la siguiente composición en g/litro de agua destilada: almidón de patata (Maizena), 8; glucosa (Maizena), 8; harina de soja desengrasada, 2; extracto de levadura (Marcor), 2; ácido etilendiamina-tetraacético, sal de hierro (III) y sodio, 0,008;  $\text{MgSO}_4 \times 7\ \text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{CaCl}_2 \times 2\ \text{H}_2\text{O}$ , 1; HEPES 11,5. El valor del pH es ajustado, antes del tratamiento en autoclave con KOH, a 7,4. La XAD es separada del cultivo por tamizado a través de un tamiz de acero inoxidable (anchura de mallas  $200\ \mu\text{m}$ ). Las bacterias se sedimentan por centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm y el sedimento se vuelve a suspender en 1/5 del material sobrenadante de cultivo. A la suspensión concentrada de bacterias se le añade seguidamente epotilón A o respectivamente epotilón B en una solución metanólica en una concentración de 0,5 g/litro. El cultivo se sigue cultivando tal como arriba se ha descrito. Para el análisis de la biotransformación, en los momentos deseados se saca una muestra de 1 ml, se añaden 0,1 ml de XAD y la muestra se sacude a  $30^\circ\text{C}$  durante 30 min. La XAD se eluye con metanol. El material eluido se concentra por evaporación hasta sequedad y se recoge de nuevo en 0,2 ml de etanol. Esta muestra se analiza por medio de una HPLC.

Fig. 4) Cinética de la biotransformación de epotilón A en epotilón E

Fig. 5) Cinética de la biotransformación de epotilón B en epotilón F.

#### 2) Preparación de epotilón E por biotransformación de 1 g de epotilón A

La cepa *Sorangium cellulosum* So ce90 se cultiva durante cuatro días en 8,5 l del medio anterior (pero sin adición de XAD) en un biorreactor que tiene una capacidad de 10 litros a  $30^\circ\text{C}$ , con un número de revoluciones de 150 rpm y una aireación de 0,1 vvm.

A continuación, el cultivo se concentra por evaporación hasta 3 l mediante filtración de flujo cruzado (del inglés cross flow). Para esto se utilizan  $0,6\ \text{m}^2$  de una membrana que tiene un tamaño de poros de  $0,3\ \mu\text{m}$ .

El cultivo concentrado se transfiere a un biorreactor con una capacidad de 4 litros y se añade una solución metanólica de 1 g de epotilón A en 10 ml de metanol. A continuación, el cultivo se sigue cultivando durante un período de tiempo de 21,5 h. La temperatura es de  $32^\circ\text{C}$ , el número de revoluciones del agitador es de 455 rpm y la aireación se efectúa con 6 l/min. En el momento de la cosecha se añaden 100 ml de XAD y se sigue incubando durante 1 h. La XAD se separa de las células por tamizado y se eluye con metanol hasta agotamiento. El material eluido concentrado se analiza por medio de una HPLC.

|                                         |                  |
|-----------------------------------------|------------------|
| Epotilón A empleado:                    | 100 mg = 100 %   |
| Epotilón A encontrado después de 21,5 h | 53,7 mg = 5,4 %  |
| Epotilón E formado después de 21,5 h    | 661,4 mg = 66,1% |
| Epotilón A totalmente descompuesto      | = 28,5 %         |

## Ejemplo 3

Los epotilones E y F conformes al invento se ensayaron con cultivos celulares (Tabla 1) y se analizaron en cuanto al fomento de la polimerización (Tabla 2).

TABLA 1

*Ensayos de epotilones con cultivos celulares*

| Epotilón                                     | A<br>493 | B<br>507<br>CI-50 | C<br>477<br>[ng/ml] | D<br>491 | E<br>509 | F<br>523 |
|----------------------------------------------|----------|-------------------|---------------------|----------|----------|----------|
| Fibroblastos de ratón L 29                   | 4        | 1                 | 100                 | 20       | 20       | 1,5      |
| <u>Linajes de células tumorales humanas:</u> |          |                   |                     |          |          |          |
| HL-60 (leucemia)                             | 0,2      | 0,2               | 10                  | 3        | 1        | 0,3      |
| K-562 (leucemia)                             | 0,3      | 0,3               | 20                  | 10       | 2        | 0,5      |
| U-937 (linfoma)                              | 0,2      | 0,2               | 10                  | 3        | 1        | 0,2      |
| KB 3.1 (carcinoma de cuello uterino)         | 1        | 0,6               | 20                  | 12       | 5        | 0,5      |
| KB-V1 (carcinoma de cuello uterino multires) | 0,3      | 0,3               | 15                  | 3        | 5        | 0,6      |
| A-498 (carcinoma de riñón)                   | -        | 1,5               | 150                 | 20       | 20       | 3        |
| A-549 (carcinoma de pulmón)                  | 0,7      | 0,1               | 30                  | 10       | 3        | 0,1      |

