



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 441**

51 Int. Cl.:
C07K 5/097 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04743045 .9**
86 Fecha de presentación : **23.06.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1644403**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Depsipéptidos citotóxicos.**

30 Prioridad: **24.06.2003 GB 0314726**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **Instituto Biomar S.A.**
Polígono Industrial La Mina
Avda. de los Reyes, 1
28770 Colmenar Viejo, Madrid, ES

72 Inventor/es: **Romero, Paco;**
Malet, Leyre;
Canedo, Librada, María;
Cuevas, Carmen y
Fernando Reyes, José

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 297 441 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

Depsipéptidos citotóxicos.

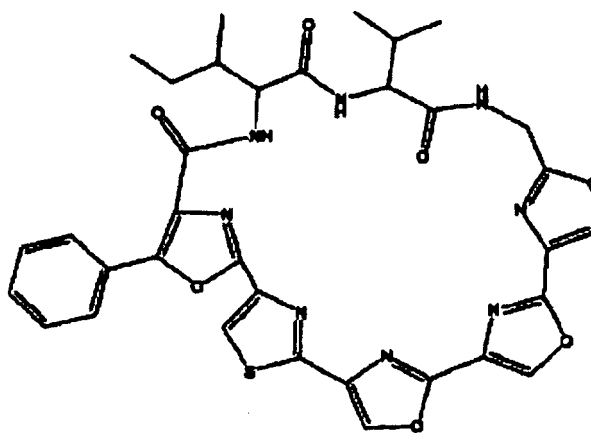
5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de depsipéptidos, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso con agentes antitumorales.

10 **Antecedentes de la invención**

Se han dado a conocer varios péptidos cíclicos obtenidos a partir de organismos marinos (véase por ejemplo Rudi A. *et al.*, J. Nat. Prod., 2003, 66, 575-577: "Didmolamide A and B, two new cyclic hexapeptides from the marine Ascidian *Didemnum molle*").

15 El documento JP 11180997 da a conocer un compuesto antitumoral de fórmula

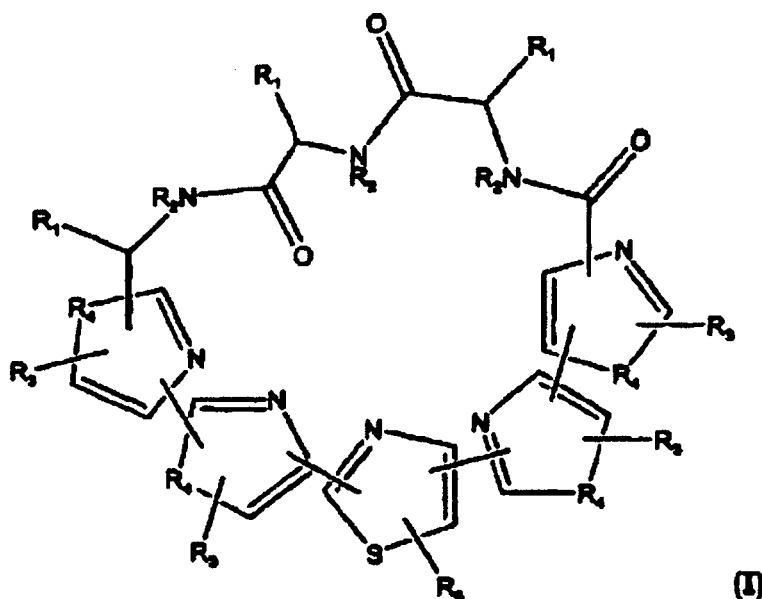


35 que se obtiene a partir de *Streptomyces nobilis*. Su CI_{50} en células Hela S3 es de 14 nM.

El cáncer es una causa principal de muerte en animales y seres humanos. Se han dedicado y todavía se están dedicando esfuerzos con el fin de obtener un agente antitumoral activo y seguro para administrarse a pacientes que padecen un cáncer. El problema que va a resolverse mediante la presente invención es proporcionar compuestos que son útiles en el tratamiento del cáncer.

40 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general I o sales o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos:



en la que

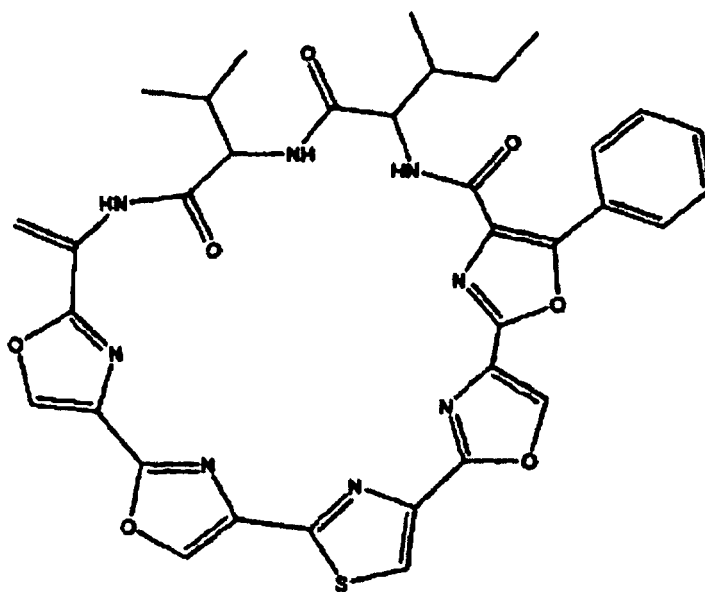
los grupos R_1 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, ciano, hidroxilo, nitro, azido, alquilo sustituido o no sustituido, alquilideno sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido;

los grupos R_3 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, ciano, hidroxilo, nitro, azido, alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido;

los grupos R_4 se seleccionan cada uno independientemente de NR_2 , O y S; y

los grupos R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido.

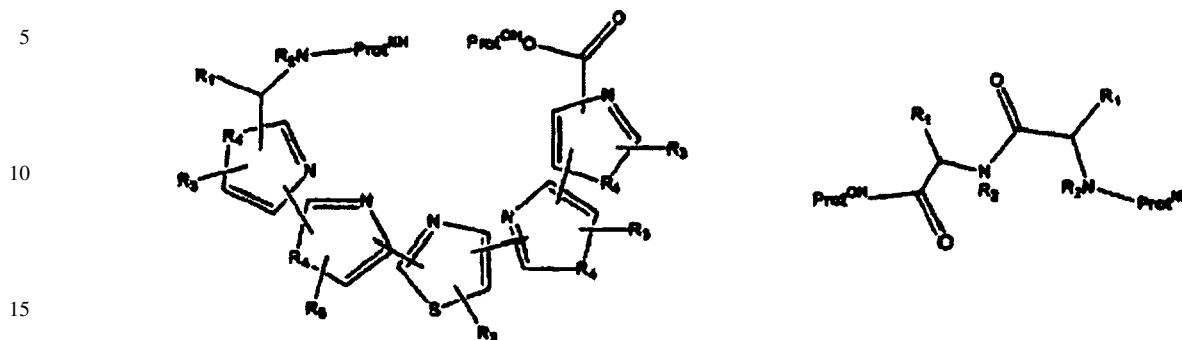
La presente invención también se refiere a la obtención de los compuestos de fórmula I, incluyendo el compuesto denominado IB-01211 que es de fórmula:



IB-01211 puede obtenerse a partir de una cepa de microorganismo que puede producirlo. El procedimiento preferido comprende las etapas de cultivar una cepa de microorganismos que pueden producir IB-01211 en un medio nutritivo acuoso con sales y fuentes asimilables de carbono y nitrógeno, en condiciones aerobias sumergidas controladas, y después recuperar y purificar el compuesto a partir del caldo de cultivo.

Otros compuestos de esta invención pueden derivarse de IB-01211, o pueden prepararse mediante síntesis. Por tanto, el fragmento de oxazol/tiazol/imidazol de los compuestos de la presente invención puede sintetizarse usando las enseñanzas de la siguiente bibliografía: Panek J. S. *et al.* "Studies directed toward the synthesis of Ulapualide A. Asymmetric Synthesis of the C8-C25 tris-oxazole fragment" *J. Org. Chem.* 1996, 61, 6496-6497; Panek J. S. *et al.* "Studies directed toward the total synthesis of kabiramide C: asymmetric synthesis of the C7-C19 fragment" *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 6143-6146; Panek J. S. *et al.* "Synthesis of the fully functionalized tris-oxazole fragment found in metabolites derived from marine organisms" *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 5445-5448; Pattenden G. "Synthetic studies with natural oxazoles and thiazoles" *J. Heterocyclic Chem.* 1992, 29, 607-618; Pattenden G. *et al.* "Synthesis of the tris-oxazole ring system of ulapualides" *Synlett.* 1990, 36-37; Kiso Y. *et al.* "Convergent synthesis of (-)-mirabazole C using a chloroimidazolium coupling reagent, CIP" *J. Org. Chem.* 1996, 61, 3350-3357; Wipf P. *et al.* "Total synthesis of (-)-thiangazole and structurally related polyazoles" *J. Org. Chem.* 1995, 60, 7224-7229; Wipf P. *et al.* "A new synthesis of highly functionalised oxazoles" *J. Org. Chem.* 1993, 58, 3604-3606. Una vez que se sintetiza el fragmento de oxazol/tiazol/imidazol, se introduce el fragmento de aminoácidos usando métodos convencionales de síntesis de péptidos ya conocidos por el experto en la técnica.

Por tanto, los compuestos de fórmula I incluyendo IB-01211 pueden prepararse mediante el acoplamiento de los siguientes componentes:



20 en los que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 son tal como se definieron, Prot^{OH} es un grupo protector opcional para hidroxilo y Prot^{NH} es un grupo protector opcional para amino. Según sea apropiado, pueden sustituirse los respectivos grupos protectores por otros grupos reactivos para fomentar el acoplamiento deseado, que normalmente tiene lugar secuencialmente, en primer lugar para unir el fragmento de oxazol/tiazol/imidazol a un extremo del fragmento de aminoácidos, y después para cerrar el anillo.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de fórmula I o sales o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En otro aspecto, la presente invención también se refiere al uso de compuestos de fórmula I o sales o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

35 Figura 1. Cromatograma de HPLC/UV y espectro de UV de IB-01211 purificado.

Figura 2. Espectro de IR de IB-01211 purificado.

Figura 3. Espectro de ^1H -RMN de IB-01211 purificado.

40 Figura 4. Espectro de ^{13}C -RMN de IB-01211 purificado.

Figura 5. Espectro DEPT de IB-01211 purificado.

45 Figura 6. Espectro COSY 45 de IB-01211 purificado.

Figura 7. Espectro HMQC de IB-01211 purificado.

Figura 8. Espectro HMBC de IB-01211 purificado.

50 Figura 9. Cromatograma de HPLC/EM y espectro de EM-ESI de IB-01211 purificado.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención se refiere a compuestos de fórmula I general tal como se definieron anteriormente.

En estos compuestos, los sustituyentes pueden seleccionarse según la siguiente orientación:

60 Los grupos alquilo y alcoxilo tienen preferiblemente desde 1 hasta 12 átomos de carbono. Una clase más preferida de grupos alquilo tiene de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, aún más preferiblemente de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono y lo más preferiblemente 1, 2, 3 ó 4 átomos de carbono. Metilo, etilo, propilo incluyendo isopropilo, y butilo incluyendo isobutilo, sec-butilo y terc-butilo son los grupos alquilo particularmente preferidos en los compuestos de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término alquilo, a menos que se modifique de otro modo, se refiere a grupos tanto cíclicos como no cíclicos, aunque los grupos cíclicos comprenderán al menos tres miembros de anillo de carbono.

