

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 740**

51 Int. Cl.:
C07D 225/06 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07824891 .1**
96 Fecha de presentación: **09.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1973883**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Nuevos compuestos y procedimientos para su producción**

30 Prioridad:
09.11.2006 GB 0622342
24.10.2007 GB 0720875

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD P.O.
BOX 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000, US

72 Inventor/es:
MARTIN, CHRISTINE

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 389 740 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

Nuevos compuestos y procedimientos para su producción

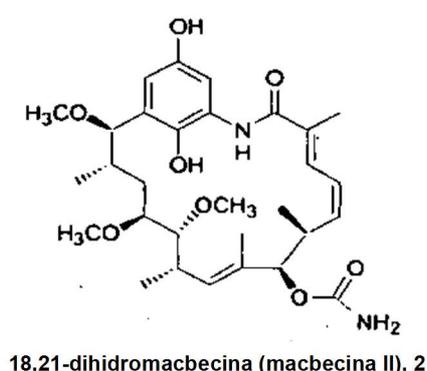
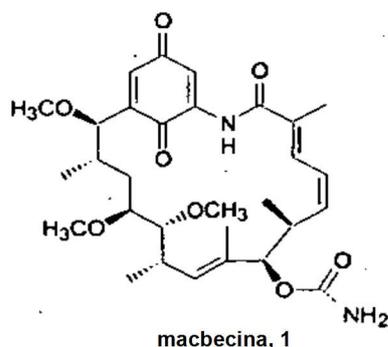
La presente invención se refiere a análogos de ansamicina que son útiles, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, los tumores malignos de linfocitos B, malaria, infección fúngica, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas, enfermedades dependientes de la angiogénesis, enfermedades autoinmunes o como un pretratamiento profiláctico del cáncer. La presente invención también proporciona procedimientos para la producción de estos compuestos y su uso en medicina.

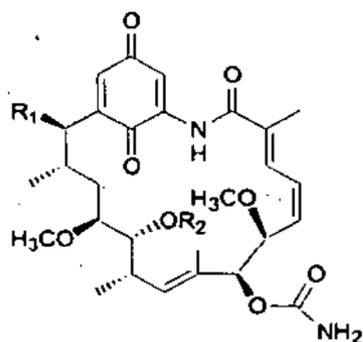
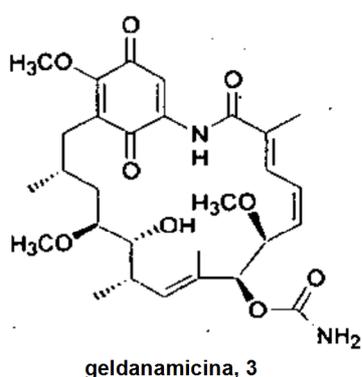
Antecedentes de la invención

El desarrollo de fármacos contra el cáncer altamente específicos con una baja toxicidad y características farmacocinéticas favorables constituye un reto muy importante en la terapia contra el cáncer.

La proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) es una abundante chaperona molecular implicada en el plegamiento y el ensamblaje de proteínas, muchas de las cuales están implicadas en las rutas de transducción de señales (para más información, véase Neckers, 2002; Sreedhar *et al.*, 2004a; Wegele *et al.*, 2004 y las referencias que aparecen en dichos documentos). Hasta la fecha, se han identificado casi 50 de las denominadas proteínas cliente, e incluyen receptores esteroideos, tirosina quinasas no receptoras, por ejemplo, la familia src, quinasas dependientes de la ciclina, por ejemplo, cdk4 y cdk6, el regulador de la transmembrana de la fibrosis quística, la óxido nítrico sintasa y otras (Donzé y Picard, 1999; McLaughlin *et al.*, 2002; Chiosis *et al.*, 2004; Wegele *et al.*, 2004; <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>). Además, la Hsp90 desempeña un papel clave en la respuesta al estrés y la protección de la célula contra los efectos de la mutación (Bagatell y Whitesell, 2004; Chiosis *et al.*, 2004). La función de la Hsp90 es compleja e implica la formación de complejos multienzimáticos dinámicos (Bohen, 1998; Liu *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2003; Sreedhar *et al.*, 2004; Wegele *et al.*, 2004). La Hsp90 es una diana para los inhibidores (Fang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Blagosklonny, 2002; Neckers, 2003; Takahashi *et al.*, 2003; Beliakoff y Whitesell, 2004; Wegele *et al.*, 2004) que provoca la degradación de proteínas cliente, la desregulación o la normalización y la apoptosis del ciclo celular. Más recientemente, se ha identificado la Hsp90 como un importante mediador extracelular de la invasión tumoral (Eustace *et al.*, 2004). La Hsp90 se identificó como una nueva diana terapéutica de gran importancia para la terapia contra el cáncer, lo que se refleja en la intensa y detallada investigación acerca de la función de Hsp90 (Blagosklonny *et al.*, 1996; Neckers, 2002; Workman y Kaye, 2002; Beliakoff y Whitesell, 2004; Harris *et al.*, 2004; Jez *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004) y el desarrollo de análisis de rastreo de alto rendimiento (Carreras *et al.*, 2003; Rowlands *et al.*, 2004). Los inhibidores de Hsp90 incluyen clases de compuestos tales como ansamicinas, macrólidos, purinas, pirazoles, antibióticos de coumarina y otros (para más información, véase Bagatell y Whitesell, 2004; Chiosis *et al.*, 2004 y las referencias que aparecen en dichos documentos).

Las ansamicinas bencenoides son una amplia clase de estructuras químicas que se caracterizan por un anillo alifático de longitud variable unido a cada lado de una estructura anular aromática. Las ansamicinas naturales incluyen: macbecina y 18,21-dihidromacbecina (también denominada macbecina I y macbecina II respectivamente) (1 y 2; Tanida *et al.*, 1980), geldanamicina (3; DeBoer *et al.*, 1970; DeBoer y Dietz, 1976; WO 03/106653 y las referencias que aparecen en dichos documentos) y la familia de la herbimicina (4; 5, 6, Omura *et al.*, 1979, Iwai *et al.*, 1980 y Shibata *et al.*, 1986a, WO 03/106653 y las referencias que aparecen en dichos documentos).





Las ansamicinas se identificaron originariamente por su actividad antibacteriana y antiviral. Sin embargo, recientemente, su posible utilidad como agentes anticancerígenos ha cobrado el mayor interés (Beliakoff y Whitesell, 2004). Actualmente, se están analizando muchos inhibidores de Hsp90 en ensayos clínicos (Csermely y Soti, 2003; Workman, 2003). En particular, la geldanamicina tiene una potencia nanomolar y una especificidad aparente por las células tumorales dependientes de proteínas quinasas aberrantes (Chiosis *et al.*, 2003; Workman, 2003).

Se ha observado que el tratamiento con inhibidores de Hsp90 aumenta la inducción de la muerte de células tumorales por radiación, demostrándose además el aumento de la capacidad de provocar la muerte celular (por ejemplo, cáncer de mama, leucemia mieloide crónica y cáncer pulmonar de células no pequeñas) mediante la combinación de los inhibidores de Hsp90 con agentes citotóxicos (Neckers, 2002; Beliakoff y Whitesell, 2004). También es de interés el potencial de actividad antiangiogénica: la proteína cliente de la Hsp90 HIF-1 α desempeña un papel clave en la progresión de los tumores sólidos (Hur *et al.*, 2002; Workman y Kaye, 2002; Kaur *et al.*, 2004).

Los inhibidores de Hsp90 también funcionan como inmunosupresores y están implicados en la lisis inducida por complementos de varios tipos de células tumorales tras la inhibición de Hsp90 (Sreedhar *et al.*, 2004). El tratamiento con los inhibidores de Hsp90 también puede provocar la producción de superóxidos (Sreedhar *et al.*, 2004a) asociada con la lisis mediada por las células inmunes (Sreedhar *et al.*, 2004). También se ha tratado el uso de inhibidores de Hsp90 como posibles fármacos contra la malaria (Kumar *et al.*, 2003). Además, se ha observado que la geldanamicina interfiere en la formación de la proteína priónica de mamífero glicosilada compleja PrP^c (Winkhofer *et al.*, 2003).

Como se ha descrito anteriormente, las ansamicinas son de interés como posibles compuestos contra el cáncer y tumores malignos de linfocitos B. Sin embargo, las ansamicinas actualmente disponibles presentan malas propiedades farmacológicas o farmacéuticas, por ejemplo, presentan una baja hidrosolubilidad, una baja estabilidad metabólica, una baja biodisponibilidad o una baja capacidad de formulación (Goetz *et al.*, 2003; Workman 2003; Chiosis 2004). Tanto la herbimicina A como la geldanamicina se identificaron como malos candidatos para los ensayos clínicos debido a su fuerte hepatotoxicidad (véase Workman, 2003), siendo la geldanamicina retirada de los ensayos clínicos en fase I debido a su hepatotoxicidad (Supko *et al.*, 1995; WO 03/106653).

