



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 218 328**

51 Int. Cl.:

C07D 417/06 (2006.01)

C07D 493/04 (2006.01)

C07D 497/18 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

A01N 43/78 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **01127352 .1**

96 Fecha de presentación : **18.11.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **1186606**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2002**

54 Título: **Derivados de epotilón, su preparación y utilización.**

30 Prioridad: **17.11.1995 DE 195 42 986**
25.09.1996 DE 196 39 456

45 Fecha de publicación de la mención y de la
traducción de patente europea: **16.11.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la
patente europea modificada BOPI: **11.11.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente
europea modificada: **11.11.2011**

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

72 Inventor/es: **Höfle, Gerhard y**
Kiffe, Michael

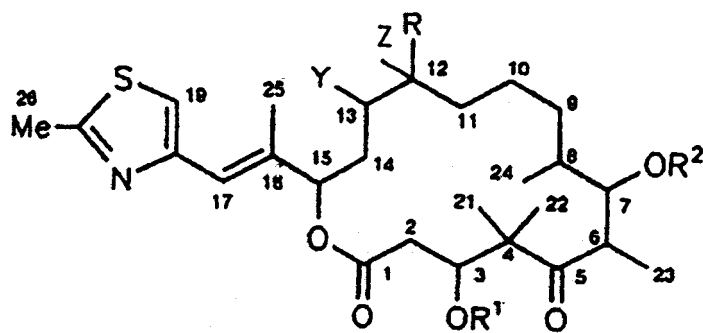
74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 218 328 T5

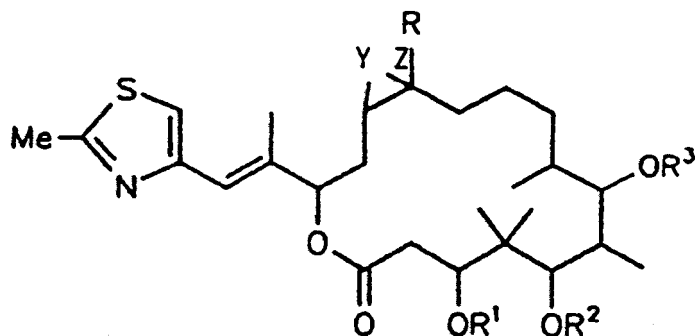
DESCRIPCIÓN

Derivados de epotilón, su preparación y utilización.

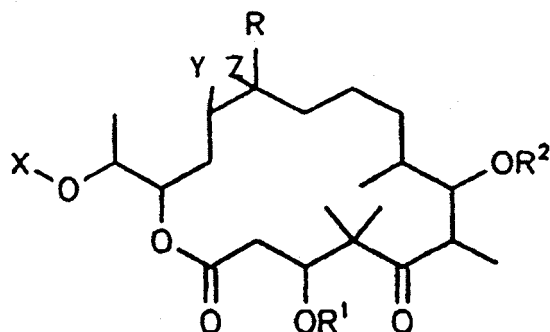
El presente invento se refiere en términos generales a derivados de epotilones y a su utilización para la preparación de medicamentos. En particular, el presente invento se refiere a la preparación de los derivados de epotilones de las fórmulas generales 1, 2 y 5 seguidamente representadas, así como a su utilización para la preparación de agentes terapéuticos y de agentes para la fitoprotección (protección de las plantas).



1



2



5

En las precedentes fórmulas 1, 2 y 5 se presentan los siguientes significados:

- 5 **R =** alquilo C₁;
R¹, R², R³ = H, alquilo C₁₋₆,
 acilo C₁₋₆,
 benzoílo,
 tri-alquil C₁₋₄-sililo,
 bencilo,
 10 fenilo,
 bencilo o fenilo sustituido con alcoxi C₁₋₆, alquilo C₆, hidroxí y halógeno,

realizándose que, en el caso de los grupos alquilo y respectivamente acilo contenidos en los radicales, se trata de radicales lineales o ramificados;

15 **Y y Z** forman uno de los enlaces C-C de un doble enlace C=C.