65 Los grupos alquilideno pueden ser ramificados o no ramificados y tienen preferiblemente desde 1 hasta 12 átomos de carbono. Una clase más preferida de grupos alquilideno tiene desde 1 hasta aproximadamente 8 átomos de carbono,

ES 2 297 441 T3

aún más preferiblemente desde 1 hasta aproximadamente 6 átomos de carbono y lo más preferiblemente 1, 2, 3 ó 4 átomos de carbono. Metilideno, etilideno y propilideno incluyendo isopropilideno son los grupos alquilideno particularmente preferidos en los compuestos de la presente invención.

5 Los grupos alquenilo y alquinilo preferidos en los compuestos de la presente invención tienen uno o más enlaces insaturados y desde 2 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono, todavía más preferiblemente de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, incluso más preferiblemente 1, 2, 3 ó 4 átomos de carbono. Los términos alquenilo y alquinilo tal como se usan en el presente documento se refieren a grupos tanto cíclicos como no cíclicos, aunque generalmente son más preferidos los grupos no cíclicos,
10 lineales o ramificados. En un sentido general, se incluye alquilideno dentro de alquenilo siendo ambos sustituyentes con un doble enlace.

Los grupos arilo adecuados en los compuestos de la presente invención incluyen compuestos de un único anillo y múltiples anillos, incluyendo compuestos de múltiples anillos que contienen grupos arilo separados y/o condensados.
15 Los grupos arilo típicos contienen desde 1 hasta 3 anillos separados o condensados y desde 6 hasta aproximadamente 18 átomos de anillo de carbono. Los grupos arilo específicamente preferidos incluyen fenilo, naftilo, bifenilo, fenantrilo y antracilo sustituidos o no sustituidos.

Los grupos acilo adecuados incluyen grupos alcanoílo que tienen desde 2 hasta aproximadamente 12 átomos de
20 carbono, más preferiblemente desde 2 hasta aproximadamente 8 átomos de carbono, todavía más preferiblemente desde 2 hasta aproximadamente 6 átomos de carbono, incluso más preferiblemente 2 átomos de carbono. Otros grupos acilo incluyen alquenilacilo, alquililacilo, arilacilo, heterocicililacilo.

Los grupos heterocíclicos adecuados incluyen grupos heteroaromáticos y heteroalíclicos. Los grupos heteroaromáticos adecuados en los compuestos de la presente invención contienen uno, dos o tres heteroátomos seleccionados de átomos de N, O o S e incluyen, por ejemplo, cumarinilo incluyendo 8-cumarinilo, quinolinilo incluyendo 8-quinolinilo, piridilo, pirazinilo, pirimidilo, furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, oxazolilo, imidazolilo, indolilo, benzofuranilo y benzotiazol. Los grupos heteroalíclicos adecuados en los compuestos de la presente invención contienen uno, dos o tres heteroátomos seleccionado de átomos de N, O o S e incluyen, por ejemplo, grupos tetrahidrofurano, tetrahi-
30 dropirano, piperidinilo, morfolino y pirrolidinilo.

Los grupos mencionados anteriormente pueden estar sustituidos en una o más posiciones disponibles con uno o más grupos adecuados tales como OR', SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', N(R')₂, NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', CN, halógeno, C(=O)R', CO₂R', OC(=O)R', en los que cada uno de los grupos R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, halógeno, C(=O)H, C(=O)alquilo, CO₂H, alquilo C₁-C₁₈ sustituido o no sustituido, alquenilo C₂-C₁₈ sustituido o no sustituido, alquinilo C₂-C₁₈ sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido.
35

Los sustituyentes de halógeno adecuados en los compuestos de la presente invención incluyen F, Cl, Br e I.
40

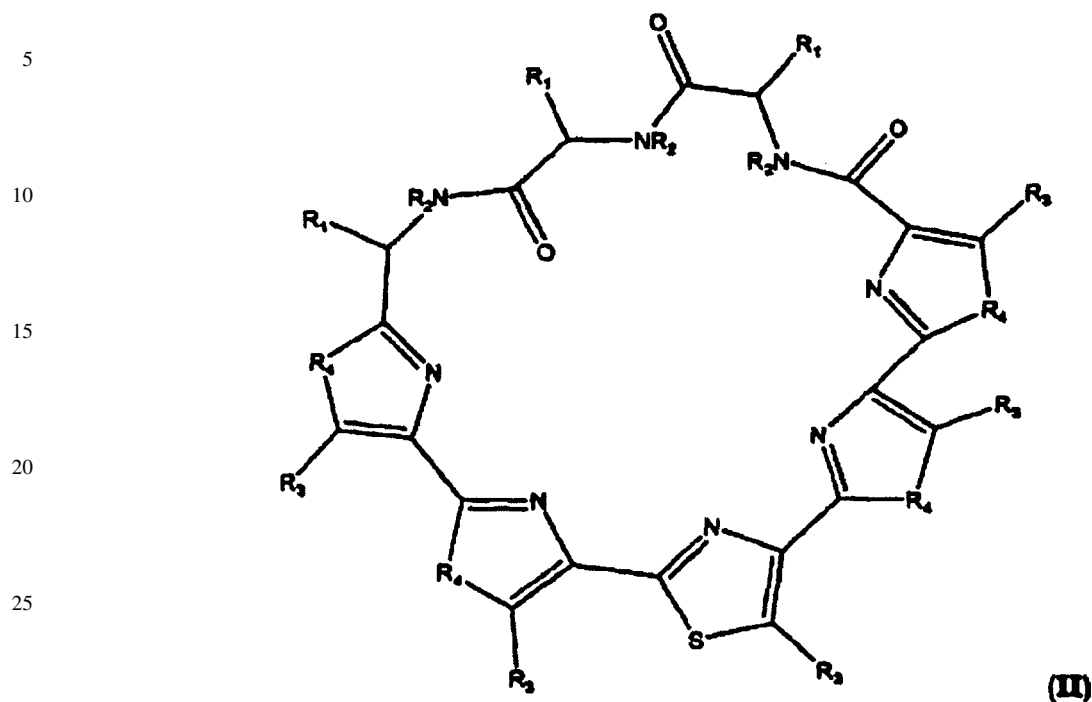
La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal, éster, solvato, hidrato o cualquier otro compuesto farmacéuticamente aceptable que con su administración al paciente puede proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, se apreciará que las sales farmacéuticamente no aceptables también caen dentro del alcance de la invención ya que éstas pueden ser útiles en la
45 preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, se sintetizan sales farmacéuticamente aceptables de compuestos proporcionados en el presente documento a partir del compuesto original que contiene un resto ácido o básico mediante métodos químicos convencionales. Generalmente tales sales se prepararan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de base o ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido o de la base apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Ejemplos de las sales de adición de álcali incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y de amonio, y sales de álcali orgánico tales como, por ejemplo, sales de etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilnetanolamina, trietanolamina y aminoácidos básicos.
55

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina o bien como compuestos libres o bien como solvatos (por ejemplo hidratos) y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación generalmente se conocen en la técnica.
60

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula I descrita anteriormente pueden incluir enantiómeros dependiendo de su asimetría o diastereoisómeros. Los isómeros individuales y las mezclas de los isómeros caen dentro del alcance de la presente invención.
65

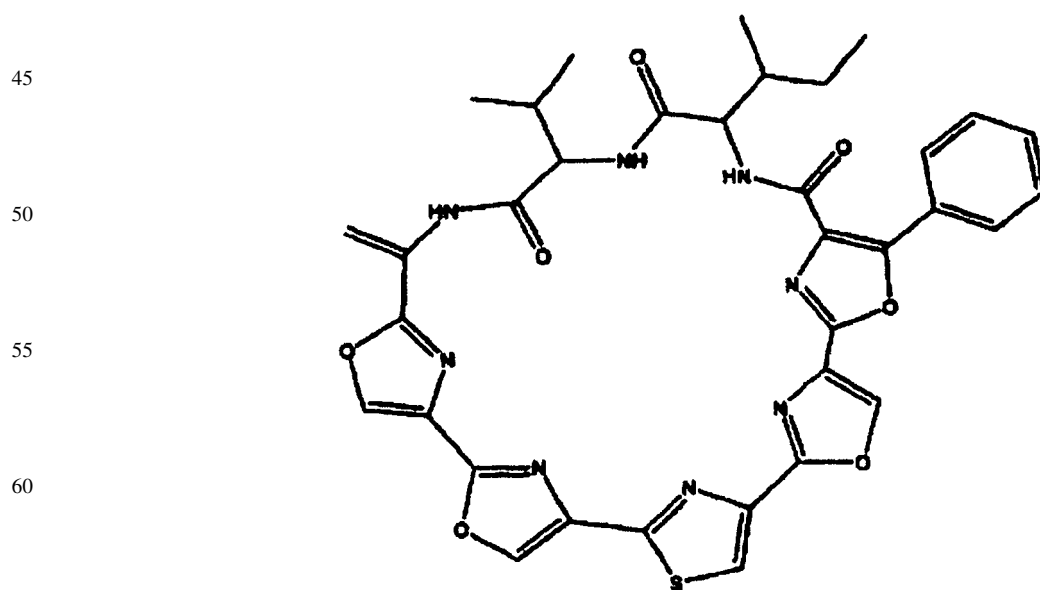
Los compuestos preferidos de la invención son aquellos de fórmula II general



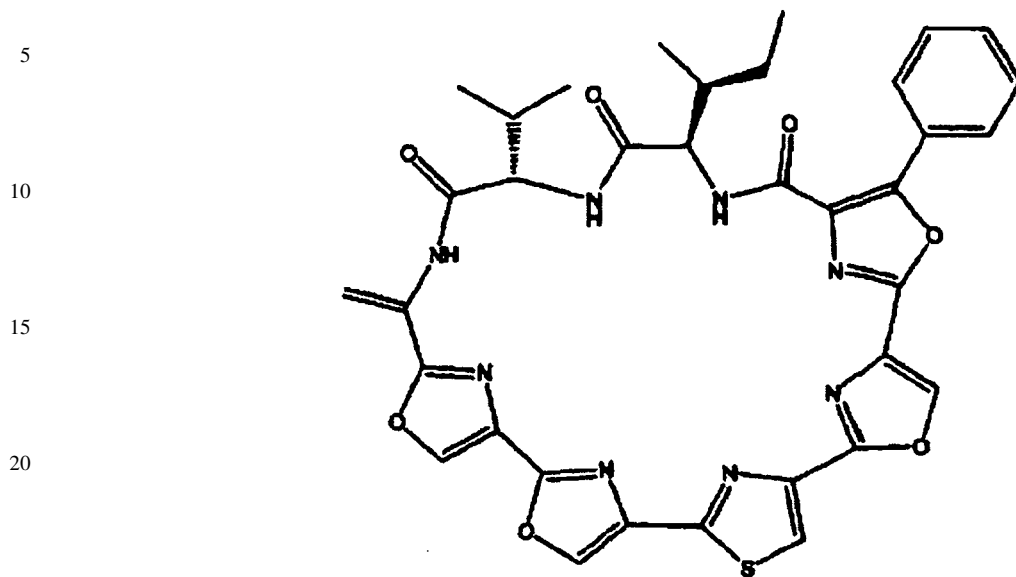
en la que los grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 tienen el mismo significado tal como se definieron anteriormente.