La geldanamicina se aisló de filtrados de cultivo de *Streptomyces hygroscopicus* y muestra una potente actividad *in vitro* contra los protozoos, y una débil actividad contra las bacterias y los hongos. En 1994, se observó la asociación de la geldanamicina con Hsp90 (Whitesell *et al.*, 1994). Se clonó y secuenció la agrupación de los genes biosintéticos de la geldanamicina (Allen y Ritchie, 1994; Rascher *et al.*, 2003; WO 03/106653). La secuencia de ADN está disponible con el número de acceso NCBI de AY179507. Recientemente, se ha descrito el aislamiento de cepas productoras de geldanamicina diseñadas genéticamente derivadas de *S. hygroscopicus* subsp. *duamyceticus* JCM4427, y el aislamiento de 4,5-dihidro-7-O-descarbamoil-7-hidroxigeldanamicina y 4,5-dihidro-7-O-descarbamoil-7-hidroxi-17-O-desmetilgeldanamicina (Hong *et al.*, 2004). Al suministrar geldanamicina a la cepa productora de herbimicina de AM-3672 de *Streptomyces hygroscopicus*, se aislaron los compuestos 15-hidroxigeldanamicina, el análogo tricíclico de geldanamicina KOSN-1633 y metil-geldanamycinato (Hu *et al.*, 2004). Los dos compuestos 17-formil-17-desmetoxi-18-O-21-O-dihidrogeldanamicina y 17-hidroximetil-17-desmetoxigeldanamicina se aislaron de K279-78 de *S. hygroscopicus*. La cepa K279-78 de *S. hygroscopicus* es NRRL 3602 de *S. hygroscopicus* que contiene cósmido pKOS279-78 que tiene un inserto de 44 kpb que contiene diversos genes de la cepa productora de herbimicina AM-3672 de *Streptomyces hygroscopicus* (Hu *et al.*, 2004). Se han efectuado sustituciones de los dominios de aciltransferasa en cuatro de los módulos de la policétido sintasa de la agrupación biosintética de la geldanamicina (Patel *et al.*; 2004). Se llevaron a cabo sustituciones de AT en los módulos 1, 4 y 5, produciendo los análogos completamente procesados 1,4-desmetil-geldanamicina, 8-desmetil-geldanamicina y 6-desmetoxigeldanamicina, y la 4,5-dihidro-6-desmetoxigeldanamicina no procesada completamente. La sustitución del módulo 7 AT conduce a la producción de tres compuestos de 2-desmetilo, KOSN1619, KOSN1558 y KOSN1559, uno de los

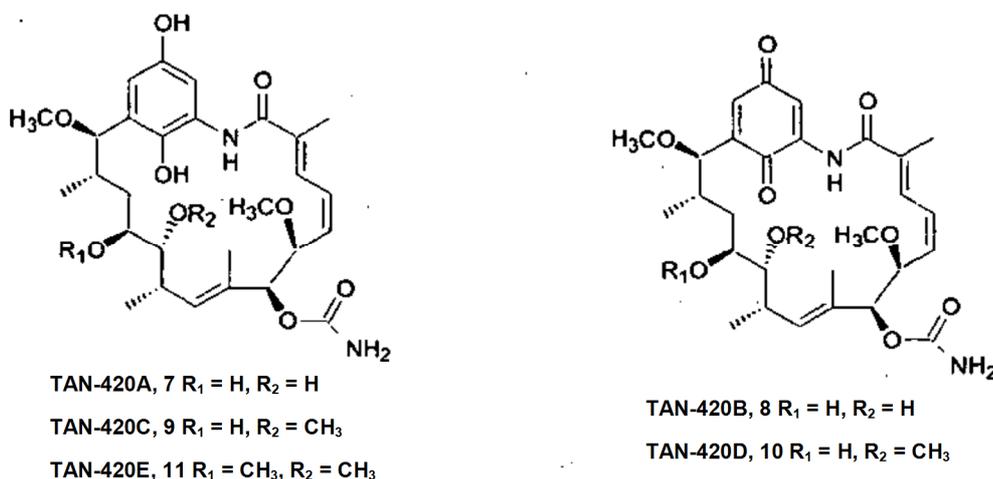
cuales (KOSN1559), un derivado de 2-desmetil-4,5-dihidro-17-desmetoxi-21-desoxilo de la geldanamicina, se une a Hsp90 con una afinidad de unión 4 veces mayor que la geldanamicina y una afinidad de unión 8 veces mayor que 17-AAG. Sin embargo, esto no se refleja en una mejora de la medición de la CI_{50} usando SKBr3. Otro análogo, una nueva geldanamicina no benzoquinona denominada KOS-1806, tiene una estructura monofenólica (Rascher *et al.*, 2005). No se dieron datos de actividad para KOS-1806.

En 1979, se aisló el antibiótico de ansamicina, la herbimicina A, del caldo de fermentación de la cepa de *Streptomyces hygroscopicus* n.º AM-3672, que debe su nombre a su potente actividad herbicida. La actividad antitumoral se estableció mediante el uso de células de una línea renal de rata infectada con un mutante sensible a la temperatura del virus del sarcoma de Rous (VSR) para la detección de fármacos que revirtieran la morfología transformada de estas células (para más información, véase Uehara, 2003). Se postuló que la herbimicina A actúa principalmente a través de la unión a proteínas chaperonas Hsp90, pero también se habló de la unión directa a los residuos conservados de cisteína y la posterior desactivación de quinasas (Uehara, 2003).

Se han aislado derivados químicos, y los compuestos con sustituyentes modificados en el C 19 del núcleo de la benzoquinona y los compuestos halogenados en la cadena ansa mostraron una menor toxicidad y mayores actividades antitumorales que la herbimicina A (Omura *et al.*, 1984; Shibata *et al.*, 1986b). La secuencia de la agrupación de genes biosintéticos de la herbimicina se identificó en el documento WO 03/106653 y en un artículo reciente (Rascher *et al.*, 2005).

Los compuestos de ansamicina macbecina (1) y 18,21-dihidromacbecina (2) (C-14919E-1 y C-14919E-1), identificados por su actividad contra hongos y protozoos, se aislaron de los sobrenadantes de cultivos de *Nocardia* sp n.º C-14919 (ATCC 31280 de *Actinosynnema pretiosum* subsp *pretiosum*) (Tanida *et al.*, 1980; Muroi *et al.*, 1980; Muroi *et al.*, 1981; US 4.315.989 y US 4.187.292). La 18,21-dihidromacbecina se caracteriza porque contiene la forma dihidroquinona del núcleo. Se observó que tanto la macbecina como la 18,21-dihidromacbecina poseían actividades antibacterianas y antitumorales similares contra líneas celulares de cáncer tales como la línea celular de leucemia murina P388 (Ono *et al.*, 1982). La macbecina no inhibió las actividades transcriptasa inversa ni desoxinucleotidil transferasa terminal (Ono *et al.*, 1982). En la bibliografía, se ha publicado la función inhibidora de la macbecina de Hsp90 (Bohen, 1998; Liu *et al.*, 1999). En las patentes US 4.421.687 y US 4.512.975, se describe la conversión de la macbecina y la 18,21-dihidromacbecina tras añadirles a un caldo de cultivo microbiano a un compuesto con un grupo hidroxilo en lugar de un grupo metoxilo en una determinada posición o determinadas posiciones.

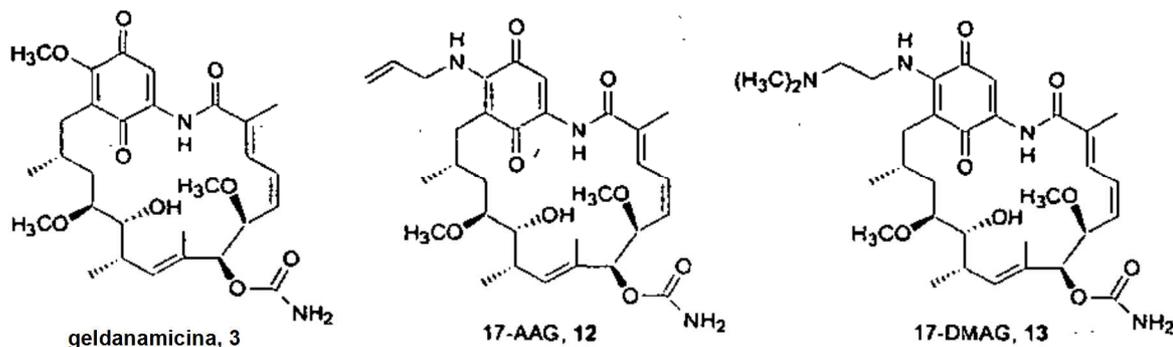
En el rastreo de una gran variedad de microorganismos del suelo, se identificaron los compuestos TAN-420A a E de cepas productoras pertenecientes al género *Streptomyces* (7-11, EP 0 110 710).



En 2000, se describió el aislamiento del metabolito de la ansamicina no benzoquinona relacionado con la geldanamicina, la reblastatina, de cultivos celulares de *Streptomyces* sp. S6699 y su posible valor terapéutico en el tratamiento de la artritis reumatoide (Stead *et al.*, 2000).

Otro inhibidor de Hsp90 más, distinto de las ansamicinas de benzoquinona no relacionadas químicamente, es el Radicol (monoorden) que se descubrió originariamente por su actividad antifúngica en el hongo *Monosporium bonorden* (para más información, véase Uehara, 2003), encontrándose que la estructura era idéntica al macrólido de 14 miembros aislado de *Nectria radicola*. Además de su actividad antifúngica, antibacteriana, antiprotozoaria y citotóxica, posteriormente, se identificó como un inhibidor de las proteínas chaperonas Hsp90 (para más información, véase Uehara, 2003; Schulte *et al.*, 1999). También se ha descrito la actividad antiangiogénica del radicol (Hur *et al.*, 2002) y sus derivados semisintéticos (Kurebayashi *et al.*, 2001).