En la fórmula 5, **X** significa hidrógeno, alquilo C₁₋₁₈, acilo C₁₋₁₈, bencilo, benzoílo y cinamoílo.

Para la preparación de los compuestos se puede partir del epotilón D, pudiéndose remitir para la derivatización a los siguientes métodos de derivatización que se describen seguidamente para los epotilones A y B.

- 20 Acerca de los epotilones A y B se remitirá al documento de solicitud de patente alemana DE-A-41 38 042.

Los compuestos según la fórmula general 2 se pueden obtener a partir de los epotilones A y B así como de sus derivados protegidos con O en posición 3 y/o con O en posición 7, mediante reducción, p.ej. con NaBH₄ en metanol. Si en tal caso el OH situado en posición 3 y/o el OH situado en posición 7 están protegidos reversiblemente, entonces después de la acilación o alquilación y de la eliminación de los grupos protectores se pueden obtener derivados de la fórmula general 2 monosustituídos con O en posición 5 o disustituídos con O en posiciones 3,5 o en posiciones 5,7.

Las cetonas en C-16 se obtienen a partir de los epotilones A y B así como de sus derivados protegidos con O en posición 3 y/o con O en posición 7, por ozonólisis y tratamiento reductor, p.ej. con sulfuro de dimetilo.

- 30 Por reducción del grupo ceto en C-16, p.ej. con un hidruro de aluminio o de boro, son obtenibles los derivados con hidroxí en posición 16 de acuerdo con la fórmula general 5. Éstos, cuando los OH en posición 3 y los OH en posición 7 son provistos de correspondientes grupos protectores, pueden ser acilados o alquilados de una manera selectiva. La puesta en libertad de los grupos OH en posición 3 y OH en posición 7 se efectúa, p.ej. en el caso de O-formilo, con una mezcla de NH₃ y MeOH, o en el caso de O-p-metoxi-bencilo, mediante DDQ.

De acuerdo con el invento, el doble enlace en 12,13 del epotilón D se puede epoxidar, por ejemplo con dimetil-dioxirano o con un perácido.

- 35 El invento se refiere además a agentes para la fitoprotección (protección de las plantas) en agricultura, silvicultura y/o

jardinería, que constan de uno o varios de los derivados de epotilones precedentemente expuestos, o bien que constan de uno o varios de los derivados de epotilones precedentemente expuestos junto con uno o varios vehículo(s) y/o agente(s) diluyente(s) usuales.

5 Finalmente, el invento se refiere a agentes terapéuticos, que constan de uno o varios de los compuestos precedentemente expuestos, o de uno o varios de los compuestos precedentemente expuestos junto con uno o varios vehículo(s) y/o agente(s) diluyente(s) usuales. Estos agentes pueden mostrar en particular actividades citotóxicas y/o producir una supresión inmunitaria, y/o emplearse para la represión de tumores malignos, siendo utilizables de modo especialmente preferido como agentes citostáticos.

10 El invento se explica y describe con mayor detalle a continuación mediante la descripción de algunos Ejemplos de realización selectos.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

Compuesto 2a

15 100 mg (0,203 mmol) de epotilón A se disuelven en 4 ml de una mezcla (1 : 1) de tetrahidrofurano y un tampón de fosfato 1 M de pH 7, y se reúnen con hidruro de boro y sodio (150 mg = 3,965 mmol) hasta que el educto haya acabado de reaccionar totalmente según el cromatograma de capa fina. A continuación, se reúne con un tampón de fosfato 1 M de pH 7 y la fase acuosa se extrae cuatro veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavan con una solución saturada de cloruro de sodio, se secan sobre sulfato de sodio y se ponen en libertad con respecto del disolvente. La purificación del producto bruto se efectúa con ayuda de la cromatografía en gel de sílice (con el agente eluyente: -
20 gradiente - desde una mezcla de diclorometano y acetona, 95 : 5 hasta una mezcla de diclorometano y acetona, 85 : 15)