35 Los grupos R_1 preferidos son alquilo sustituido o no sustituido y alquilideno sustituido o no sustituido, son más preferidos alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido y alquilideno C_1 - C_6 sustituido o no sustituido, son todavía más preferidos isopropilo, sec-butilo y metileno. Los grupos R_2 preferidos son H y alquilo sustituido o no sustituido, y se prefiere más H. Los grupos R_3 preferidos son H y arilo sustituido o no sustituido, y se prefieren más H y fenilo. El grupo R_4 preferido es O.

40 Un compuesto de fórmula I particularmente preferido es el compuesto IB-01211:



La estereoquímica preferida del compuesto mencionado anteriormente es la siguiente



30 El compuesto IB-01211 se obtiene preferiblemente a partir de un actinomiceto, denominado cepa ES7-008. Se ha depositado un cultivo de esta cepa en la Colección Española de Cultivos Tipo en la Universidad de Valencia, en España, con el número de registro CECT 3358. Este depósito se ha realizado en virtud de las disposiciones del tratado de Budapest.

La cepa de microorganismo ES7-008 es filogenéticamente cercana al género *Thermoactinomyces*. El microorganismo se aisló de una esponja marina no identificada. Los métodos taxonómicos fueron tal como sigue.

35 1. Morfología colonial:

medios ISP nº 2, 4, 5 y 6: Shirling B.E., y D. Gottlieb. Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313, 1966

medio ATCC nº 172: Catálogo Americano de Cultivos Tipo 17ª edición, 1989. Rockville, Maryland. EE.UU.

40 Agar de Czapek de Difco

Agar de Bennet, Waksman, S.A The Actinomycetes vol. II:331, 1961

Todos los medios estaban complementados con un 50% de ASW.

45 2. Características fisiológicas:

medio ISP nº 1, Shirling y Gottlieb.

50 Resistencia a NaCl: ATCC 172 con 0, 2, 4, 5, 7 y 10% de NaCl.

Utilización de carbono: ISP-9, Shirling y Gottlieb.

55 3. Análisis de ácidos grasos,

Shirling B.E., y D. Gottlieb. Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313, 1966

4. Análisis de azúcar de la célula completa:

60 Guerrant G.O., y C.W. Moss. Anal. Chem. 56:633, 1984

5. Análisis de ácidos diaminopinélicos:

Hasegaw T., M. Takizawa, y S. Tanida, J. Gen. Appl. Microbiol. 29:319, 1983

65 Todos los cultivos se incubaron a 28°C y se realizaron los registros de los resultados semanalmente hasta los 21 días.

ES 2 297 441 T3

Una descripción del microorganismo es tal como sigue:

Morfología

5 Después de 21 días a 28°C, se observó crecimiento en caldo ISP2 y 172 complementado con agua de mar artificial (ASW, "artificial sea water"). No se formó micelio aéreo. Se ramificó el micelio del sustrato. Se forman esporas tanto en los medios sólidos como líquidos como endosporas.

Fisiología

10 La cepa ES7-008 no formó pigmentos difusibles, ni en medios sólidos ni líquidos. El valor óptimo de la concentración de NaCl en el medio para el crecimiento óptimo estaba en el intervalo del 4%-7%. No se produjo crecimiento a 28°C en ausencia de sal ni siquiera en composiciones de medios enriquecidos como el medio 172 de la ATCC. El intervalo de temperatura de crecimiento óptimo estaba entre 28°C-40°C.

15 La cepa ES7-008 puede utilizar glucosa, melibiosa, xilosa y etanol como fuentes de carbono. El crecimiento fue escaso en fructosa, sacarosa, ramnosa y galactosa. El microorganismo no creció en arabinosa, manosa ni mio-inositol.

Composición química

Aminoácidos

El ácido meso-2,6-diaminopimélico estaba presente en la célula hidrolizada completa de la cepa ES7-008.

Composición de ácidos grasos

25 Los ácidos grasos principales se identificaron como i-15:0, a-15:0, 15:0, i-16:0, i-17:1, i-17:0, y a-17:0. La composición de ácidos grasos de la cepa ES7-008 y otras cepas de actinomicetos se encuentra en la siguiente tabla, en la que la composición se facilita como porcentaje del contenido total en ácidos grasos total.

30

	13:0	i-14:0	14:0	i-15:0	a-15:0	15:0	i-16:1	i-16:0
ES7-008	< 1	< 1	< 1	< 1	64,2	6,29	1,36	< 1
STALBUS	< 1	6,52	< 1	9,88	22,92	< 1	5,50	25,29
SPAMETH	1,21	10,34	< 1	1,86	< 1	4,30	< 1	15,51
SPVIRIDO	< 1	4,04	1,10	18,94	2,71	4,89	< 1	26,44
AMCITRE	< 1	< 1	3,18	< 1	< 1	1,03	< 1	6,37
APBRAZIL	< 1	3,15	< 1	15,46	18,91	2,76	< 1	19,07
AMPDIGIT	< 1	11,57	< 1	11,21	9,96	< 1	2,87	34,23
AMYORIE	< 1	3,40	2,37	19,94	4,66	1,17	< 1	11,85
MNCHALC	< 1	1,68	< 1	8,91	2,29	1,53	1,15	38,23
MNECHCA	< 1	1,17	< 1	6,97	1,24	2,81	< 1	30,88
MNFUSCA	< 1	< 1	< 1	26,56	6,53	< 1	< 1	8,58
SACCAER	< 1	3,06	1,35	14,41	8,62	1,04	5,68	20,07
NOAFRI	1,51	5,43	3,35	4,62	< 1	7,46	3,09	22,18
MTSALMO	< 1	1,12	1,28	6,75	< 1	7,83	7,53	21,58
MTRUBRA	< 1	1,40	1,38	4,12	< 1	3,41	7,27	25,00
MTROSEO	2,03	3,65	5,14	3,86	< 1	9,03	3,02	12,31
AMROSEO	< 1	2,19	1,24	6,73	1,09	6,94	1,43	22,21
MTFERRU	1,03	1,91	1,19	1,94	< 1	6,43	4,12	21,50

65

ES 2 297 441 T3

	16:1	16:0	i-17:1	i-17:0	a-17:0	17:1	17:0	
5	ES7-008	4,52	< 1	< 1	14,68	4,14	1,45	< 1
	STALBUS	< 1	3,75	1,28	3,38	8,60	< 1	< 1
	SPAMETH	5,63	8,62	1,08	< 1	< 1	24,02	9,43
	SPVIRIDO	< 1	4,43	< 1	2,60	1,58	11,36	8,58
10	AMCITRE	12,62	40	< 1	< 1	< 1	< 1	1,16
	APBRAZIL	2,15	1,79	< 1	2,39	9,64	11,18	2,82
	AMPDIGIT	< 1	1,08	< 1	1,28	5,08	4,39	1,64
15	AMYORIE	5,59	18,41	< 1	2,99	4,44	3,09	2,73
	MNCHALC	< 1	1,88	1,49	2,32	2,25	5,43	6,95
	MNECHCA	< 1	2,29	1,63	4,11	1,68	12,15	4,90
20	MNFUSCA	< 1	< 1	7,30	11,89	13,25	2,90	3,37
	SACCAER	13,84	6,16	4,55	2,20	5,31	2,02	< 1
	NOAFRI	2,69	5,15	2,35	< 1	< 1	8,15	4,75
25	MTSALMO	1,21	1,97	1,01	< 1	1,07	11,58	5,53
	MTRUBRA	2,63	3,89	2,17	1,08	< 1	6,84	4,97
	MTROSEO	3,46	6,95	1,17	< 1	< 1	13,51	4,46
30	AMROSEO	2,21	3,61	2,74	1,03	< 1	10,97	4,33
	MTFERRU	2,32	2,34	< 1	< 1	< 1	23,51	5,71

35

	i-18:1	i-18:0	cis-18:1	18:0
40	ES7-008	< 1	< 1	< 1
	STALBUS	< 1	1,09	< 1
	SPAMETH	7,11	< 1	4,60
45	SPVIRIDO	7,48	< 1	< 1
	AMCITRE	< 1	< 1	14,25
	APBRAZIL	< 1	< 1	3,38
50	AMPDIGIT	< 1	1,76	7,60
	AMYORIE	< 1	< 1	6,21
	MNCHALC	14,58	1,31	1,28
55	MNECHCA	7,23	< 1	10,05
	MNFUSCA	3,59	< 1	2,33
	SACCAER	< 1	< 1	< 1
60	NOAFRI	17,03	< 1	< 1

65

ES 2 297 441 T3

MTSALMO	17,34	< 1	< 1	< 1
MTRUBRA	15,44	1,25	< 1	1,61
MTROSEO	18,67	< 1	1,77	< 1
AMROSEO	17,84	< 1	< 1	< 1
MTFERRU	12,15	1,27	1,43	< 1

5

10

ES7-008 = cepa ES25-008: AMCITRE = *Actinomadura citrea* DSM 43461; AMPDIGIT = *Ampullariella digitata* ATCC 15349; AMROSEO = *Actinomadura roseoviolacea* DSM 43144; AMYORIE = *Amycolatopsis orientalis* DSM 40040; APBRAZIL = *Actinoplanes braziliensis* ATCC 25844; MNCHALC = *Micromonospora chalcea* ATCC 31395; MNECHCA = *Micronospora echinospora calichinensis* NRRL 15839; MNFUSCA = *Micromonospora fusca* NRRL B-3298; MTFERRU = *Microtetraspora ferruginea* DSM 43553; MTROSEO = *Microtetraspora roseola* ATCC 33579; MTRUBRA = *Microtetraspora rubra* ATCC 27031; MTSALMO = *Microtetraspora salmonea* ATCC 33580; NOAFRI = *Nocardiopsis africana* DSM 43748; SACCAER = *Saccharothrix aerocolonigenes* NRRL B-3298 SPAMETH = *Streptosporangium amethystogenes* DSM 43179; SPVIRIDO = *Streptosporangium viridogriseum* ATCC 25242; STALBUS = *Streptomyces albus* DSM 40313

15

20

Azúcar

El patrón de azúcares de la célula completa no mostró un perfil específico.