Recientemente, se ha centrado el interés en los derivados 17-amino de la geldanamicina como una nueva generación de compuestos anticancerígenos de ansamicina (Bagatell y Whitesell, 2004), por ejemplo, 17-(alilamino)-17-desmetoxi-geldanamicina (17-AAG, **12**) (Hostein *et al.*, 2001; Neckers, 2002; Nimmanapalli *et al.*, 2003; Vasilevska *et al.*, 2003; Smith-Jones *et al.*, 2004) y 17-desmetoxi-17-*N,N*-dimetilaminoetilamino-geldanamicina (17-DMAG, **13**) (Egorin *et al.*, 2002; Jez *et al.*, 2003). Más recientemente, se derivó la geldanamicina en la posición 17 para crear 17-geldanamycin-amidas, carbamatos, ureas y 17-arilgeldanamicina (Le Brazidec *et al.*, 2003). Se ha publicado un conjunto de más de sesenta análogos de 17-alquilamino-17-desmetoxigeldanamicina y se ha analizado su afinidad por Hsp90 y su hidrosolubilidad (Tian *et al.*, 2004). Otro enfoque para reducir la toxicidad de la geldanamicina es el direccionamiento selectivo y la administración de un compuesto activo de geldanamicina a las células malignas mediante la conjugación con un anticuerpo monoclonal dirigido al tumor (Mandler *et al.*, 2000).



Aunque muchos de estos derivados presentan una reducida hepatotoxicidad, siguen teniendo sólo una hidrosolubilidad limitada. Por ejemplo, 17-AAG requiere el uso de un vehículo solubilizador (por ejemplo, Cremophore®, DMSO-lecitina de huevo), pudiendo por sí mismo provocar efectos secundarios en algunos pacientes (Hu *et al.*, 2004).

La mayor parte de la clase de ansamicinas inhibidoras de Hsp90 portan un resto estructural común: la benzoquinona, que es un aceptor de Michael que puede formar fácilmente enlaces covalentes con nucleófilos tales como proteínas, glutiona, etc. El resto de benzoquinona también sufre un equilibrio redox con la dihidroquinona durante el que se forman radicales de oxígeno que dan lugar a una mayor toxicidad inespecífica (Dikalov *et al.*, 2002).

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar nuevos derivados de ansamicina que puedan tener utilidad en el tratamiento del cáncer y/o tumores malignos de linfocitos B, teniendo, preferentemente, dichas ansamicinas una mejor hidrosolubilidad, un mejor perfil farmacológico y un reducido perfil de efectos secundarios tras su administración. La presente invención describe nuevos análogos de ansamicina generados mediante la biotransformación y, opcionalmente, el diseño genético de la cepa productora precursora. En particular, la presente invención revela nuevos análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina y otros análogos de ansamicina que, generalmente, pueden tener mejores propiedades farmacéuticas en comparación con las ansamicinas disponibles actualmente; en concreto, se espera que presenten mejoras con respecto a una o más de las siguientes propiedades: actividad contra diferentes subtipos de cáncer, toxicidad, hidrosolubilidad, estabilidad metabólica, biodisponibilidad y capacidad de formulación. Preferentemente, los análogos de ansamicina (tales como los análogos de 18,21-didesoxiansamicina) presentan una mejor biodisponibilidad.

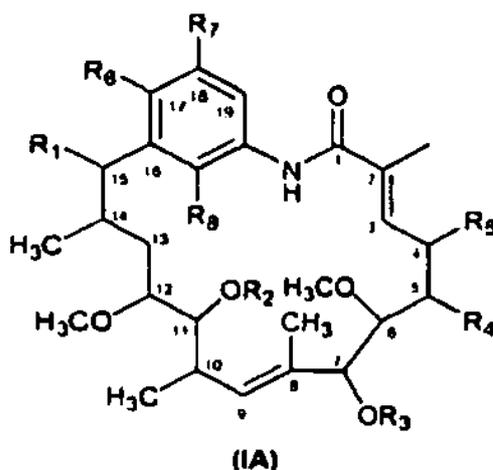
Resumen de la invención

En la presente invención, se han suministrado unidades iniciadoras no naturales a una cepa productora de geldanamicina, opcionalmente, en combinación con la desactivación o la eliminación dirigida de los genes responsables de las modificaciones posteriores a las PKS (modificaciones post-PKS) de la geldanamicina y, opcionalmente, con la introducción de genes posteriores a las PKS (genes post-PKS) apropiados para efectuar las modificaciones post-PKS con el fin de producir nuevos análogos de ansamicina formados mediante la incorporación de una unidad iniciadora no natural y, por ejemplo, lo que da como resultado compuestos de 18,21-didesoxiansamicina que pueden estar opcionalmente sustituidos con flúor o por otros sustituyentes. Opcionalmente, los genes o los reguladores responsables de la biosíntesis de la unidad iniciadora (ácido iniciador) se pueden manipular mediante la desactivación o eliminación dirigida, o se pueden modificar mediante otros medios, tales como la exposición de las células a la radiación UV y la selección del fenotipo que indique la interrupción de la biosíntesis de la unidad iniciadora. El enfoque se puede aplicar a otras ansamicinas tales como herbimicina y reblastatina, así como a autolitimicina. El direccionamiento opcional de los genes post-PKS puede producirse a través de diversos mecanismos, por ejemplo, mediante la integración, la eliminación dirigida de una región de la agrupación de la geldanamicina que incluya todos o algunos de los genes post-PKS, opcionalmente, seguida por la inserción de genes/s u otros procedimientos que vuelvan los genes post-PKS o sus enzimas codificadas en no funcionales, por ejemplo, la inhibición química, la mutagénesis dirigida a un sitio o la mutagénesis de la célula, por ejemplo, mediante el uso de radiación UV. Además, se pueden reintroducir genes post-PKS de la agrupación de la geldanamicina u otra

agrupación de la ansamicina tales como, pero sin limitación, agrupaciones de macbecina, herbimicina, reblastatina o TAN para efectuar modificaciones post-PKS específicas. Como resultado de ello, la presente invención proporciona análogos de ansamicina tales como análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina, procedimientos para la preparación de estos compuestos y procedimientos para el uso de estos compuestos en medicina o como compuestos intermedios en la producción de compuestos adicionales.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona análogos de geldanamicina u otras ansamicinas que carecen de la unidad iniciadora habitual y que tienen incorporada en su lugar una unidad iniciadora que, por ejemplo, produce compuestos de 18,21-didesoxi-ansamicina que pueden estar opcionalmente sustituidos con flúor o otros sustituyentes.

En un aspecto más específico, la presente invención proporciona análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina según la siguiente fórmula (IA) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:



en la que:

- 15 R₁ representa H, OH, OMe;
 R₂ representa H o Me;
 R₃ representa H o CONH₂;
 cualquiera de los dos R₄ y R₅ representa H o, conjuntamente, representan un enlace (i.e. C4 a C5 es un enlace doble);
 20 R₆ representa H, OH, OMe o F;
 R₇ representa H o F;
 R₈ representa H o F.

Los análogos de ansamicina tales como los análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina también se denominan en la presente memoria "compuestos de la invención", usándose dichas expresiones indistintamente en la presente memoria.

25 La estructura anterior muestra un tautómero representativo, y la invención engloba todos los tautómeros de los compuestos de fórmula (IA), por ejemplo, los compuestos ceto en los que se ilustran compuestos enol y viceversa.

La invención engloba todos los estereoisómeros de los compuestos definidos por la estructura (I) mostrada anteriormente.

30 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona análogos de ansamicina tales como compuestos de fórmula (IA) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso como un compuesto farmacéutico.

Definiciones

Los artículos "un", "uno" y "una" se usan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (i.e., al menos uno) de los objetos gramaticales de la partícula. A modo de ejemplo, "un análogo" significa un análogo o más de un análogo.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "análogo/s" se refiere a compuestos químicos que son estructuralmente similares a otros, pero que difieren ligeramente en la composición (como en el reemplazo de un átomo por otro, o en la presencia o ausencia de un determinado grupo funcional).

La expresión "**análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina**", como se usa en la presente solicitud, se refiere a compuestos según la fórmula (IA).

Como se usa en la presente memoria, el término "**homólogo/s**" se refiere a un homólogo de un gen o de una proteína codificada por un gen revelado en la presente memoria, bien de una agrupación biosintética de la macbecina alternativa de una cepa productora de macbecina diferente o un homólogo de una agrupación alternativa de genes de biosíntesis de la ansamicina, por ejemplo, de geldanamicina, herbimicina, autolitimicina o rebblastatina. Dicho/s homólogo/s codifica/n una proteína que realiza la misma función o puede realizar por sí misma la misma función que dicho gen o proteína en la síntesis de la macbecina o un policétido de ansamicina relacionado. Preferentemente, dicho/s homólogo/s tiene/n al menos una identidad secuencial del 40 %, preferentemente, una identidad secuencial del al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % con la secuencia del gen revelado en particular en la presente memoria (Tabla 3, la SEC ID N.º 11, que es una secuencia de todos los genes de la agrupación de la que se pueden deducir las secuencias de determinados genes). El porcentaje de identidad se puede calcular usando cualquier programa conocido por el experto en la técnica tal como BLASTn o BLASTp, disponibles en el sitio web de NCBI.