Rendimiento: (20 %)

R_f (en una mezcla de diclorometano y acetona, 75 : 25 : 0,27

25 IR (película): ν = 3413 (s, ancho, hombro), 2965 (vs, hombro), 1734 (vs), 1458 (m, ancho, hombro), 1383 (m, hombro), 1264 (s, ancho, hombro), 1184 (m, ancho, hombro), 1059 (s, hombro), 966 (s), 885 (w), 737 (m), cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6[M⁺]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

30 Alta resolución: $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{NS}$ calculado: 495,2655 para [M⁺]
encontrado: 495,2623

Ejemplo de referencia 2

Compuesto 4a

35 10 mg (0,020 mmol) de epotilón A se disuelven en 2 ml de diclorometano, se enfrían a -70°C y a continuación se tratan durante 5 minutos con ozono hasta obtener una débil coloración de azul. La mezcla de reacción resultante se reúne a continuación con 0,5 ml de sulfuro de dimetilo y se calienta a la temperatura ambiente. Para el tratamiento, la mezcla de reacción se pone en libertad con respecto del disolvente y finalmente se purifica por medio de la cromatografía preparativa en capas (agente eluyente: mezcla de diclorometano, acetona y metanol, 85 : 10 : 5).

40 Rendimiento: 5 mg (64 %)

R_f (en una mezcla de diclorometano, acetona y metanol, 85 : 10 : 5): 0,61

IR (película): ν = 3468, (s, ancho, hombro), 2947 (s, ancho, hombro), 1734 (vs, hombro), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w),

	1157 (w), 1080 (w), 982 (w), cm^{-1}
<u>UV (metanol):</u>	λ_{max} (log ϵ) = 202 (3,53) nm,
<u>MS (20/70 eV):</u>	m/e (%) = 398 (2 [M^+]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).
5 <u>Alta resolución:</u>	$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_7$ calculado: 398,2305 para [M^+] encontrado: 398,2295

Ejemplo 1:**Epotilones C y D como compuestos de partida**

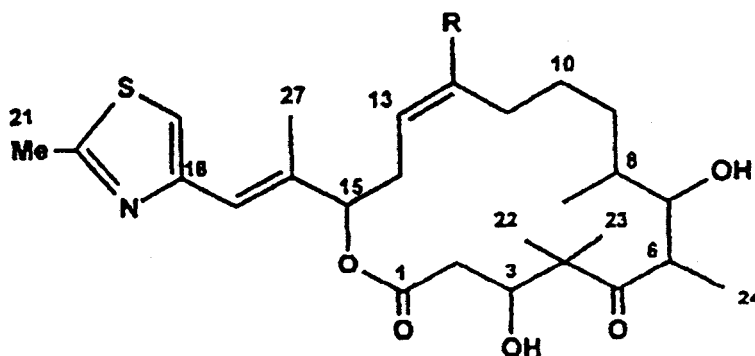
10 **A: La cepa de producción y las condiciones de cultivación son correspondientes a la patente de base de los epotilones.**

B..Producción con DSM 6773

15 75 l de un cultivo se hacen crecer como se describe en la patente de base y se utilizan para la inoculación de un fermentador de producción con 700 l de un medio de producción a base de 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, pH = 7,4, y opcionalmente 15 l de la resina adsorbente Amberlite XAD-16. La fermentación dura 7 - 10 días a 30°C, la aireación se efectúa con 2 m³ de aire / h. Por regulación del número de revoluciones, el pO₂ se mantiene en un 30 %.