TABLA 2

*Ensayo de polimerización con epotilones*

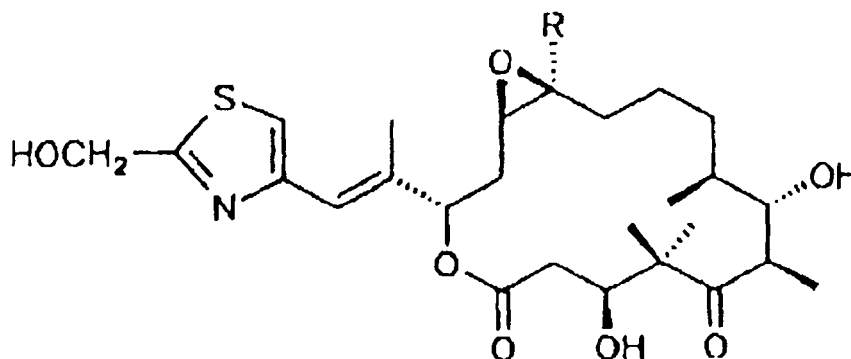
| Medición   | w   | x   | y   | z   | Media<br>[s] | Media<br>[%] |
|------------|-----|-----|-----|-----|--------------|--------------|
| Testigo    | 200 | 170 | 180 | 210 | 190          | 100          |
| Epotilón A | 95  | 60  | 70  | 70  | 74           | 39           |
| Epotilón B |     | 23  | 25  | 30  | 26           | 14           |
| Epotilón C | 125 | 76  | 95  | 80  | 94           | 49           |
| Epotilón D | 125 | 73  | 120 |     | 106          | 56           |
| Epotilón E | 80  | 60  | 50  | 45  | 59           | 31           |
| Epotilón F | 80  | 40  | 30  | 50  | 50           | 26           |

*Ensayo patrón con 0,9 mg de tubulina/ml y con una concentración de la muestra de 1 µm*

El ensayo de polimerización es un ensayo *in vitro* con una tubulina purificada procedente del cerebro de un cerdo. La evaluación se efectúa fotométricamente. Las sustancias que fomentan la polimerización, tales como los epotilones, acortan el período de tiempo, que transcurre hasta que se haya efectuado la polimerización semimáxima, es decir que cuanto más corto es el período de tiempo, tanto más eficaz es el compuesto. w, x, y y z son cuatro ensayos independientes, la actividad relativa es expresada en la última columna en % del testigo; de nuevo, los valores más bajos indican la mejor actividad. La lista de rangos corresponde con bastante exactitud a lo comprobado en cultivos celulares.

## REIVINDICACIONES

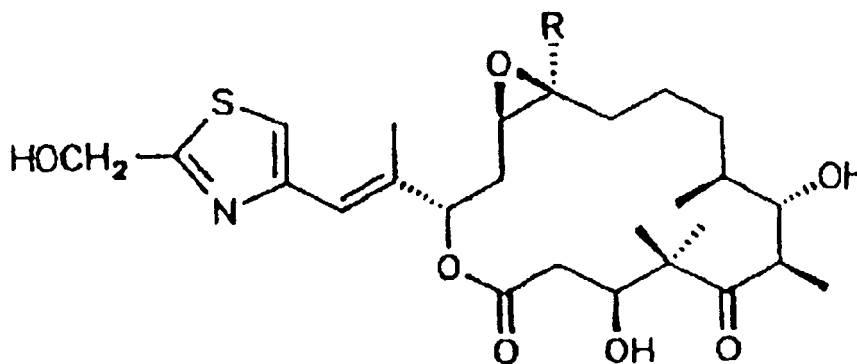
1. Compuesto (epotilón E) de la fórmula :



Epotilón E      R = H.