Como se usa en la presente memoria, el término "**cáncer**" se refiere a un nuevo crecimiento benigno o maligno de células en la piel o en órganos del cuerpo, por ejemplo, pero sin limitación, mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, cerebro, estómago o intestino. Los cánceres tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y propagarse (metástasis) a órganos distantes, por ejemplo, al hueso, hígado, pulmón o cerebro. Como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" incluye tanto tipos de células tumorales metastásicas tales como, pero sin limitación, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y mastocitoma, como tipos de carcinomas de tejidos tales como, pero sin limitación, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer primario de hígado y cáncer de ovario.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "**tumores malignos de linfocitos B**" incluye un grupo de trastornos que incluyen leucemia linfocítica crónica (LLC), mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin (LNH). Se trata de enfermedades neoplásicas de la sangre y de los órganos hematopoyéticos que provocan insuficiencias de la médula ósea y del sistema inmune, convirtiendo al huésped en muy susceptible a la infección y la hemorragia

Como se usa en la presente memoria, el término "**biodisponibilidad**" se refiere al grado hasta el que o a la velocidad a la que se absorbe un fármaco u otra sustancia o se vuelve disponible en el sitio de la actividad biológica tras su administración. Esta propiedad depende de una serie de factores entre los que se incluyen la solubilidad del compuesto, la tasa de absorción en el intestino, el grado de unión de proteínas y el metabolismo, etc. En Egorin *et al.* (2002), se describen diversas pruebas de biodisponibilidad que serían familiares para el experto en la técnica.

El término "**hidrosolubilidad**", como se usa en la presente solicitud, se refiere a la solubilidad en medios acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,3.

La expresión "**cepa productora de ansamicina**", como se usa en la presente solicitud, se refiere a cepas, por ejemplo, cepas de tipo natural, como las ejemplificadas por un estreptomiceto, tales como cepas productoras de geldanamicina, cepas productoras de herbimicina, cepas productoras de rebblastatina y cepas productoras de autolitimicina. Así pues, los ejemplos incluyen NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* o DSM4137 de *Streptomyces* sp. o DSM40699 de *Streptomyces violaceusniger*, que producen ansamicinas tales como geldanamicina o herbimicinas (por ejemplo, herbimicina A, B o C), y S6699 de *Streptomyces* sp. o JX-47 de *Streptomyces autolyticus*, que producen ansamicinas tales como rebblastatina o autolitimicina cuando se cultivan en condiciones adecuadas, por ejemplo, cuando se suministran al alimento iniciador natural ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico.

Así pues, la expresión "**cepa productora de geldanamicina**", como se usa en la presente solicitud, se refiere a cepas, por ejemplo, a cepas de tipo natural como las ejemplificadas por un estreptomiceto, tales como NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* o DSM4137 de *Streptomyces* sp. o DSM40699 de *Streptomyces violaceusniger* que producen geldanamicina cuando se cultivan en condiciones adecuadas, por ejemplo, cuando se suministran al alimento iniciador natural ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico.

La expresión "**cepa productora de herbimicina**", como se usa en la presente solicitud, se refiere a cepas, por ejemplo, a cepas de tipo natural como las ejemplificadas por AM-3672 de *Streptomyces hygroscopicus*, que producen herbimicinas, por ejemplo, herbimicina A, B o C cuando se cultivan en condiciones adecuadas, por ejemplo, cuando se suministran al alimento iniciador natural ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "**genes post-PKS**" se refiere a los genes necesarios para las modificaciones posteriores a las policétido sintetas del policétido, por ejemplo, pero sin limitación, monooxigenasas, O-metiltransferasas y carbamoiltransferasas. Específicamente, en el sistema de la macbecina, estos genes modificadores incluyen *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* y *mbcP450*.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "**gen/es de biosíntesis de la unidad iniciadora**" se refiere a los genes necesarios para la producción de la unidad iniciadora incorporada de manera natural, el ácido 3-amino-5-

5 hidroxibenzoico (AHBA). Específicamente, en el sistema de la macbecina, estos genes de biosíntesis de la unidad iniciadora incluyen *AHk* (AHBA quinasa), *Adh* (aDHQ deshidrogenasa), *AHs* (AHBA sintasa), *OX* (oxidoreductasa), *PH* (fosfatasa). Específicamente, en el sistema de la geldanamicina, se propone que el gen *gdmO* codifica la aminodeshidroquinato sintasa necesaria para la síntesis del AHBA (Rascher *et al.*, 2003) y en el sistema de la herbimicina, se ha identificado *hbmO* (Rascher *et al.*, 2005). Otras cepas que producen AHBA también contienen genes de biosíntesis del AHBA.

10 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención tales como los compuestos de fórmula (I) incluyen sales convencionales formadas a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, así como sales de adición de ácido de amonio cuaternario. Ejemplos más específicos de sales ácidas adecuadas incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, perclórico, fumárico, acético, propiónico, succínico, glicólico, fórmico, láctico, maleico, tartárico, cítrico, palmoico, malónico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, hidroxinaftoico bencenosulfónico, yodhídrico, málico, esteroico, tánico y similares. Otros ácidos tales como el ácido oxálico, aunque no son en sí mismos farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de sales
15 útiles como compuestos intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos más específicos de sales básicas adecuadas incluyen sales sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, cinc, *N,N'*-dibenciletildiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, *N*-metilglucamina y procaína. Las referencias realizadas en lo sucesivo a un compuesto según la invención incluyen tanto compuestos de fórmula (I) como sus sales farmacéuticamente aceptables

20 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Representación de la biosíntesis de la geldanamicina que muestra el primer compuesto intermedio libre de enzima putativa, la progeldanamicina, y el procesamiento post-PKS en geldanamicina. La lista de las etapas de procesamiento de PKS de la figura no pretende representar el orden de los hechos. Para designar determinados genes de la agrupación, se usan las siguientes abreviaturas: ALO: dominio de carga de AHBA; ACP: proteína transportadora de acilo; KS: β -quetosintasa; AT: acil transferasa; OH: deshidratasa; ER: enoil reductasa; KR: β -quetorreductasa.
25

Figura 2: Representación de los sitios de procesamiento post-PKS de la pro-geldanamicina para dar geldanamicina.

Figura 3: Estructuras de los compuestos (14-25) descritas en los Ejemplos.

Figura 4: Estructuras de los compuestos (26-37) descritas en los Ejemplos.

30 **Descripción de la invención**

La presente invención proporciona análogos de ansamicina, como los expuestos anteriormente, procedimientos para la preparación de estos compuestos, procedimientos para el uso de estos compuestos en medicina y el uso de estos compuestos como compuestos intermedios o moldes para una posterior derivación semisintética.

Cuando R_6 representa H o OH, entonces no todos los R_7 , R_8 y R_9 representan H.

35 Lo adecuado es que R represente H o OH. En otra realización R_1 representa H. En otra realización, R_1 representa OH.

Lo adecuado es que R_2 represente H.

Lo adecuado es que R_3 represente CONH_2 .

En una realización, lo adecuado es que R_4 y R_5 representen juntos un enlace.

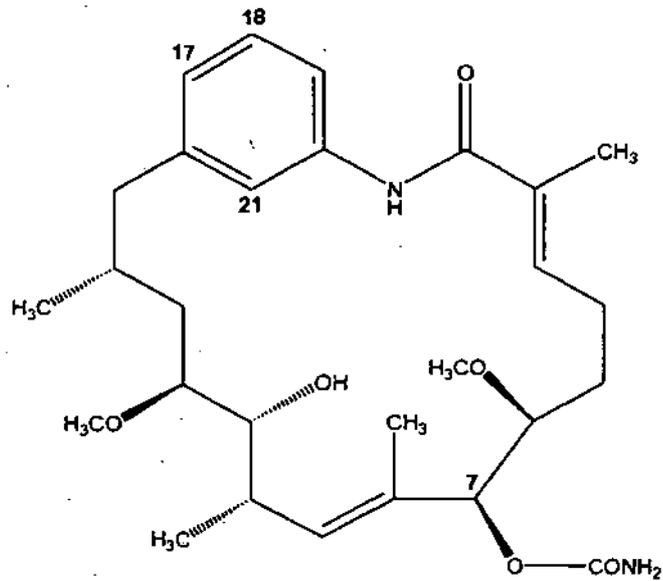
40 En otra realización, lo adecuado es que R_4 y R_5 representen cada uno H.

En una realización, lo adecuado es que R_1 represente H, R_2 represente H, R_3 represente CONH_2 , y cada uno de R_4 y R_5 represente H.

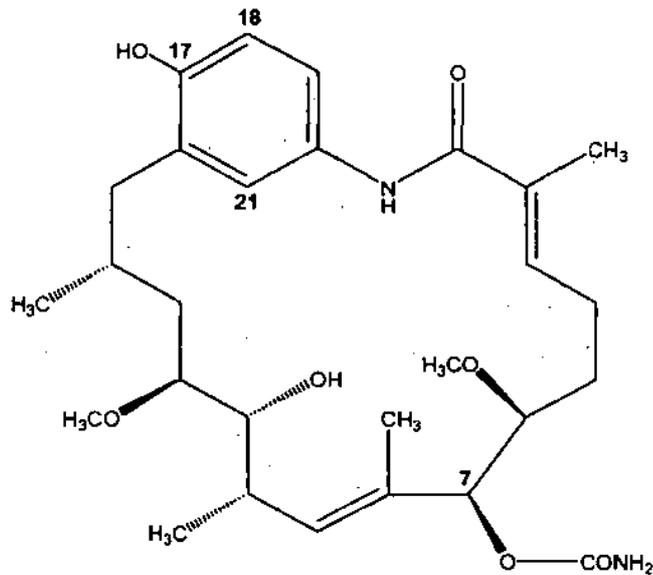
En una realización, lo adecuado es que R_1 represente OH, R_2 represente H, R_3 represente CONH_2 , y cada uno de R_4 y R_5 represente H.

45 En una realización, lo adecuado es que R_1 represente H, R_2 represente H, R_3 represente CONH_2 , cada uno de R_4 y R_5 represente H y R_6 represente OH.