C. Aislamiento

20 La resina adsorbente se separa del cultivo con un filtro de tratamiento de 0,7 m² y malla 100, y por lavado con 3 volúmenes de lecho de una mezcla de agua y metanol 2 : 1 se libera de sustancias acompañantes polares. Por elución con 4 volúmenes de lecho de metanol, se obtiene un extracto bruto, que se concentra por evaporación en vacío hasta la aparición de la fase de agua. Ésta se extrae tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo. La concentración por evaporación de la fase orgánica proporciona 240 g de un extracto bruto, que se reparte entre metanol y heptano, a fin de separar las sustancias acompañantes lipófilas. A partir de la fase de metanol se obtienen, mediante concentración por evaporación en vacío, 180 g de un material refinado, que se fracciona en tres porciones a través de Sephadex LH-20 (columna de 20 x 100 cm, con 20 ml/min de metanol). Los epotilones están contenidos en la fracción, en total de 72 g, eluida con unos tiempos de retención de 240 - 300 min. Para la separación de los epotilones, se cromatografía en tres porciones de presencia de Lichrosorb RP-18 (15 μm , columna de 10 x 40 cm, agente eluyente 180 ml/min con una mezcla de metanol y agua 65:35). Después de los epotilones A y B se eluyen con R_t = 90-95 min el epotilón C y con R_t = 100-110 min el epotilón D, y después de haber concentrado por evaporación en vacío se obtienen como aceites incoloros en un rendimiento en cada caso de 0,3 g

D. Propiedades físicas

Epotilón D R = CH₃

35 **Epotilón D**
 $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_5\text{S}$ [491]

ESI-MS: (iones positivos): 492,5 para $[M+H]^+$

Para 1H y ^{13}C véase la Tabla de NMR

DC: $R_f = 0,82$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, agente eluyente: mezcla de diclorometano y metanol = 9:1

- 5 Detección: Extinción de UV a 254 nm. Rociado con un reactivo de vainillina y ácido sulfúrico, coloración de gris azulado al calentar a 120°C.
- HPLC: $R_t = 15,3$ min
- Columna: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm
- 10 Agente eluyente: mezcla de metanol y agua = 65:35
- Caudal: 1 ml/min
- Detección: con un conjunto de diodos.

Tabla:

Datos de 1H - y ^{13}C -NMR de epotilón D en $[D_6]DMSO$ a 300 MHz			
Epotilón D			
Átomo de H	δ (ppm)	Átomo de C	δ (ppm)
		1	170,1
2-Ha	2,35	2	39,0
2-Hb	2,38	3	70,8
3-H	4,10	4	53,2
3-OH	5,08	5	217,4
6-H	3,11	6	44,4
7-H	3,48	7	75,5
7-OH	4,46	8	36,3
8-H	1,29	9	29,9
9-Ha	1,14	10	25,9
9-Hb	1,38	11	31,8*
10-Ha	1,14*	12	138,3
10-Hb	1,35*	13	120,3
11-Ha	1,75	14	31,6*
11-Hb	2,10	15	76,6
12-H		16	137,2
13-H	5,08	17	119,2
14-Ha	2,30	18	152,1
14-Hb	2,65	19	117,7
15-H	5,29	20	164,3
17-H	6,51	21	18,9
19-H	7,35	22	19,7
21-H ₃	2,65	23	22,5
22-H ₃	0,90	24	16,4
23-H ₃	1,19	25	18,4
24-H ₃	1,07	26	22,9
25-H ₃	0,91	27	14,1
26-H ₃	1,63		
27-H ₃	2,11		

15 Ejemplo de referencia 3

Epotilón A y 12,13-bisepi-epotilón A a partir de epotilón C

- 20 50 mg de epotilón A se disuelven en 1,5 ml de acetona, y se mezclan con 1,5 ml de una solución 0,07 molar de dimetildioxirano en acetona. Después de haber reposado durante 6 horas a la temperatura ambiente, se concentra por evaporación en vacío y se separa por HPLC preparativa en presencia de gel de sílice (con el agente eluyente: mezcla de metil-terc.butil-éter, éter de petróleo y metanol 33:66:1).