25

Análisis filogenético

Se realizó la secuencia parcial del ADNr 16S siguiendo procedimientos convencionales. Se extrajo el ADN del microorganismo tras la homogeneización con nitrógeno líquido. Se amplificó el gen del ADNr 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores eubacterianos 27f y 1492r. Se obtuvieron las secuencias parciales usando los cebadores 357r, 926r y 1492r. Todos los cebadores usados en este trabajo se describieron por Lane, D.J. Nucleic acid techniques in bacterial systematics: 115, 1991. La secuencia parcial obtenida era:

30

35

(Secuencia pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

GCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTGCCTGCAAGATCGGGATA
 ACCCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGAATAATCTTTATCCTCGCATGGG
 5 GAGGAAGTAAAGAAGGTTTCGGCCCTTCACTTGACAGATGGGCCCGCGG
 CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAGAGGCTNACCAAGGCGACGATGCGTA
 GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 10 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGCAATGGGCGAAAG
 CCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAGGACGGTTTTTCGGATTGTAAA
 15 GCTCTGTCTTTTCGGAAGAAGCAAGGAGAGGAAATGCTCCTTGTGTG
 ACGGTACGAAAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGGGGCAAGCCTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
 20 GCGCAGGCGGCCTGTTAAGTCGGATGTGAAAGGCCACGGCTCAACCGT
 GGAGCGGCATCCGAAACTGGCGGGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
 AATCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAG
 25 TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGC
 GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCGTAAACGA
 30 TGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTGTCATGCCCTCTGTGCCGAAGGAAACCC
 AATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAA
 35 GCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCTTCTGATCGCTTGAG
 AGATCAAGCTTCTCTTCGGAGCAGAAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTC
 40 GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
 CCTTATGGTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAACGAGACAGCC
 GGTGAAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 45 ATGTCCTGGGCCACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAACGGGTAGCGA
 AGCTGCGAAGTGTAGCCAATCCCAAAAACCAGTCTCAGTTCGGATCGT
 AGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
 50 AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CACCACGAGAGTTTGCA

55 Se comparó esta secuencia con el depósito del Gene Bank usando el algoritmo Blastn. Se realizaron los estudios
 filogenéticos usando el paquete Phylip desarrollado por Felsenstein, J. *Cladistics* 5:164, 1989. Se construyó un árbol
 filogenético consenso tras el análisis de *Bootstrap* (muestreo al azar con remplazamiento) de la muestra. La cepa ES7-
 008 se agrupó con el grupo *Thermoactinomyces*. Un rasgo de diferenciación de la cepa ES7-008 con *Thermoactinomy-*
 60 *ces* es la ausencia de micelio aéreo y la necesidad de sal para el crecimiento.

Fermentación

65 ES7-008 produce el compuesto IB-01211 cuando se cultiva en condiciones controladas en un medio adecuado.
 Esta cepa se hace crecer preferiblemente en un medio nutritivo acuoso, en condiciones aerobias y mesófilas, preferi-
 blemente a 28°C-40°C y a un pH que oscila entre 6,0 y 8,0. Puede usarse una amplia variedad de medios de cultivo
 líquidos para el cultivo del microorganismo. Los medios útiles son aquellos que incluyen una fuente de carbono asi-

ES 2 297 441 T3

5 milable, tal como almidón, dextrina, melaza de azúcar, glucosa, una fuente de nitrógeno asimilable tal como proteína, proteína hidrolizada, harinas desgrasadas, macerado de maíz, y cationes y aniones inorgánicos útiles tales como sodio, magnesio, potasio, amonio, sulfato, cloruro, fosfato, carbonato. Pueden añadirse también oligoelementos. La aireación se logra preferiblemente suministrando aire al medio de fermentación. La agitación se facilita mediante un impulsor mecánico. Se ha encontrado que los tanques de fermentación convencionales son muy adecuados para llevar a cabo el cultivo de este microorganismo. Puede necesitarse la adición de nutrientes y el control de pH así como agentes antiespumantes durante las diferentes fases de fermentación para aumentar la producción y evitar la formación de espuma.

10 El compuesto IB-01211 puede producirse partiendo de un micelio liofilizado congelado de ES7-008. Se obtiene una masa micelial cultivando las células iniciales en matraces de agitación con un medio de cultivo que contiene algunos de los componentes descritos anteriormente a temperaturas mesófilas y en condiciones aerobias. Esta etapa puede repetirse varias veces según se necesite y el material recogido se usará como inóculo para sembrar uno o varios tanques de fermentación con el medio de cultivo apropiado. Si se desea, estos tanques pueden usarse para desarrollar el inóculo o para la fase de producción, dependiendo del volumen de caldo que se necesite. Algunas veces, el medio de producción puede ser diferente de los usados para el desarrollo del inóculo. Se dan a conocer medios típicos que pueden usarse para el desarrollo del inóculo y para la producción de IB-01211 están en la siguiente tabla.

Medio de inóculo		Medio de producción	
Harina de soja	5 g	Levadura	5 g
Glucosa	1 g	Peptona	1 g
Almidón	24 g	Harina de soja	3 g
Extracto de carne de bovino	3 g	Harina gruesa de soja	15g
Extracto de levadura	5 g	Extracto de levadura	5g
Triptona	5 g	Triptona	2 g
CaCO ₃	4 g	CaCO ₃	4 g
NaCl	5 g	NaCl	4 g
Na ₂ SO ₄	7 g	Na ₂ SO ₄	1 g
KCl	0,2 g	KCl	0,5 g
MgCl ₂	2 g	MgCl ₂	2 g
H ₂ O	Hasta 1 litro	K ₂ HPO ₄	0,5 g
		H ₂ O	Hasta 1 litro

60 La producción de IB-01211 puede monitorizarse mediante el ensayo de caldo completo frente a P-388 de leucemia murina o mediante HPLC.

65 El compuesto IB-01211 puede aislarse de la torta micelial mediante extracción con una mezcla adecuada de disolventes tales como CHCl₃:CH₃OH:H₂O. La actividad se concentra en la fase inferior. Pueden combinarse los extractos de dos extracciones repetidas y evaporarse hasta sequedad a vacío.

Pueden realizarse la separación y la purificación de IB-01211 del extracto activo bruto usando la combinación apropiada de técnicas cromatográficas convencionales.

ES 2 297 441 T3

Puede estar guiado el fraccionamiento por la actividad antitumoral de las fracciones, mediante CCF visualizada con vainillina en H₂SO₄ concentrado o mediante HPLC analítica con detector EM y red de fotodiodos. El análisis de HPLC se realiza a temperatura ambiente usando una columna analítica Symmetry C18 (5 μ) y una fase móvil MeOH:H₂O:HOAc 95:5:1 con una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. y se representa gráficamente a 260 nm. En estas condiciones, el tiempo de retención de IB-01211 es de 5,1 min. tal como se muestra en la figura 9.

Una característica importante de los compuestos descritos anteriormente es su bioactividad y, en particular, su actividad citotóxica. Con esta invención se proporcionan composiciones farmacéuticas novedosas de estos compuestos que tienen actividad citotóxica, y su uso como agentes antitumorales. Así, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de esta invención o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición adecuada sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para la administración oral, tópica o parenteral.

Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la invención pueden administrarse mediante encapsulación en nanoesferas o liposomas, en formulaciones de liberación sostenida o mediante otro medio de administración convencional.

La administración de los compuestos o las composiciones de la presente invención puede ser mediante cualquier método adecuado, tal como la infusión intravenosa, preparaciones orales, administración intraperitoneal e intravenosa. Se prefiere usar tiempos de infusión de hasta 24 horas, más preferiblemente de 1-12 horas, siendo lo más preferido de 2-6 horas. Son especialmente deseables los tiempos de infusión cortos que permiten llevar a cabo el tratamiento sin permanecer durante la noche en el hospital. Sin embargo, la infusión puede ser de 12 a 24 horas incluso más larga si se requiere. La infusión puede llevarse a cabo en intervalos adecuados de, digamos, 1 a 4 semanas.

La dosificación correcta de los compuestos variará según la formulación particular, el modo de aplicación y el tumor, huésped y sitio particulares que se están tratando. Se tendrán en cuenta otros factores como la edad, peso corporal, sexo, dieta, momento de administración, tasa de excreción, estado del huésped, combinaciones de fármacos, sensibilidades a experimentar una reacción y gravedad de la enfermedad. La administración puede llevarse a cabo continua o periódicamente dentro de la dosis máxima tolerada.

Pueden usarse los compuestos y las composiciones de la invención con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o proporcionarse como una composición separada para la administración al mismo tiempo o en distinto momento.

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

Producción de IB-01211

Desarrollo del inóculo: se usa un cultivo congelado de ES7-008 o un cultivo inclinado que se ha hecho crecer bien (5% en volumen) para sembrar 100 ml de un medio de siembra, tal como se describe en la tabla 1, que está contenido en un matraz de agitación de 250 ml. Se incuba el matraz durante 48 h. Se siembra un matraz Erlenmeyer de 2 l con 500 ml del mismo medio con el 10% en volumen del inóculo en primera fase. Se incuba el matraz durante 48 h.

Etapas de fermentación: se siembran 50 l de medio de producción, tal como se describió en la tabla 1, contenido en un tanque de fermentación de 75 l con 2,5 l de inóculo en segunda fase. Se lleva a cabo la fermentación durante 96 h con agitación a 400 rpm y un flujo de aire de 0,5 V/V.M.

Ejemplo 2

Aislamiento de IB-01211

Se filtraron 8,5 litros del caldo recogido completo para separar la biomasa y otros sólidos. Se extrajo la torta micelial dos veces con una mezcla de disolventes (2,4 l) de CHCl₃:CH₃OH:H₂O (2:1:1). Se concentró la actividad en la fase inferior. Se concentró el disolvente orgánico y se evaporó hasta sequedad a vacío para dar 4,8 g de extracto bruto.

Se aplicó el extracto a un sistema VFC (cromatografía ultrarrápida a vacío) de gel de sílice, usando una mezcla de n-hexano-EtOAc y EtOAc-MeOH como disolventes de elución. Se eluyeron las fracciones con actividad antitumoral, que contenían IB-01211 (900 mg), con EtOAc-MeOH 1:1, EtOAc-MeOH 1:3 y metanol. Se cromatografiaron dos veces las fracciones activas con una columna de gel de sílice usando mezclas de CHCl₃-MeOH y EtOAc-MeOH como

ES 2 297 441 T3

disolventes de elución. Se detectó actividad citotóxica en fracciones eluidas con CHCl_3 -MeOH 96:4 en la primera cromatografía (200 mg de compuesto IB-01211 puro) y en fracciones eluidas con EtOAc-MeOH 85:15-8:2 en la segunda cromatografía (60 mg de compuesto IB-01211 puro). La purificación adicional con cromatografía en fase inversa de C18 produjo 22 mg de compuesto IB-01211 puro eluido con MeOH.

Basándose en el análisis detallado de sus diversas características espectrales, el compuesto puro se identificó como IB-01211. El espectro de UV muestra absorción a 225 nm, 265 nm y 290 nm tal como se notifica en la figura 1. El espectro de absorción infrarroja se muestra en la figura 2 de los dibujos adjuntos. Los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y DEPT de IB-01211 se notifican en la figura 3, figura 4 y figura 5, respectivamente. Los experimentos de RMN bidimensional COSY, HMQC y HMBC se notifican en la figura 6, figura 7 y figura 8, respectivamente. El espectro de ES-EM de IB-01211 presenta un pico (M+Na) a 731 tal como se notifica en la figura 9. Los datos de ^1H y ^{13}C -RMN del compuesto IB-01211 se resumen en la siguiente tabla.