En una realización adecuada de la invención, R_1 representa H, R_2 representa H, R_3 representa CONH_2 , cada uno de R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 representa H, por ejemplo, según lo representado por la siguiente fórmula:

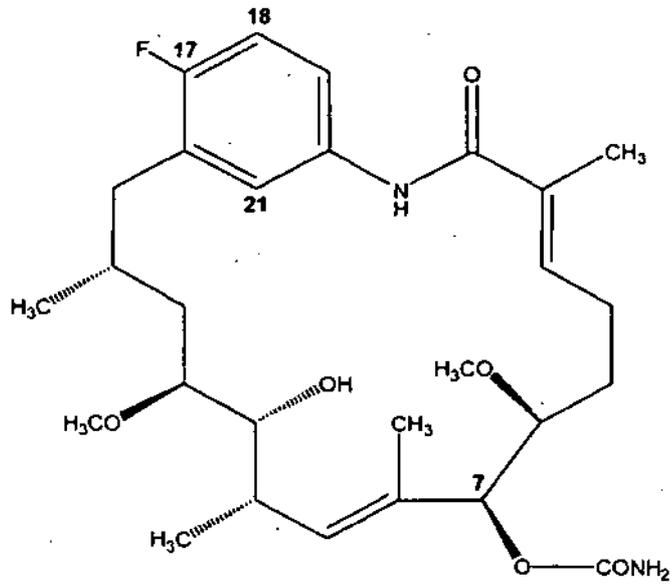


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa OH, y cada uno de R₇ y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

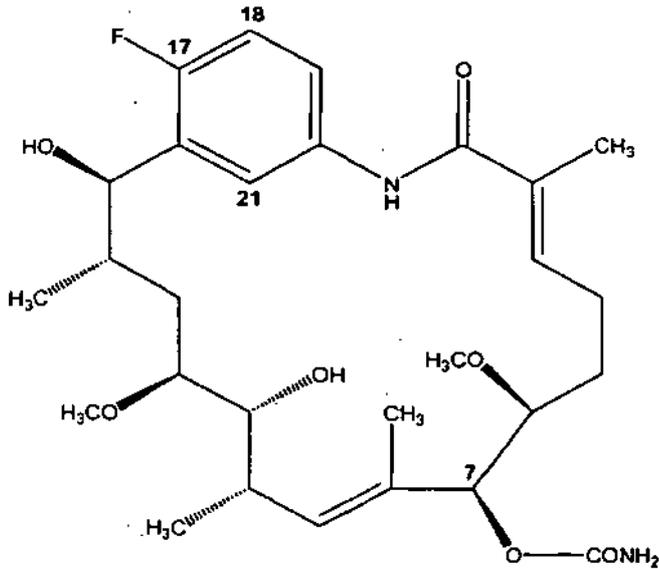


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa F, y cada uno de R₇ y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa por la siguiente estructura:

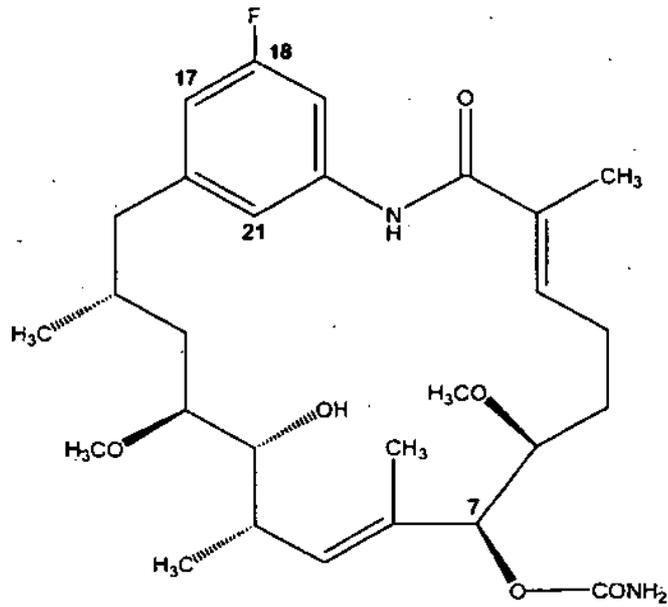


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa F, y cada uno de R₇ y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

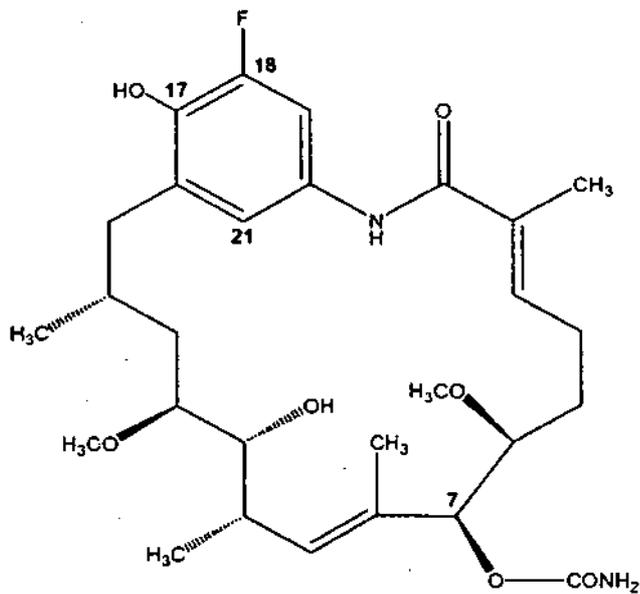


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa H, R₇ representa F y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

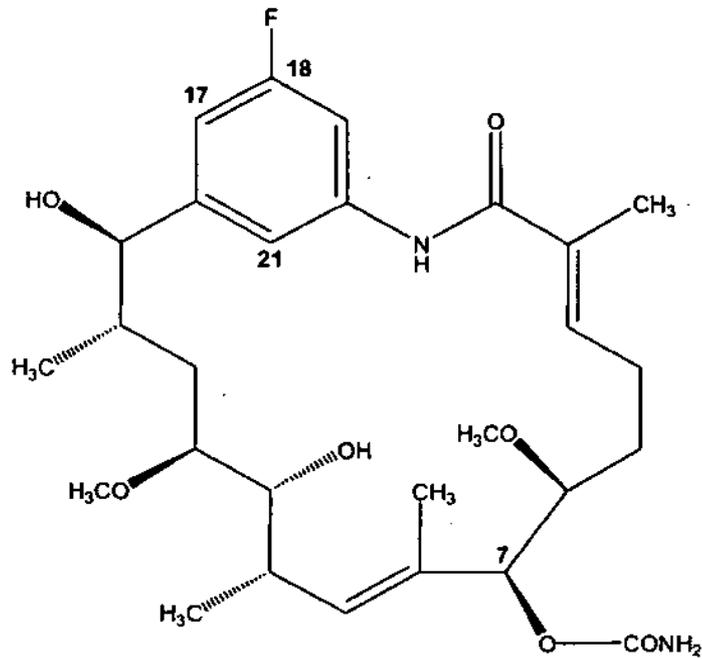


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa OH, R₇ representa F y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

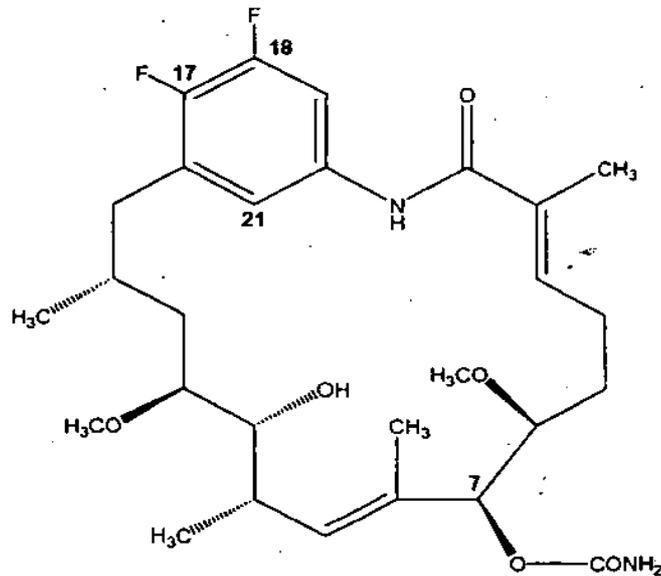


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa H, R₇ representa F y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

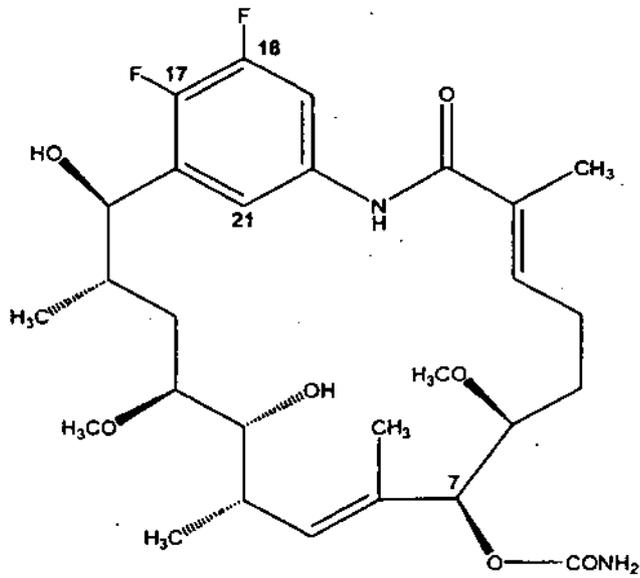


En otra realización adecuada de la invención R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, cada uno de R₆ y R₇ representa F y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