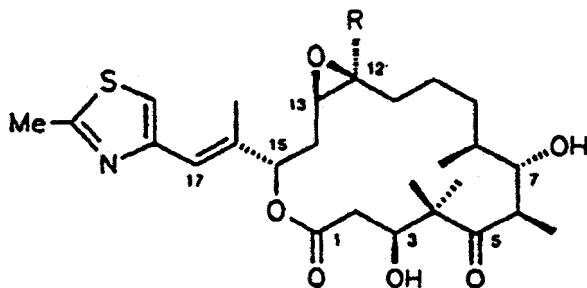
Rendimiento:

25 mg de epotilón A, $R_t = 3,5$ min (HPLC analítica, 7 μm , columna de 4 x 250 mm, agente eluyente, véase más arriba, caudal 1,5 ml/min) y

- 25 20 mg de 12,13-bisepi-epotilón A, $R_t = 3,7$ min, ESI (iones positivos)

$m/z = 494 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ en $[\text{D}_4]$ metanol, señales seleccionadas:
 $\delta = 4,32$ (3-H), $3,79$ (7-H), $3,06$ (12-H), $3,16$ (13-H),
 $5,54$ (15-H), $6,69$ (17-H), $1,20$ (22-H), $1,45$ (23-H).

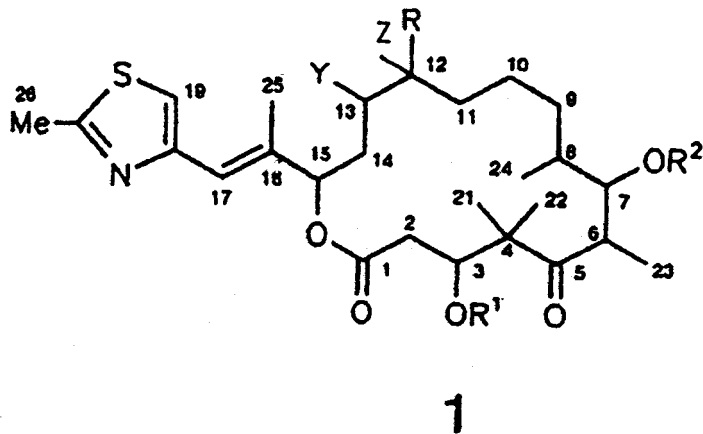


5

12,13-bisepi-epotilón A R = H

REIVINDICACIONES

1. Derivado de epotilón de la fórmula 1



significando

5 **R** = alquilo C₁;

R¹, **R**² = H y

formando **Y** y **Z** uno de los enlaces C-C de un doble enlace C=C.

con los siguientes espectros de ¹H-NMR y de ¹³C-NMR para el epotilón D o este compuesto,

10 significando

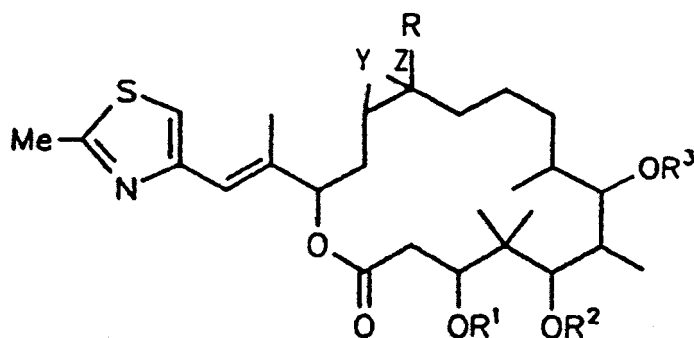
R¹, **R**² = alquilo C₁₋₆, acilo C₁₋₆, benzoílo, tri-alquil C₁₋₄-sililo, bencilo, fenilo; bencilo o fenilo sustituido con alcoxi C₁₋₆, alquilo C₆, hidroxilo y halógeno; y realizándose, en el caso de los grupos alquilo o respectivamente acilo contenidos en los radicales, que se trata de radicales lineales o ramificados;

Datos de ^1H - y ^{13}C -NMR de epotilón D en $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ a 300 MHz