Posición	^{13}C (δ)	^1H (δ)
Isoleucina		
NH		8,46 (d, 10,6)
αCH	57,3	4,99 (dd, 10,5, 4,4)
βCH	37,8	2,23 (m)
γCH_2	26,6	1,41 (q, 7,5) 1,20 (m)
γCH_3	14,9	1,05 (d, 6,9)
δCH_3	11,9	0,87 (t, 7,2)
CO	173,3	
Valina		
NH		7,37 (d, 5,4)
αCH	63,6	4,06 (dd, 8,7, 5,6)
βCH	30,2	2,21 (m)
γCH_3	19,5	0,95 (d, 6,8)
γCH_3	20,0	0,99 (d, 6,8)
CO	171,2	

ES 2 297 441 T3

	Oxazol (1)		
5	NH		8,28 (sa)
	α C	127,5	
	β CH ₂	106,8	6,50 (s)
10			5,88 (s)
	2-C	159,9	
	4-C	130,3	
15	5-CH	139,1	8,2 (s)
	Oxazol (2)		
20	2-C	156,1	
	4-C	136,4	
25	5-CH	136,9	8,16 (s)
	Tiazol		
30	2-C	157,8	
	4-C	142,2	
35	5-CH	119,1	7,90 (s)
	Oxazol (3)		
40	2-C	158,6	
	4-C	130,6	
45	5-CH	137,4	8,27 (s)
	Oxazol (4)		
	2-C	152,0	
50	4-C	129,8	
	5-C	153,6	
	1'-C	126,8	
55	2',6'-CH	128,3	8,42 (dd, 7,0, 1,2)
	3',5'-CH	128,8	7,49 (m)
60	4'-CH	130,7	7,47 (m)
	CO	161,2	

65

ES 2 297 441 T3

Ejemplo 3

Actividad biológica in vitro

5 *Bioensayos para la selección antitumoral*

La finalidad de estos ensayos es interrumpir el crecimiento de un cultivo de células tumorales “*in vitro*” por medio de una exposición continua de las células a la muestra que va someterse a prueba. Se usaron las siguientes líneas celulares humanas:

10

Líneas celulares

Nombre	N° ATCC	Tejido	Características
15 K-562	CCL-243	Leucemia	Eritroleucemia (derrame pleural)
20 A-549	CCL-185	Pulmón	Carcinoma de pulmón “NSCL”
SK-MEL-28	HTB-72	Melanoma	Melanoma maligno
25 HT-29	HTB-38	Colon	Adenocarcinoma de colon
DU-145	HTB-81	Próstata	Carcinoma de próstata, sin receptores de andrógenos
30 LNCaP	CRL-1740	Próstata	Adenocarcinoma de próstata, con receptores de andrógenos
35 PC-3	CRL-1435	Próstata	Adenocarcinoma de próstata
40 BT-474	HTB-20	Mama	Adenocarcinoma de mama
MX-1		Mama	Adenocarcinoma de mama
45 Hs746t	HTB-135	Gástrico	Carcinoma de estómago
SK-HEP-1	HTB-52	hígado	Adenocarcinoma de hígado
SK-OV-3	HTB-77	Ovario	Adenocarcinoma de ovario (ascitis maligna)
50 PANC-1	CRL-1469	Páncreas	Carcinoma epiteloide pancreático
55 5637	HTB-9	Vejiga	Carcinoma de vejiga

60

65

ES 2 297 441 T3

5	FADU	HTB-43	Faringe	Carcinoma de células escamosas
	786-O	CRL-1932	Renal	Adenocarcinoma de células renales primarias
10	NCI-H187		SCL	
	Y-79	HTB-18	Retinoblastoma	Retinoblastoma
15	SW694	HTB-91	Fibrosarcoma	Fibrosarcoma
	CHSA		Condrosarcoma	Condrosarcoma
20	OSA-FH		Osteosarcoma	Osteosarcoma
	SK-N-MC	HTB-10	Neuroblastoma	Neuroepitelioma
	TT	CRL-1803	Tiroides	Carcinoma medular de la tiroides
25	SW-579	HTB-107	Tiroides	Carcinoma de la tiroides
	HL-60	CCL-240	Promielocítico	Leucemia
30	H9	HTB-176	Linfoma	Linfoma de células T
	MC116	CRL-1649	Linfoma	Linfoma

35

Inhibición del crecimiento celular mediante recuento de células

40 El ensayo con tetrazolio MTS se basa en la reducción metabólica de MTS para dar cristales de formazano solubilizados por las mitocondrias metabólicamente activas de las células vivas. Por este motivo, la metodología incluye el recuento de las líneas celulares basado en tinción de viabilidad para garantizar que se corrijan las concentraciones celulares para permitir que haya un 100% de células vivas en cada pocillo, en lugar del recuento con Coulter o diluciones estimadas basadas en curvas de crecimiento patrón.

45 Se eliminó el medio que contenía al fármaco al final del tratamiento y se aclararon las placas de cultivo una vez con PBS. Después, se incubaron las células en 200 μ l de medio libre de fármaco hasta las 72 horas. Tras el tiempo de incubación apropiado, se añadieron 25 μ l de disolución de PMS+MTS a cada pocillo de microtitulación y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Después se retiraron las placas de la incubadora y se colocaron en un agitador de placas durante 5 minutos (cubiertas para protegerlas de la luz). Se leyeron las densidades ópticas a 490 nm en un lector de placas de un espectrofotómetro. Se analizaron los datos usando Softmax.

50 Se presentan los datos como las potencias de CI_{50} calculadas a partir de las curvas de regresión polinómica de 3^{er} orden usando Microsoft Excel y después se interpolan manualmente.

55 La siguiente tabla ilustra los datos de la actividad biológica de los compuestos de la presente invención.

60

65

ES 2 297 441 T3

Actividad citotóxica (mol/l) de IB-01211

5	Vejiga	5637	3,39E-7
	Mama	BT-474	5,37E-7
	Mama	MX-1	8,62E-7
10	Colon	HT-29	8,17E-7
	Gástrico	Hs746t	6,92E-7
	hígado	SK-HEP-1	6,64E-7
15	NSCL	A549	9,18E-7
	Ovario	SK-OV-3	9,46E-7
	Páncreas	PANC-1	4,24E-7
20	Faringe	FADU	6,64E-7
	Renal	786-O	6,92E-7
	Próstata	PC-3	6,21 E-7
25	Próstata	DU-145	4,8E-7
	Próstata	LNCAP	6,5E-7
30	SLC	NCI-H187	2,97E-8
	Retinoblastoma	Y-79	9,32E-8
	Melanoma	Mel-28	5,08E-7
35	Fibrosarcoma	SW 694	7,2E-7
	Condrosarcoma	CHSA	3,53E-7
40	Leucemia/Linfoma	HL-60	1,41E-7
	Leucemia/Linfoma	K562	6,36E-7
	Leucemia/Linfoma	H9	1,84E-7
45	Leucemia/Linfoma	MC116	3,39E-6
	Osteosarcoma	OSA-FH	7,2E-7
	Neuroblastoma	SK-N-MC	5,37E-7
50	Tiroides	TT	4,38E-6
	Tiroides	SW-579	4,52E-7

55

Ejemplo 4

Actividad biológica in vivo

60

Análisis in vivo de IB-01211 en xenoinjertos de tumor de pulmón de células no pequeñas, de colon y mama humanos

Implantación del tumor

65

En momentos diferentes, se implantaron tres líneas de células tumorales humanas MX-1 (mama), HT-29 (colon) y LX-1 (pulmón de células no pequeñas), respectivamente, de manera subcutánea en grupos separados de ratones atímicos hembras receptoras como un pequeño germen de aproximadamente 2-3 mm³. Entonces se dejó crecer cada

ES 2 297 441 T3

tipo tumoral dentro del animal para alcanzar un tamaño medio de grupo de $100 \pm 15 \text{ mm}^3$, momento en el que se aleatorizaron los ratones que portaban el tumor en grupos (día de estadificación). El día de estadificación también coincidió con el día 0 para la dosificación del fármaco.

5 Frecuencia y vía de administración del artículo de prueba

Se administró el artículo de prueba como una única inyección en bolo intravenoso (i.v.) (es decir, QDx1) en el día de estadificación (día 0).

10 Mediciones tumorales

Se determinó la carga tumoral para todos los animales durante todo el estudio usando un calibrador, y la frecuencia era al menos dos veces por semana.

15 Análisis de los datos

Los protocolos y criterios para determinar la actividad del fármaco se derivaron de aquellos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer para sistemas tumorales similares a los usados en estos estudios (n° de publicación NIH 84-2635, *In vivo* cancer models 1976-1982). Se realizó el análisis estadístico de los volúmenes tumorales para cada grupo de animales tratados con fármaco según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney basándose en las comparaciones con la cohorte control de vehículo dentro del mismo experimento.

Se midieron las longitudes (L) y anchuras (W) tumorales en milímetros (mm) usando calibradores, se registraron y se calculó el volumen tumoral mediante la fórmula: $\text{Volumen (mm}^3) = L \times W^2 \times 0,5$. Se determinaron los valores individuales para cada ratón atómico que portaba tumor y día específico de medición (día D). En el día de estadificación tumoral (día 0) se restó el volumen tumoral de una animal tratado (T_{01}) del volumen tumoral correspondiente en cada día de observación (T_{D1}). Esto proporcionó el cambio (Δ) en el volumen tumoral para dicho ratón atómico tratado ($\Delta T1 = T_{D1} - T_{01}$). Se calculó el cambio en los volúmenes tumorales para cada miembro de la cohorte control (ΔC) de un modo similar al anterior.

Los resultados de cada xenoinjerto de tumor se tabulan a continuación. En la aleatorización (día 0), el volumen promedio de la masa tumoral era de $100 \pm 15 \text{ mm}^3$ y el "crecimiento tumoral neto" es realmente una diferencia entre el tamaño del tumor en el día X y el del día 0. El parámetro EEM se usa comúnmente en estadística y representa el error estándar de la media en una distribución de N (tamaño) valores experimentales.

Cinética del crecimiento tumoral neto tras la administración *in vivo* de IB01211 en xenoinjertos de tumor de mama humano (línea celular MX-1)

ARTÍCULO DE PRUEBA	DOSIS ÚNICA (mg/kg)	DÍA 3		DÍA 6		DÍA 10	
		Crecimiento tumoral neto \pm EEM, (mm ³)	Valor de P*	Crecimiento tumoral neto \pm EEM, (mm ³)	Valor de P*	Crecimiento tumoral neto \pm EEM, (mm ³)	Valor de P*
Control de vehículo	-	124 \pm 30	-	252 \pm 20	-	780 \pm 129	-
IB-01211	1,0	5 \pm 3	0,0952 [§]	113 \pm 62	0,0952 [§]	450 \pm 137	0,3810
	1,5	†	-	†	-	†	-

* $P > 0,05$, estadísticamente significativo (según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney: grupo dado comparado con la cohorte control de vehículo).

§ $P > 0,05$ pero $< 0,096$ tendencia a significación estadística.

† La alta mortalidad impidió un análisis estadístico significativo.

ES 2 297 441 T3

Cinética del crecimiento tumoral neto tras la administración in vivo de IB01211 en xenoinjertos de tumor de colon humano (línea celular HT-29)

ARTÍCULO DE PRUEBA	ÚNICA DOSIS (mg/kg)	DÍA 1		DÍA 4		DÍA 8	
		Crecimiento tumoral neto ± EEM (mm ³)	Valor de P*	Crecimiento tumoral neto ± EEM (mm ³)	Valor de P*	Crecimiento tumoral neto ± EEM (mm ³)	Valor de P*
Control de vehículo	-	7 ± 10	-	46 ± 14	-	126 ± 32	-
IB01211	0,5	26 ± 11	0,3095	53 ± 28	0,6905	162 ± 34	0,8413

* P > 0,05, estadísticamente significativo (según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney: grupo dado comparado con la cohorte control de vehículo).

N.T., no sometido a prueba.