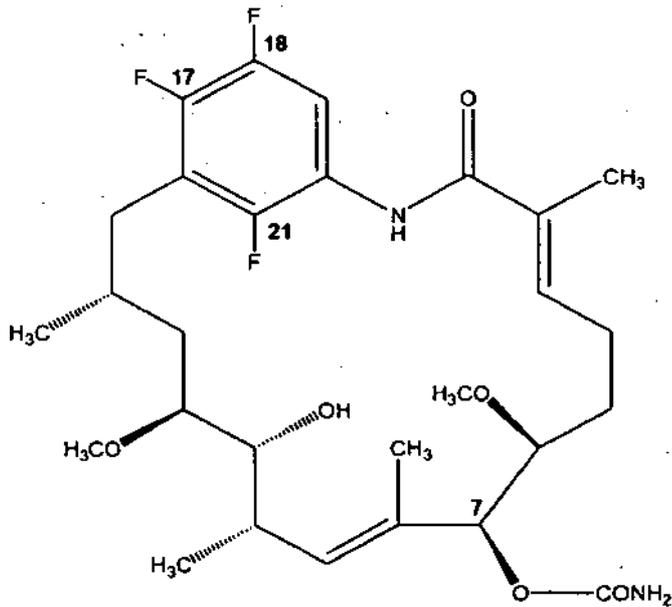


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, cada uno de R₆ y R₇ representa F y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:



En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, cada uno de R₆, R₇ y R₈ representa F, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

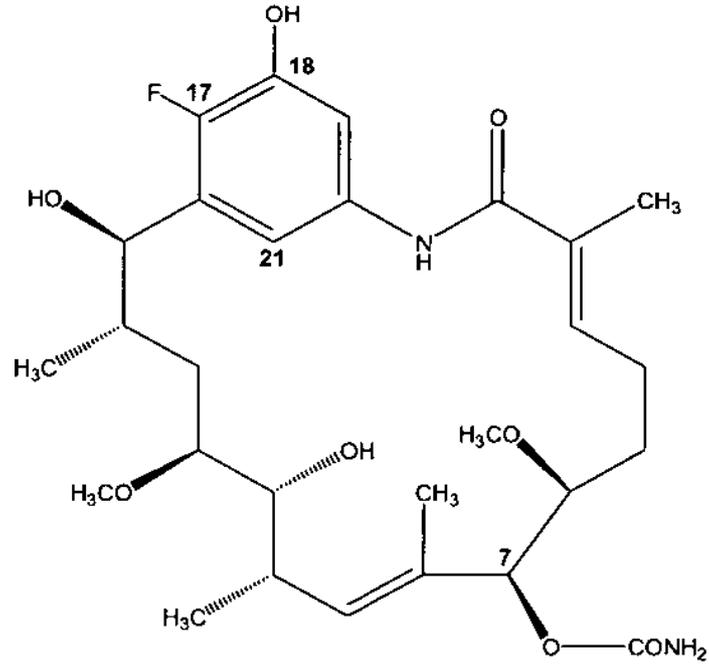


5

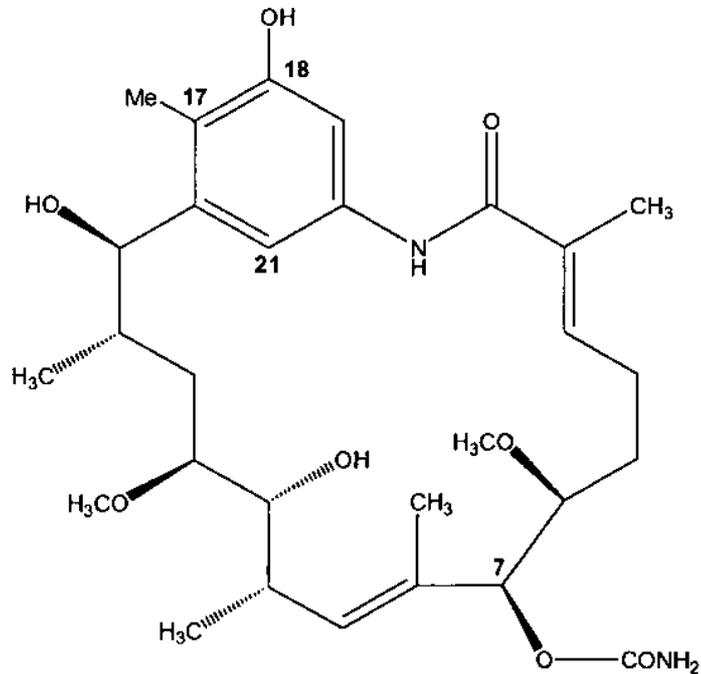
En una realización de la invención, no todos los R₆, R₇ y R₈ representan H, y en particular, al menos uno de R₆, R₇ y R₈ representa F.

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa F, R₇ representa OH y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

10

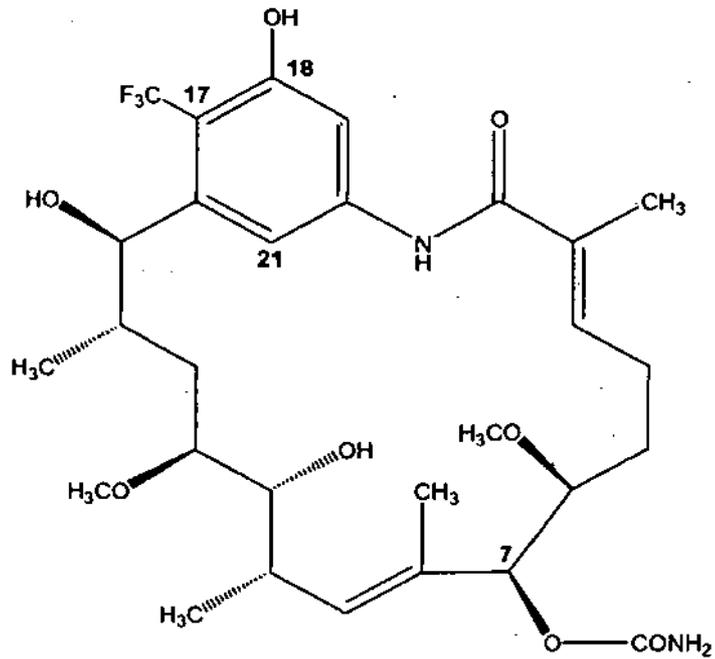


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa Me, R₇ representa OH y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

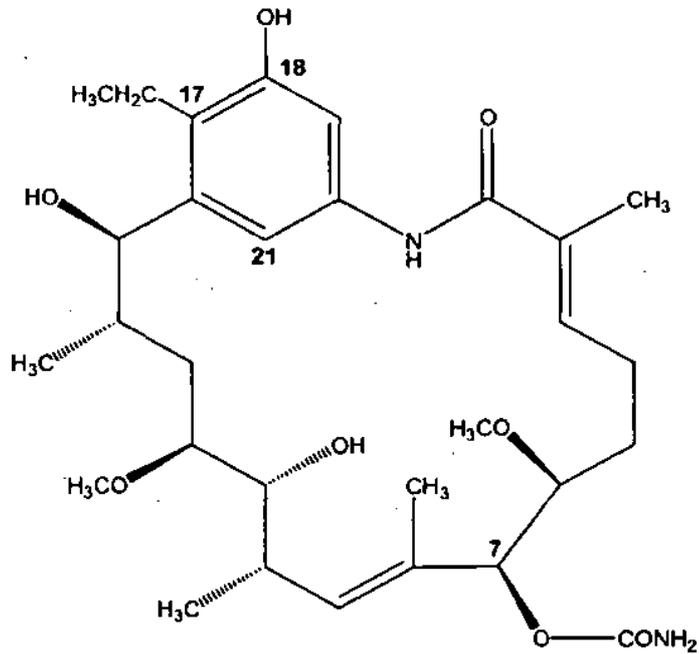


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa CF₃, R₇ representa OH y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

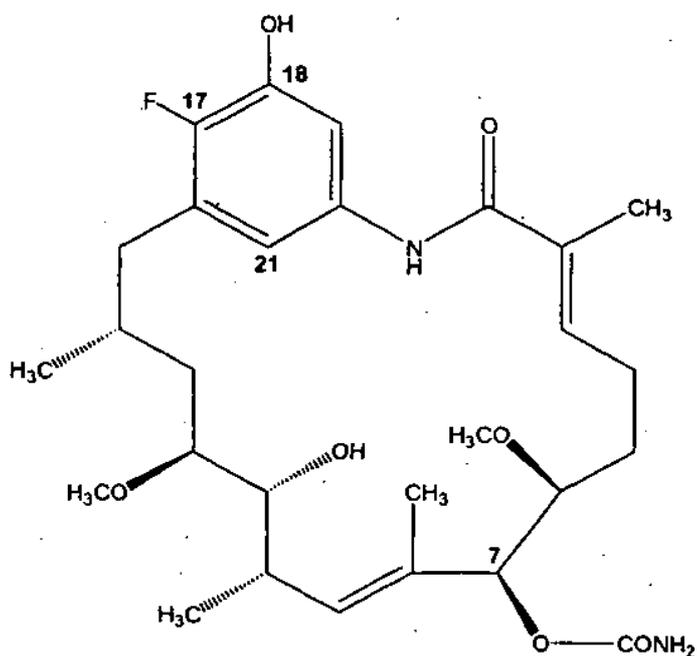


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa CH₂CH₃, R₇ representa OH y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