2. Compuesto de la fórmula empírica  $C_{26}H_{39}NO_7S$ , de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por el siguiente espectro de  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ): delta = 2,38 (2- $H_a$ ), 2,51 (2- $H_b$ ), 4,17 (3-H), 3,19 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30 - 1,70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2,89 (12-H), 3,00 (13-H), 1,88 (14- $H_a$ ), 2,07 (14- $H_b$ ), 5,40 (15-H), 6,57 (17-H), 7,08 (19-H), 4,85 (21- $H_2$ ), 1,05 (22- $H_3$ ), 1,32 (23- $H_3$ ), 1,17 (24- $H_3$ ), 0,97 (25- $H_3$ ), 2,04 (27- $H_3$ ).

3. Compuesto (epotilón F) de la fórmula:



Epotilón F      R =  $CH_3$

4. Compuesto de la fórmula  $C_{27}H_{41}NO_7S$ , según la reivindicación 3, **caracterizado** por el siguiente espectro de  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ): delta = 2,37 (2- $H_a$ ), 2,52 (2- $H_b$ ), 4,20 (3-H), 3,27 (6-H), 3,74 (7-H), 1,30 - 1,70 (8-H, 9- $H_2$ , 10- $H_2$ , 11- $H_2$ ), 2,78 (13-H), 1,91 (14-H), 2,06 (14- $H_b$ ), 5,42 (15-H), 6,58 (17-H), 7,10 (19-H), 4,89 (21- $H_2$ ), 1,05 (22- $H_3$ ), 1,26 (23- $H_3$ ), 1,14 (24- $H_3$ ), 0,98 (25- $H_3$ ), 1,35 (26- $H_3$ ), 2,06 (27- $H_3$ ).

5. Agente terapéutico, en particular para el empleo como agente citostático, que se compone de uno o varios de los compuestos según una o varias de las precedentes reivindicaciones, o que se compone de uno o varios de los compuestos según una o varias de las precedentes reivindicaciones junto con uno o varios usual(es) vehículo(s) y/o agente(s) diluyente(s).

Fig. 1 Análisis por HPLC de un material eluido con una XAD al final de una fermentación

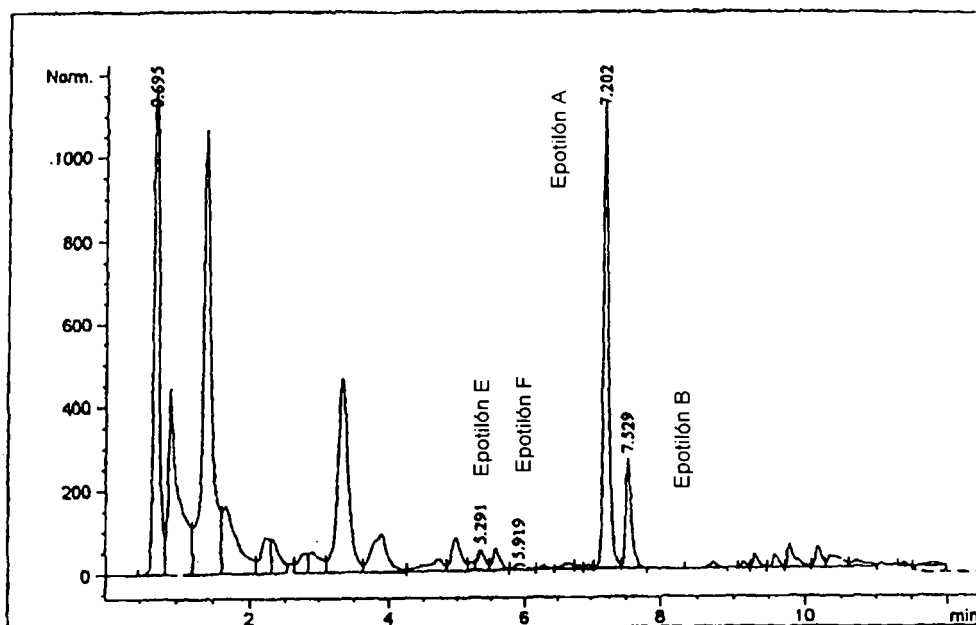


Fig. 2 Enriquecimiento de epotilones E y F en un caldo de fermentación después de haber alimentado una mezcla de epotilones A y B, analizado después de una incubación durante 48 horas.