Cinética del crecimiento tumoral neto tras la administración in vivo de IB01211 en xenoinjertos de tumor de pulmón de células no pequeñas humano (línea celular LX-1)

ARTÍCULO DE PRUEBA	ÚNICA DOSIS (mg/kg)	DÍA 3		DÍA 6		DÍA 10	
		Crecimiento tumoral neto ± EEM (mm ³)	Valor de P*	Crecimiento tumoral neto ± EEM (mm ³)	Valor de P*	Crecimiento tumoral neto ± EEM (mm ³)	Valor de P*
Control de vehículo	-	166 ± 30	-	307 ± 85	-	467 ± 77	-
IB01211	1,0	68 ± 29	0,0556 [§]	234 ± 11	0,6905	561 ± 60	0,2222
	1,5	11 ± 19	0,0079*	121 ± 51	0,0556 [§]	309 ± 71	0,2222

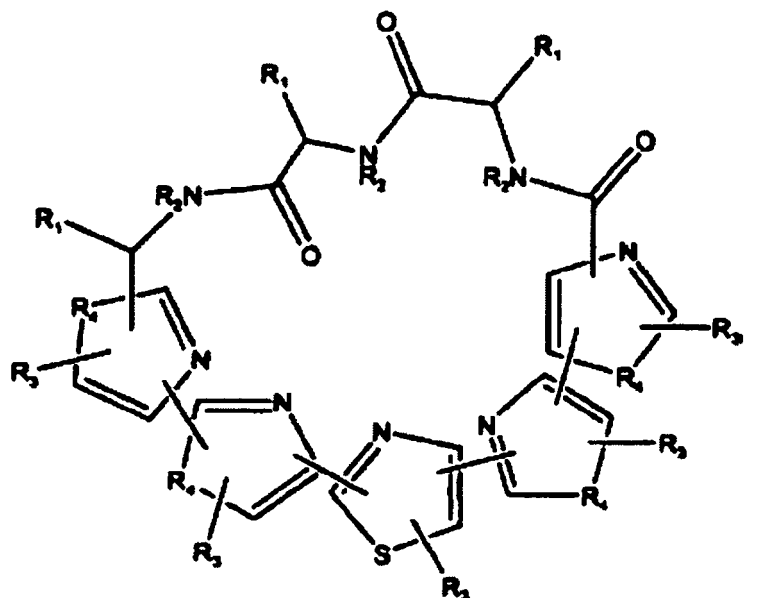
* P > 0,05, estadísticamente significativo (según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney: grupo dado comparado con la cohorte control de vehículo).

[§] P > 0,05 pero < 0,06 tendencia a la significación estadística.

En conclusión, el compuesto IB01211, con una dosis máxima tolerada (DMT) correspondiente de 3,5 mg/kg en ratones CD-1 convencionales, demostró un efecto antitumoral significativo *in vivo* frente a un tumor de pulmón de células no pequeñas humano a una dosis de 0,43 DMT, y mostró una tendencia a la significación frente a un tumor de mama a una dosis de 0,29 DMT, pero frente a un tumor de colon a una dosis de 0,14 DMT.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I general:



(I)

35 en la que

40 R_1 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, ciano, hidroxilo, nitro, azido, alquilo sustituido o no sustituido, alquileno sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, alquino sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido;

45 los grupos R_3 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, ciano, hidroxilo, nitro, azido, alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, alquino sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido;

los grupos R_4 se seleccionan cada uno independientemente de NR_2 , O y S; y

50 los grupos R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido,

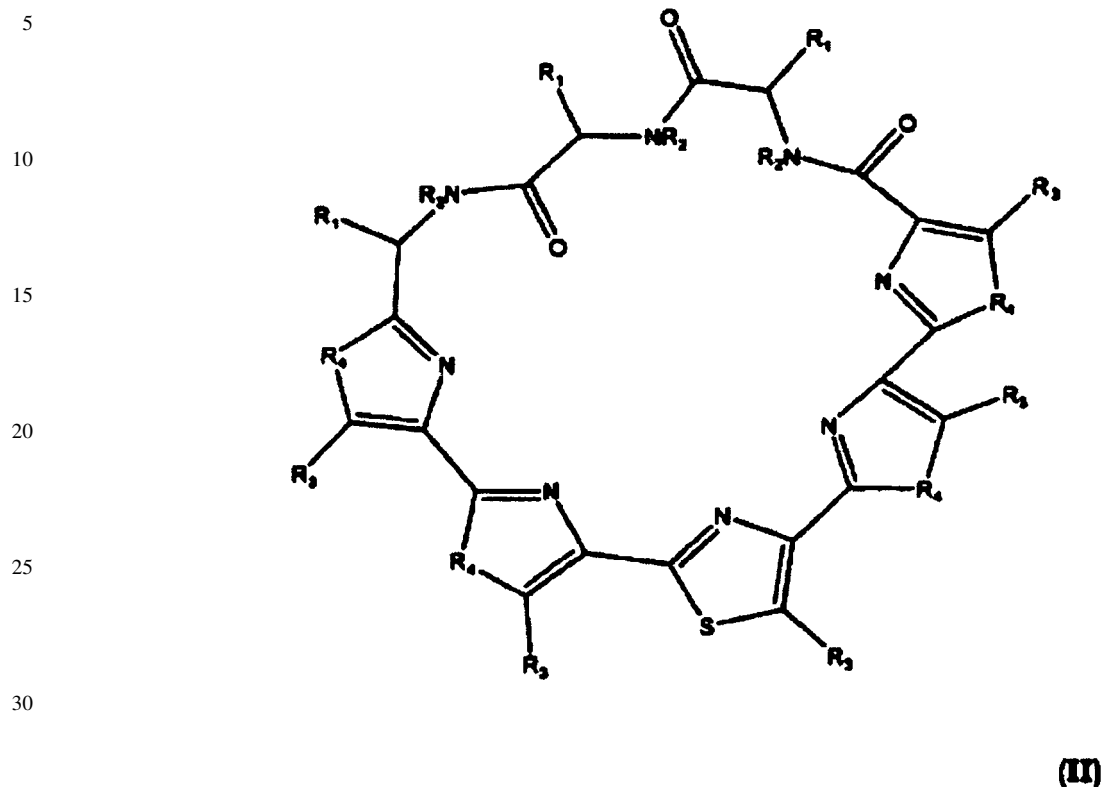
o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

55

60

65

2. El compuesto según la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula II



35 en la que R_1 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, ciano, hidroxilo, nitro, azido, alquilo sustituido o no sustituido, alquilideno sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido;

40 los grupos R_3 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, ciano, hidroxilo, nitro, azido, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido;

45 los grupos R_4 se seleccionan cada uno independientemente de NR_2 , O y S; y

50 los grupos R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido y acilo sustituido o no sustituido.

3. El compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R_1 se seleccionan cada uno independientemente de alquilo sustituido o no sustituido y alquilideno sustituido o no sustituido.

4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R_2 se seleccionan cada uno independientemente de H y alquilo sustituido o no sustituido.

5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R_3 se seleccionan cada uno independientemente de H y arilo sustituido o no sustituido.

6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R_4 son cada uno O.

7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene la siguiente fórmula

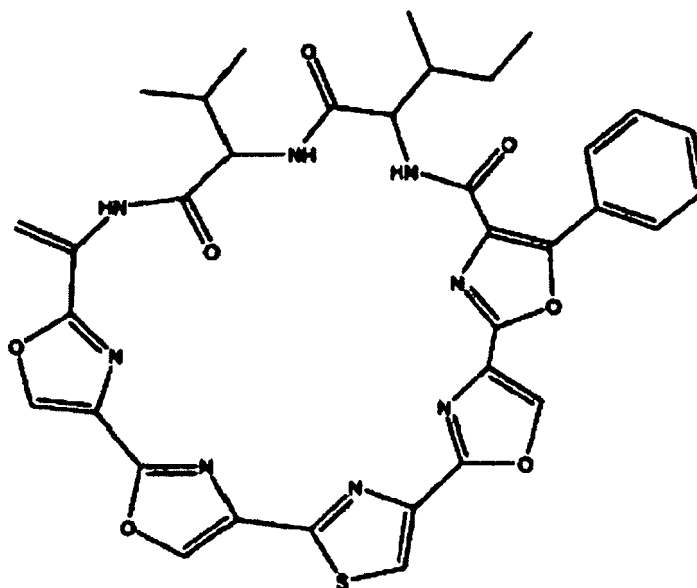
5

10

15

20

25



o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo.

30

8. El compuesto según la reivindicación 7, que tiene la siguiente estereoquímica

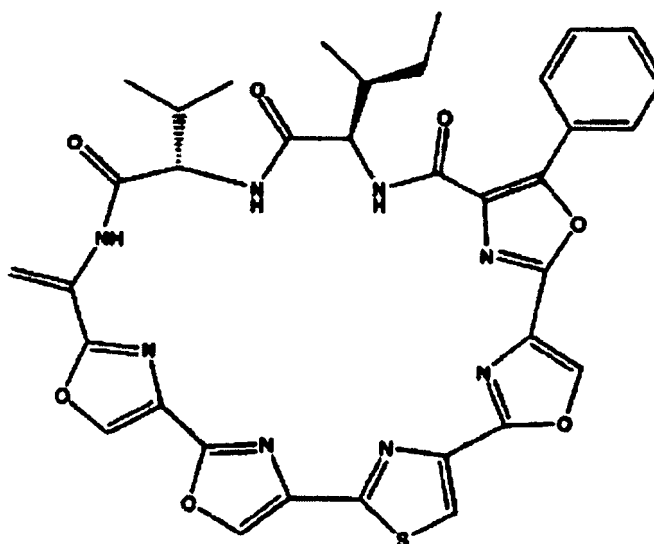
35

40

45

50

55



9. Un procedimiento para producir un compuesto según se define en la reivindicación 1, que comprende sintetizar un fragmento de oxazol/tiazol/imidazol e introducir un fragmento aminoácido.

60

10. Un procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, que comprende cultivar una cepa de un microorganismo que puede producirlo.

65

11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que el compuesto preparado es IB-01211 de fórmula:

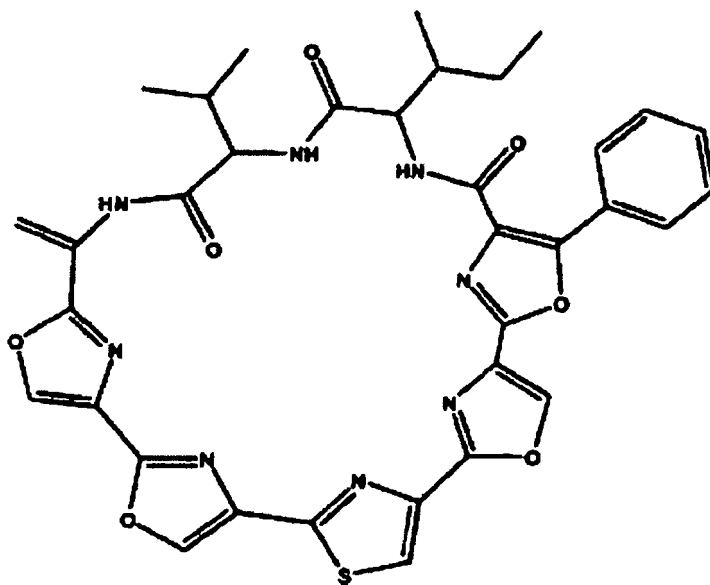
5

10

15

20

25



30

12. Un procedimiento según las reivindicaciones 10 u 11, en el que el microorganismo es un actinomiceto.

13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que el microorganismo es la cepa de cultivo sustancialmente pura ES7-008, disponible con el número de registro CECT 3358, de la Colección Española de Cultivos Tipo en la Universidad de Valencia, España.

35

14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables.