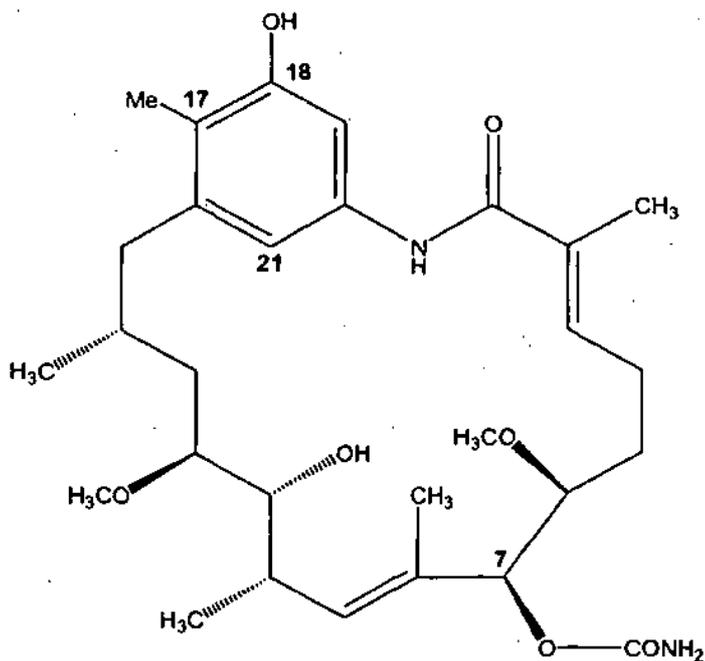


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa F, R₇ representa OH y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

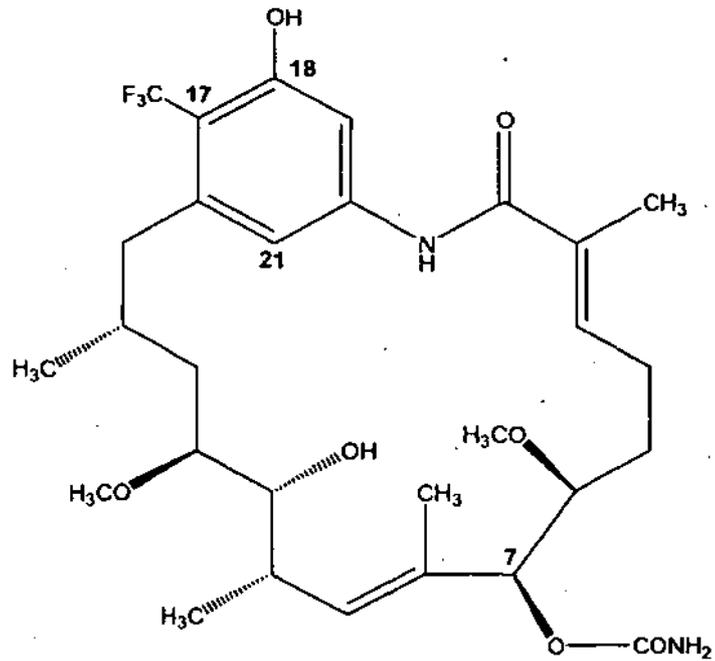


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa Me, R₇ representa OH y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

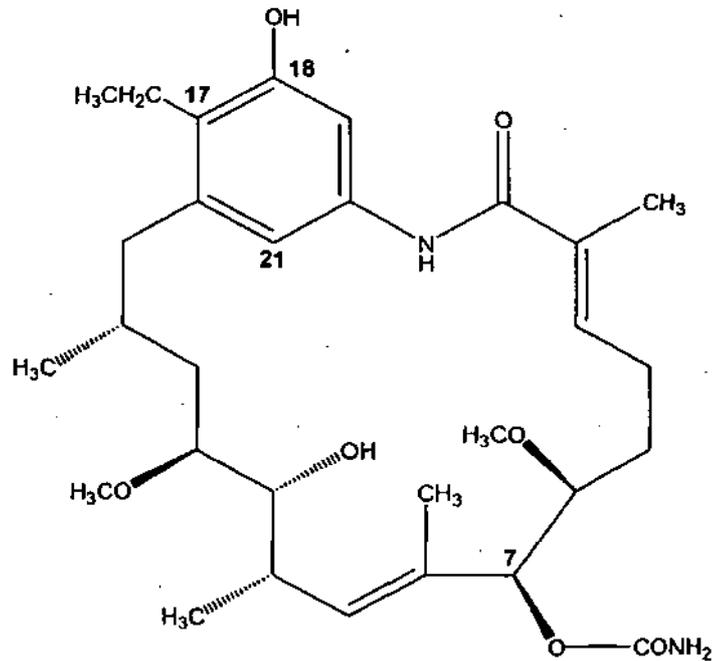


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa CF₃, R₇ representa OH y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

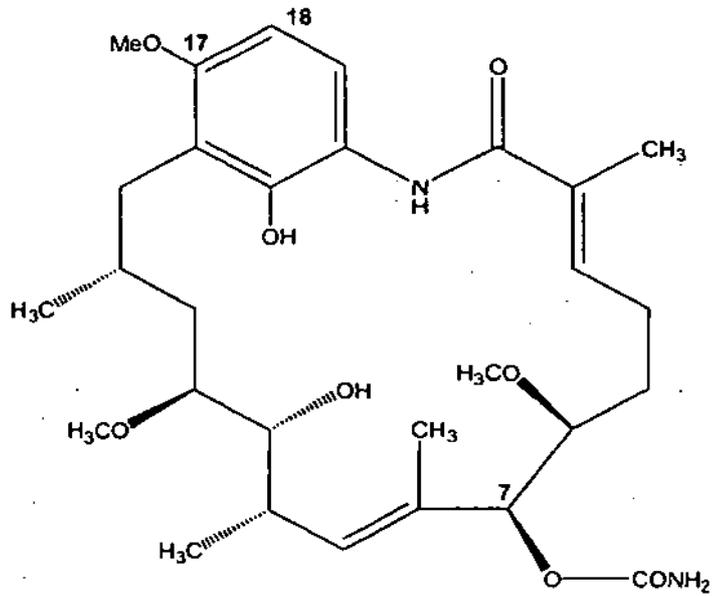


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa CH₂CH₃, R₇ representa OH y R₈ representa H, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

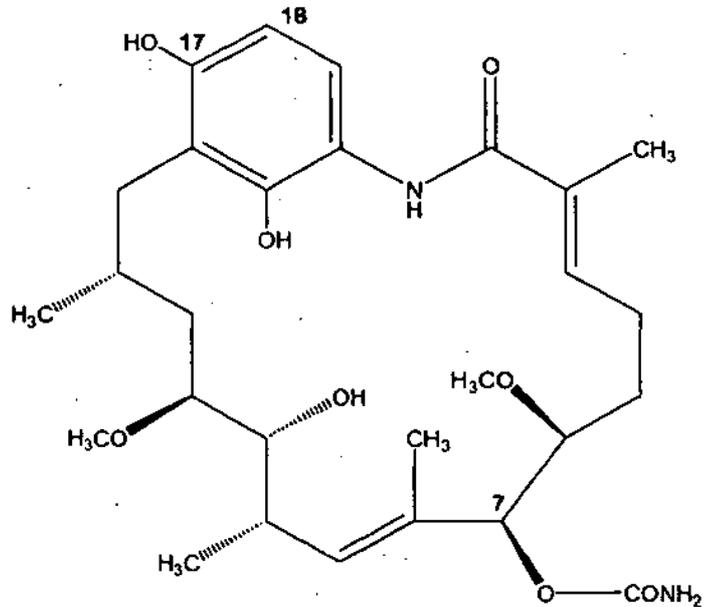


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa OMe, R₇ representa H y R₈ representa OH, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

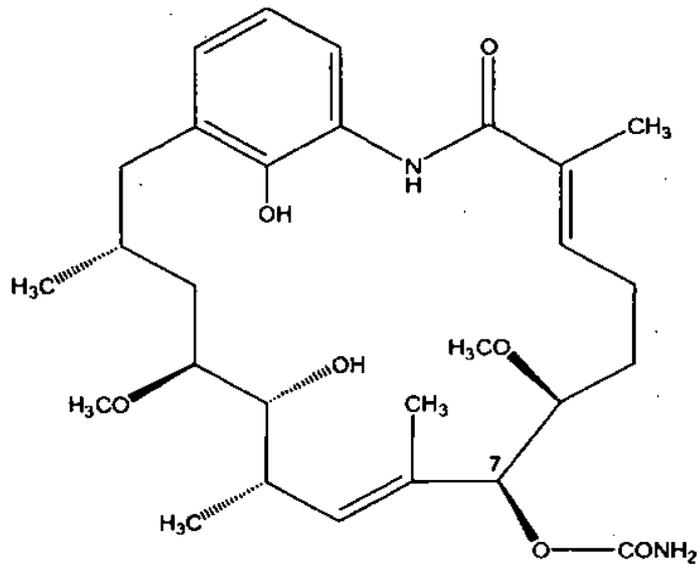


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa OH, R₇ representa H y R₈ representa OH, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