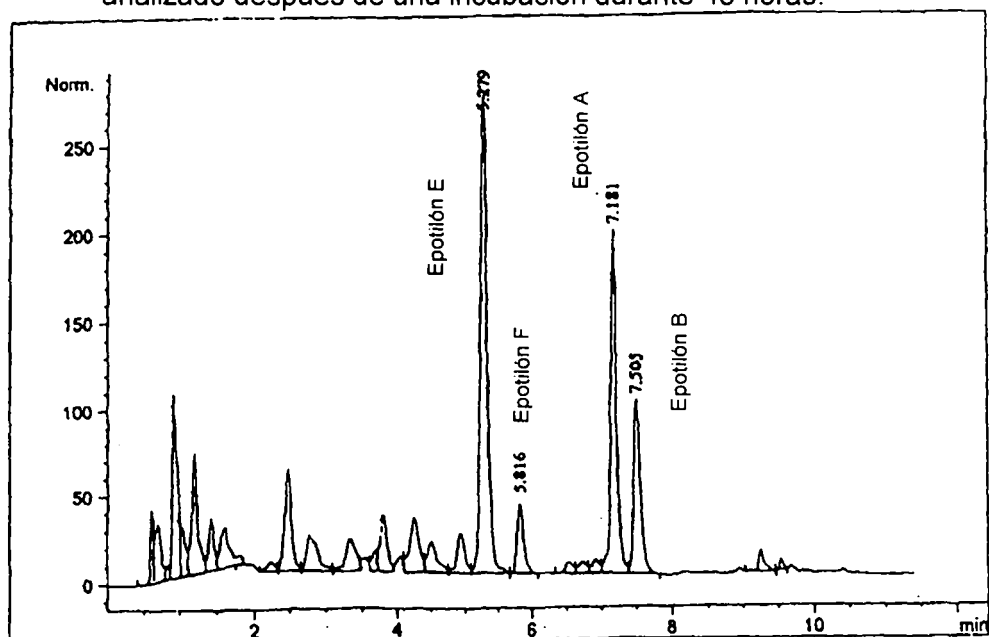


Fig. 3 Cinética de la biotransformación de epotilón A Epotilón E mediante *Sorangium cellulosum* So ce90.