40

15. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

45

50

55

60

65

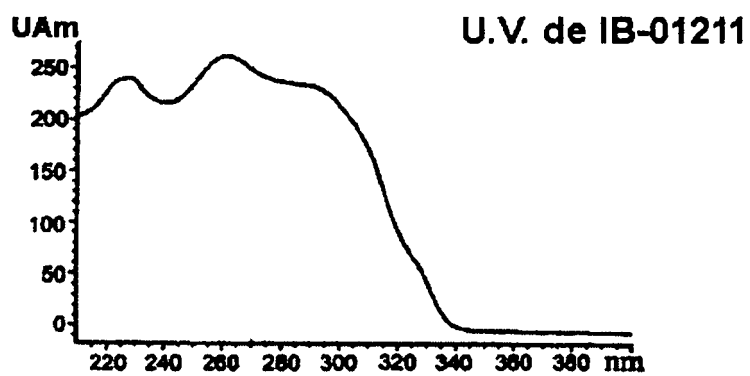
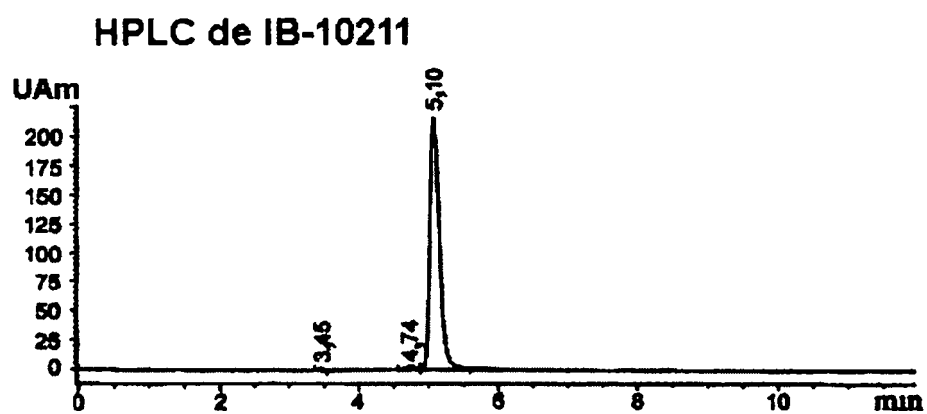