Epotilón D

Átomo de H	δ (ppm)	Átomo de C	δ (ppm)
		1	170,1
2,35		2	39,0
2,38		3	70,8
4,10		4	53,2
5,08		5	217,4
3,11		6	44,4
3,48		7	75,5
4,46		8	36,3
1,29		9	29,9
1,14		10	25,9
1,38		11	31,8*
1,14*		12	138,3
1,35*		13	120,3
1,75		14	31,6*
2,10		15	76,6
		16	137,2
5,08		17	119,2
2,30		18	152,1
2,65		19	117,7
5,29		20	164,3
6,51		21	18,9
7,35		22	19,7
2,65		23	22,5
0,90		24	16,4
1,19		25	18,4
1,07		26	22,9
0,91		27	14,1
1,63			
2,11			

2. Derivado de epotilón de la fórmula 2



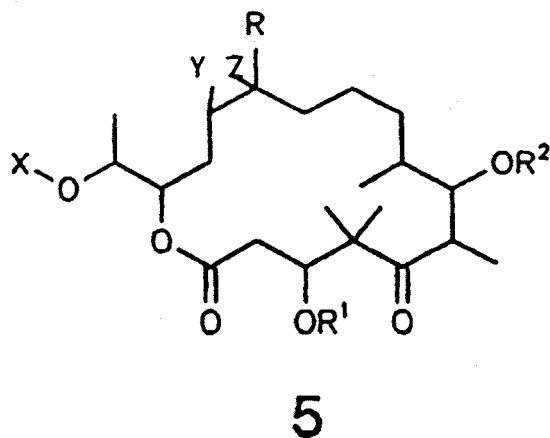
2

significando

- 5 R = alquilo C_1 ;
 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ = H, alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} , benzoilo, tri-alquil C_{1-4} -sililo, bencilo, fenilo; bencilo o fenilo sustituido con alcoxi C_{1-6} , alquilo C_6 , hidroxilo y halógeno; realizándose, en el caso de los grupos alquilo y acilo contenidos en los radicales, que se trata de radicales lineales o ramificados; y poseyendo Y y Z los significados de acuerdo con la reivindicación 1, que se puede preparar mediante el recurso de que partiendo de un derivado de epotilón de la fórmula I de acuerdo con la

reivindicación 1, se realiza una reducción.

3. Derivado de epotilón de la fórmula 5



5 significando

R = alquilo C₁;

R¹, **R**² = H, alquilo C₁₋₆, acilo C₁₋₆, benzoilo, tri-alquil C₁₋₄-silo, bencilo, fenilo; bencilo o fenilo sustituido con alcoxi C₁₋₆, alquilo C₆, hidroxí y halógeno; realizándose, en el caso de los grupos alquilo y acilo contenidos en los radicales, que se trata de radicales lineales o ramificados; y significando

10 **X** hidrógeno, alquilo C₁₋₁₈, acilo C₁₋₁₈, bencilo, benzoilo y cinamoilo, y poseyendo

Y y **Z** los significados de acuerdo con la reivindicación 1, que se puede preparar mediante el recurso de que partiendo de un derivado de epotilón de la fórmula 1 de acuerdo con la reivindicación 1, se realizan una ozonolisis y un tratamiento reductor, y se lleva a cabo una reducción del grupo 16-ceto.

15 4. Procedimiento para la preparación de epotilón B y/o 12,13-bis-epi-epotilón B, **caracterizado porque** el epotilón D se epoxida, en particular con dimetil-dioxirano o con un perácido.

5. Agente para la fitoprotección en la agricultura y silvicultura y/o en la jardinería, que consta de uno o varios de los compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, o de uno o varios de estos compuestos junto con uno o varios vehículo(s) y/o agente(s) diluyente(s) usuales.

20 6. Agente terapéutico, en particular para su empleo como agente citostático, que consta de uno o varios de los compuestos de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, o de uno o varios de los compuestos de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 3 junto con uno o varios vehículo(s) y/o agente(s) diluyente(s) usuales.