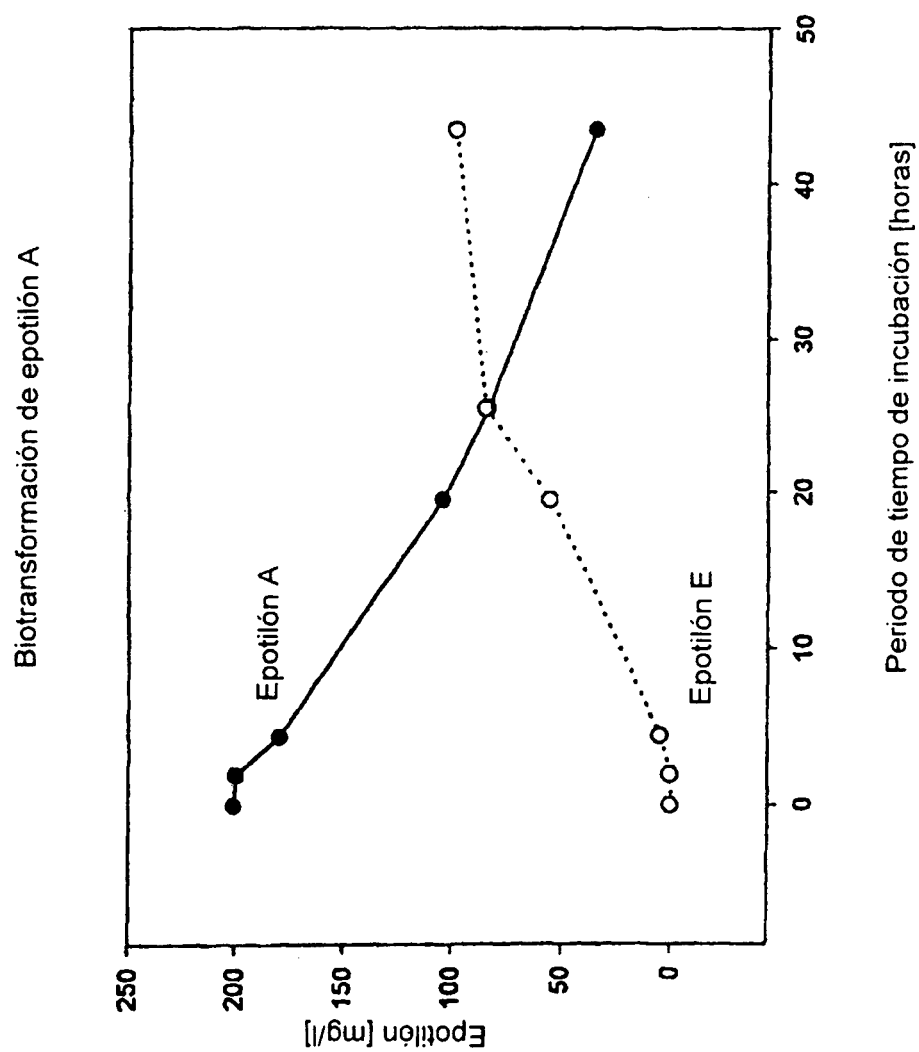


Fig. 4

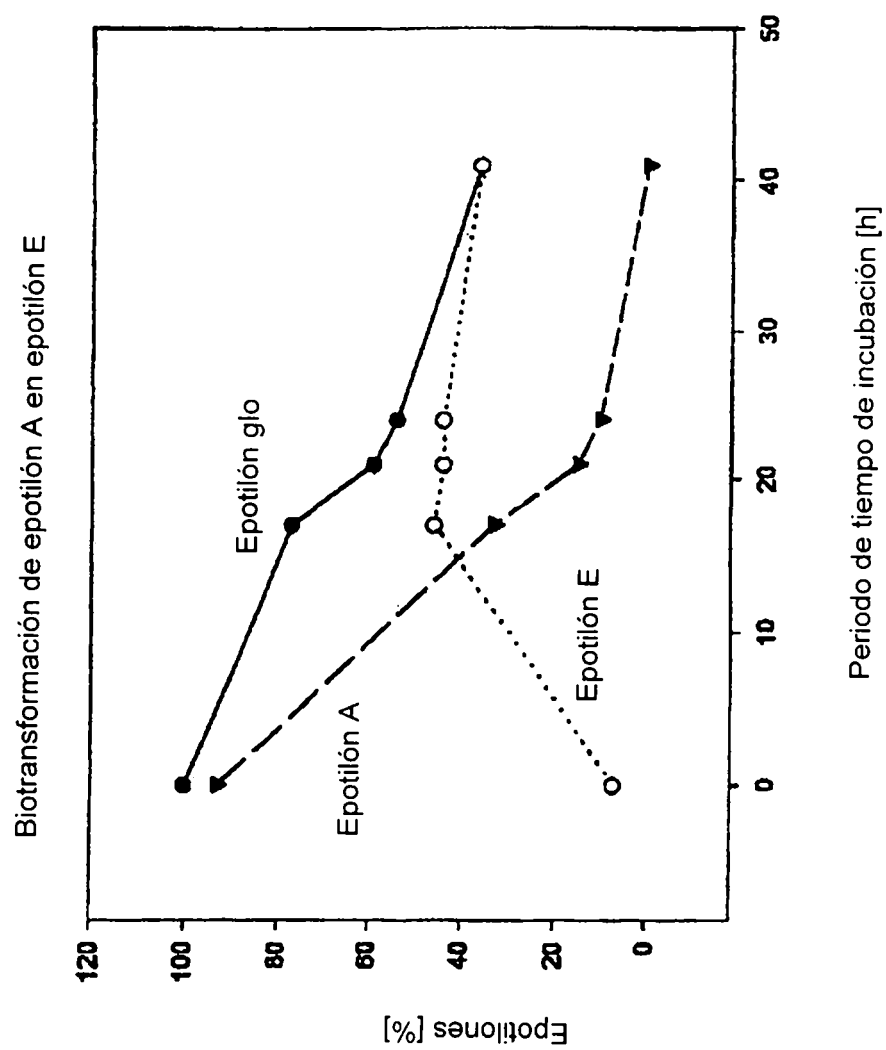


Fig. 5