Fig1

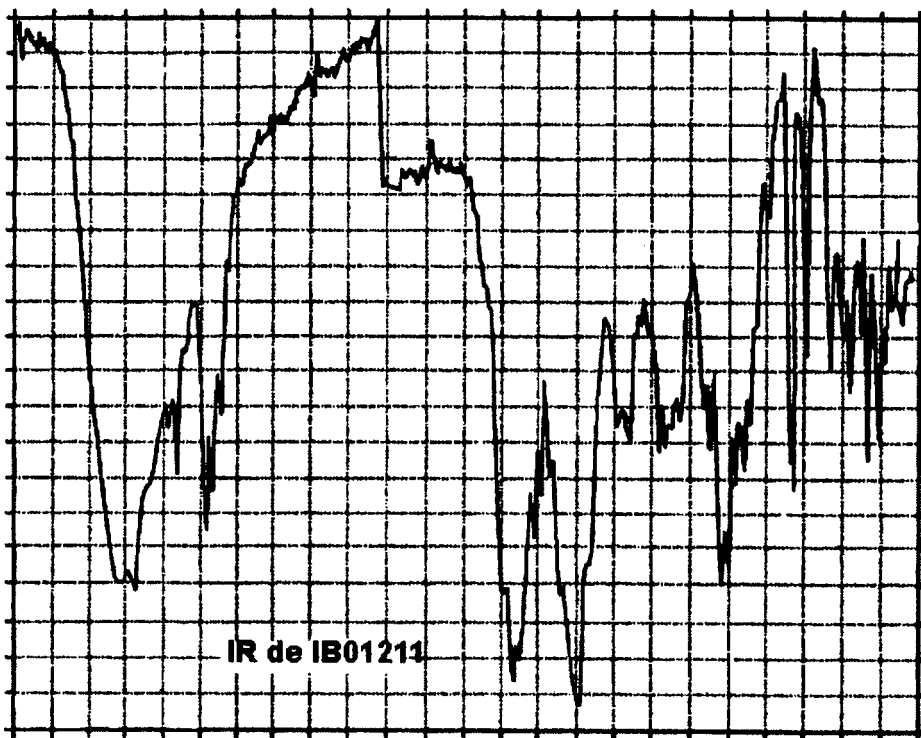


Fig.2

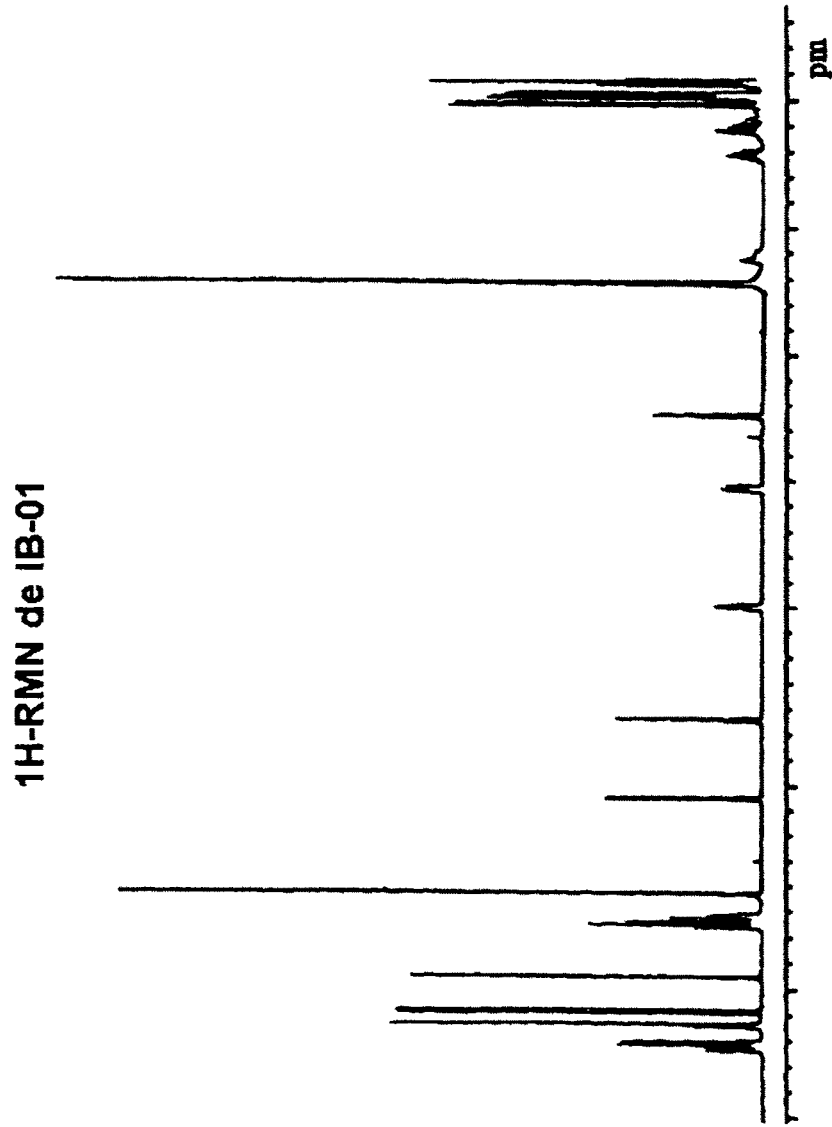


Fig.3

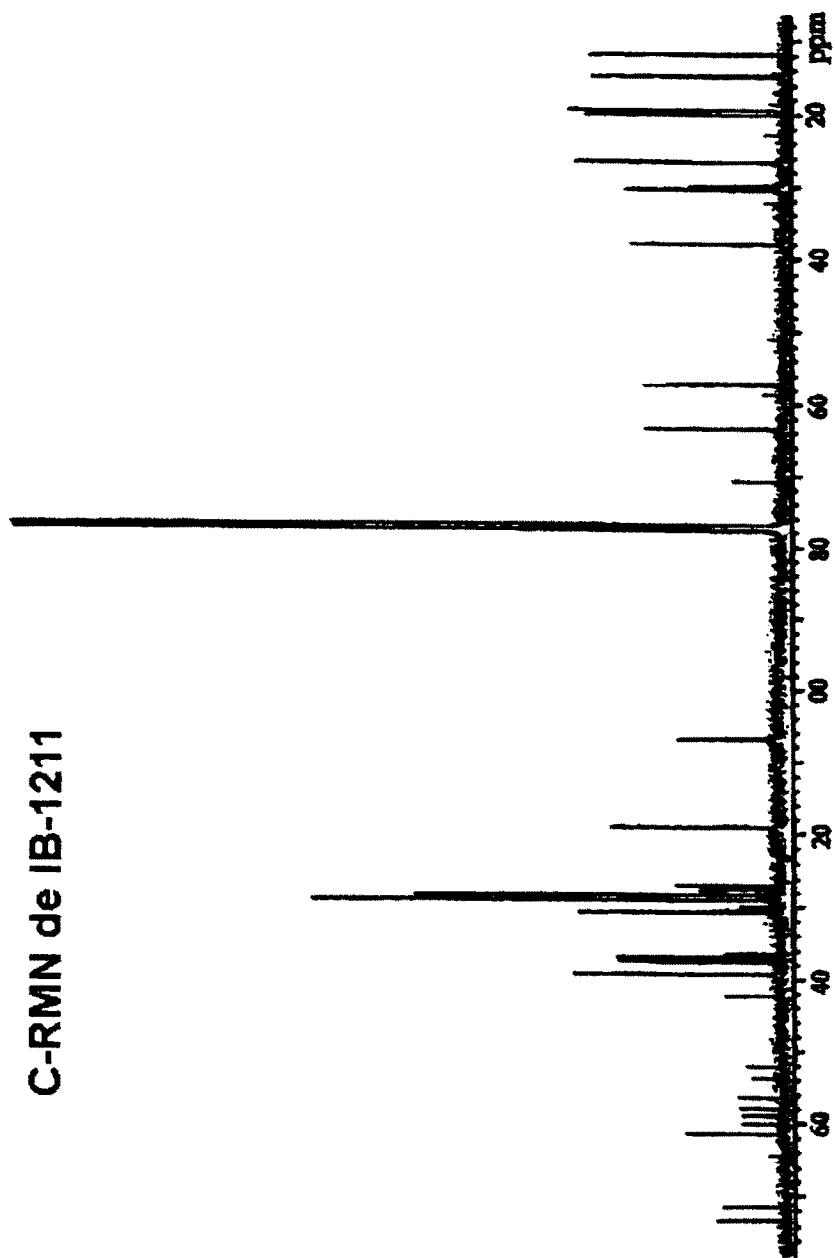


Fig.4

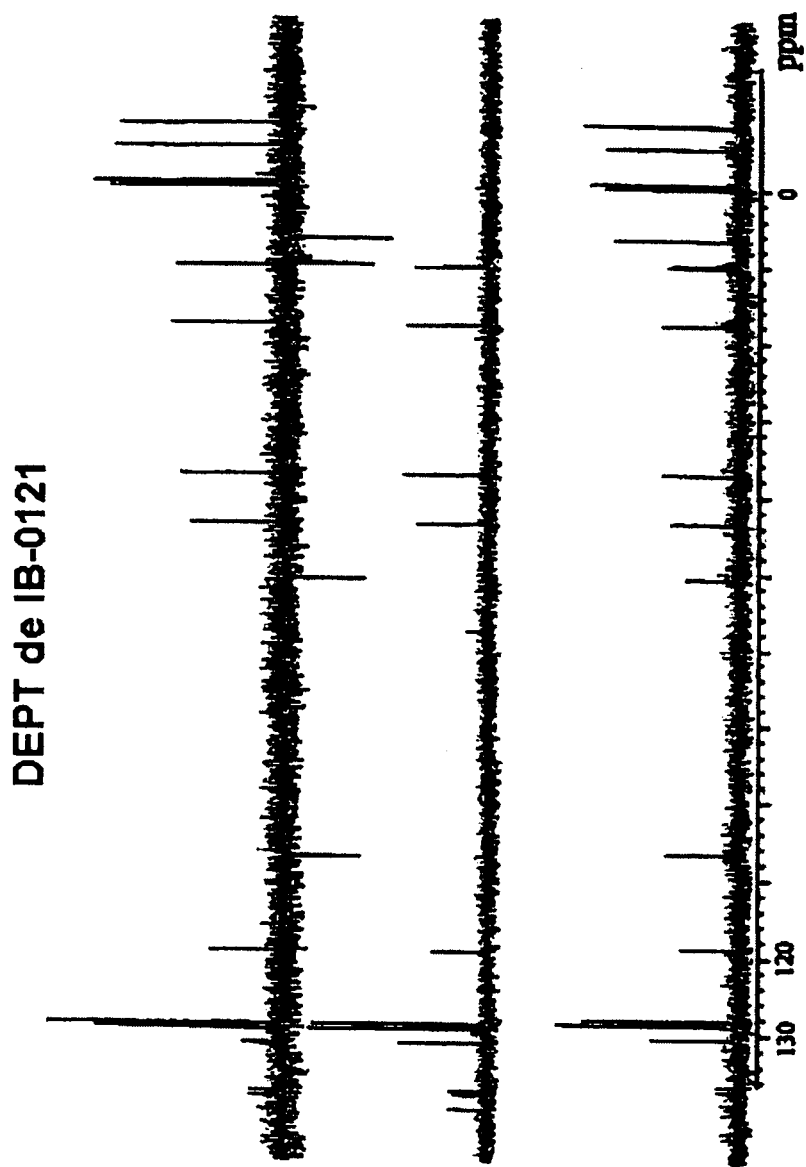


Fig.5

COSY 45 de IB-01211

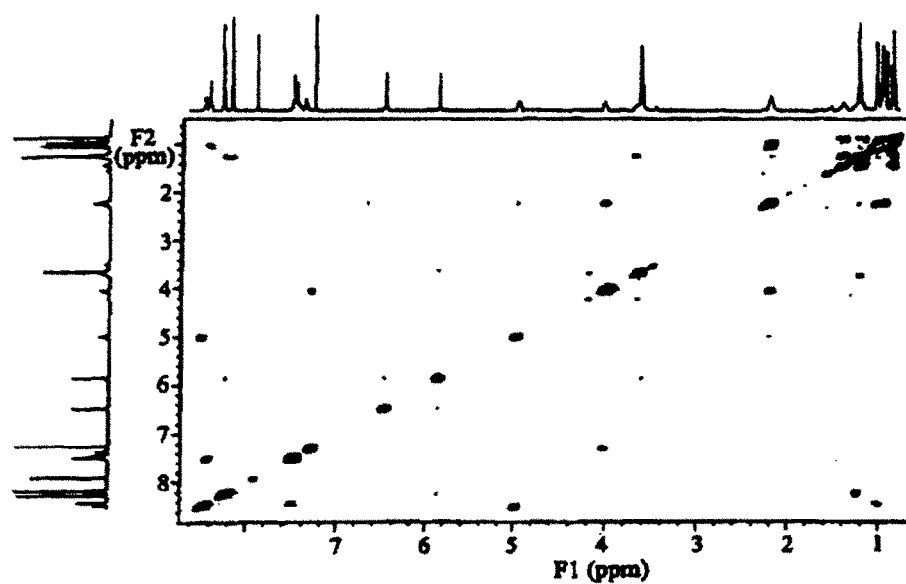


Fig.6

gHMQC de IB-01211

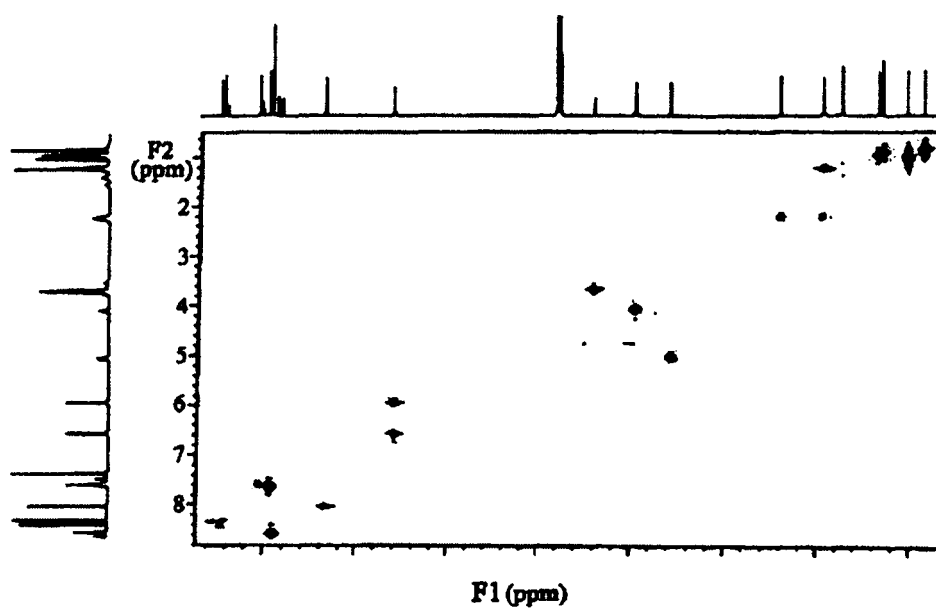


Fig.7

gHMBC de IB-01211

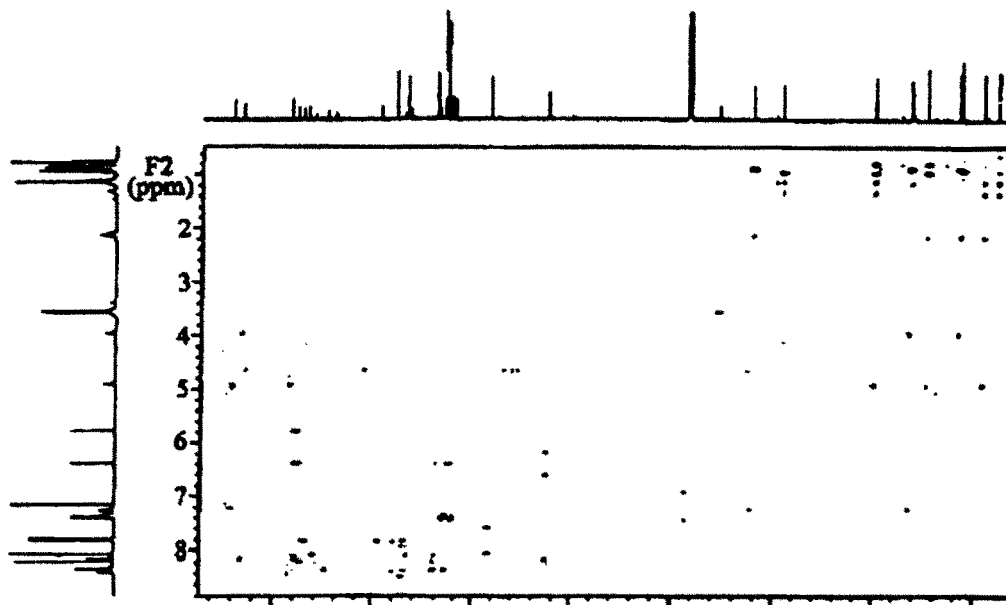


Fig.8

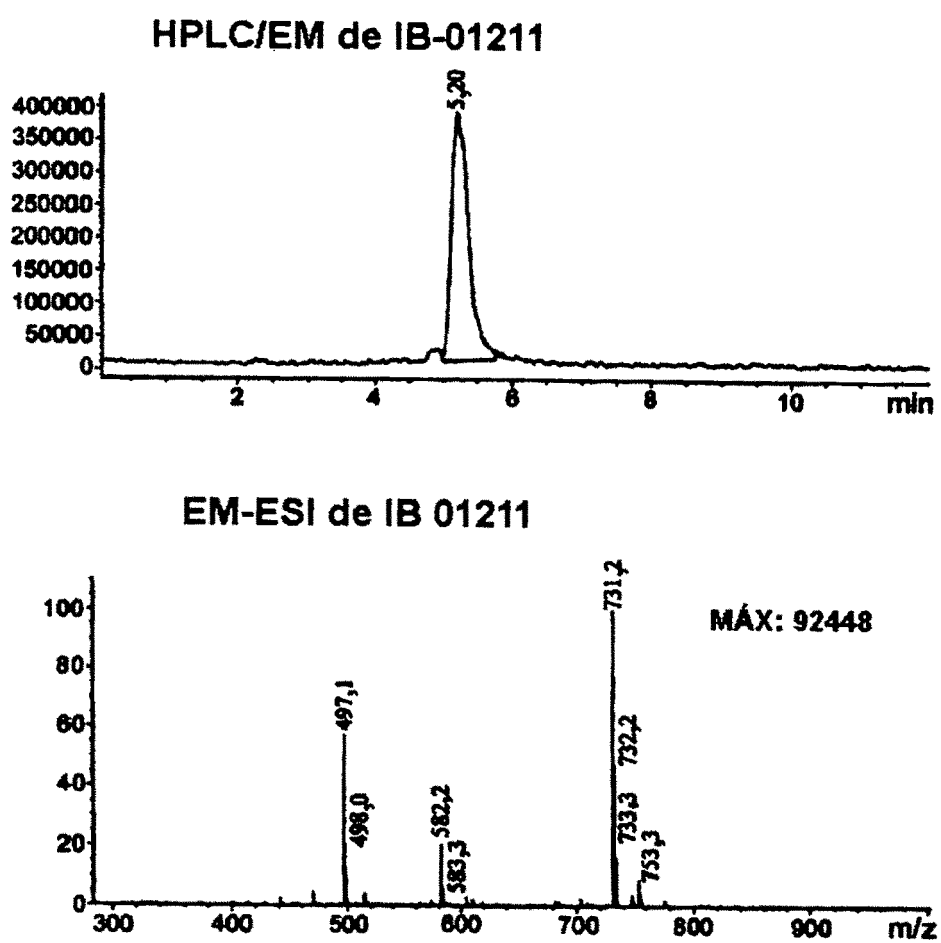


Fig.9

ES 2 297 441 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Instituto Biomar SA
Romero, Paco
5 Malet, Leyre
Canedo, Librada Maria
Fernando Reyes, Jose
Cuevas, Carmen
10 <120> Nuevos depsipéptidos citotóxicos
<130> wPP288234
15 <140> Documento PCT/GB2004/002694
<141> 23-06-2004
20 <150> Documento GB0314726.1
<151> 24-06-2003
<160> 1
25 <170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 1329
<212> ADN
30 <213> *Thermoactinomyces* sp.
<220>
35 <221> misc_feature
<222> (175)..(175)
<223> nucleótido desconocido
40
45
50
55
60
65