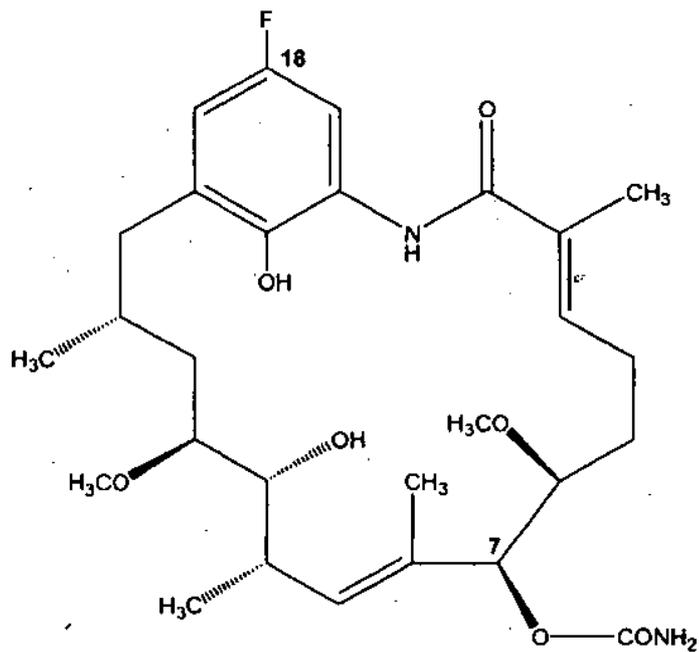


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa H, R₇ representa H y R₈ representa OH, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

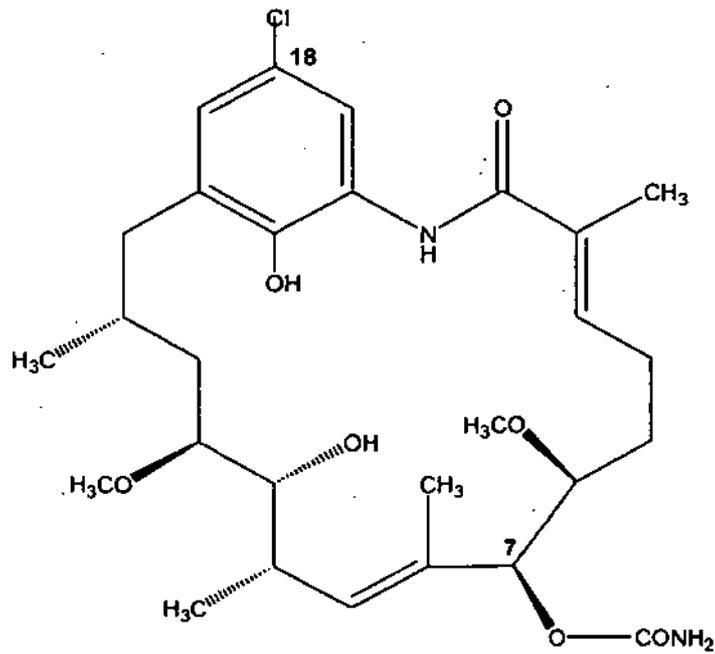


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa H, R₇ representa F y R₈ representa OH, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

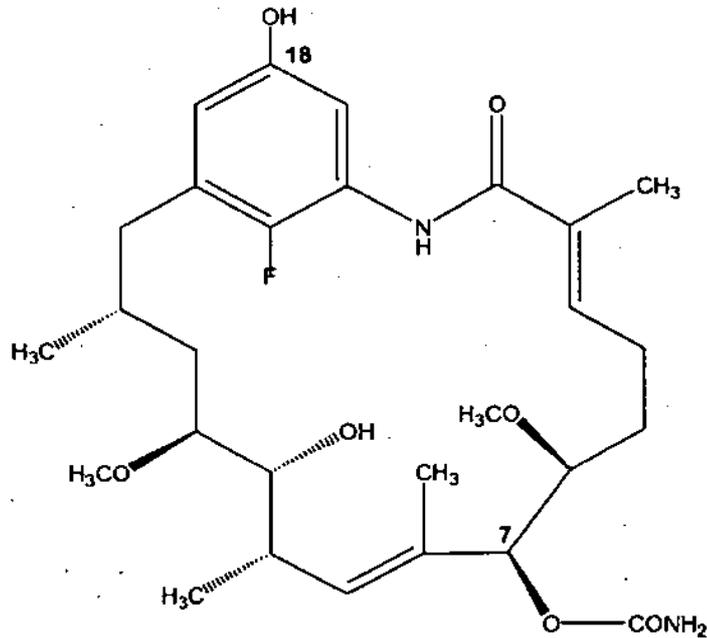


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa H, R₇ representa Cl y R₈ representa OH, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

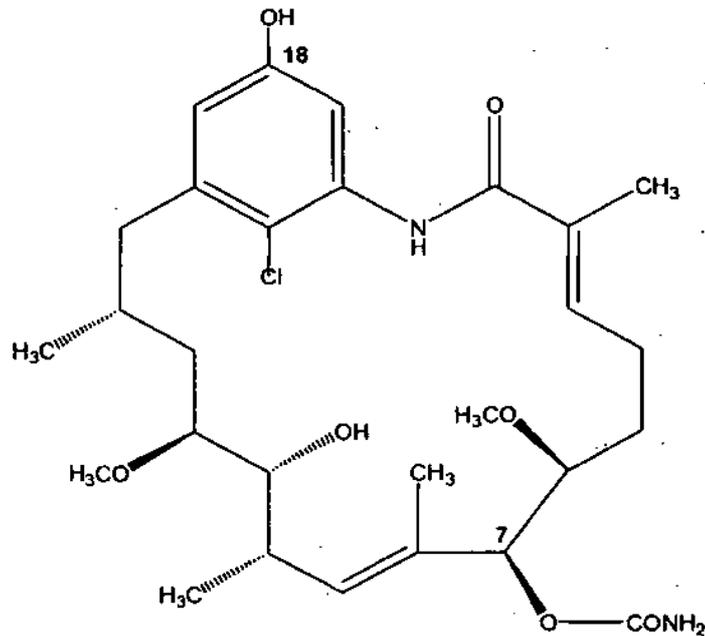


En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa H, R₇ representa OH y R₈ representa F, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:

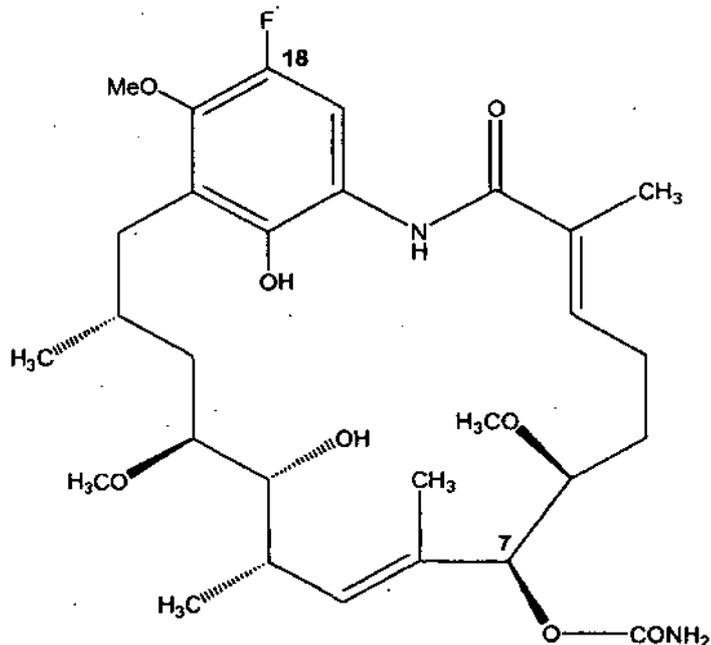


5

En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa H, R₇ representa OH y R₈ representa Cl, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:



En otra realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₄ y R₅ representa H, R₆ representa OMe, R₇ representa F y R₈ representa OH, por ejemplo, como se representa en la siguiente estructura:



5

En otra realización de la invención, todos los R₆, R₇ y R₈ representan H.

En otra realización, R₇ y R₈ no representan OH, R₉ representa H y uno o más de R₆, R₇ y R₈ representan F.

En otra realización de la invención, cuando R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, R₄ y R₅ representan H, R₆ representa H y R₇ representa H, entonces R₇ no representa H.

10

En los ejemplos, se describen otras realizaciones adecuadas, y se ilustran en las Figuras 3 y 4.

La estereoquímica preferida de las cadenas laterales de no hidrógeno del anillo ansa es como se muestra en las Figuras 1 y 2 de más adelante (es decir, la estereoquímica preferida sigue la de la geldanamicina).

La presente invención también proporciona el uso de un análogo de ansamicina como sustrato para su posterior modificación bien mediante biotransformación o mediante química sintética. En un aspecto, la presente invención proporciona un análogo de ansamicina para su uso como un medicamento. En una realización específica, la

15

presente invención proporciona un análogo de ansamicina para su uso en el tratamiento de cáncer, tumores malignos de linfocitos B, malaria, infección fúngica, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas, enfermedades dependientes de la angiogénesis, enfermedades autoinmunes y/o como un pretratamiento profiláctico del cáncer.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un análogo de ansamicina en la fabricación de un medicamento. En una realización específica, la presente invención proporciona el uso de un análogo de ansamicina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, tumores malignos de linfocitos B, malaria, infección fúngica, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas, enfermedades dependientes de la angiogénesis, enfermedades autoinmunes y/o como un pretratamiento profiláctico del cáncer.

10 Como se ha indicado anteriormente, cabe esperar que los compuestos de la invención sean útiles en el tratamiento del cáncer y tumores malignos de linfocitos B. Los compuestos de la invención y, especialmente, los que pueden tener mejor selectividad por Hsp90 y/o un mejor perfil de toxicología y/o mejores farmacocinéticas también pueden ser eficaces en el tratamiento de otras indicaciones, por ejemplo, pero sin limitación, malaria, infección fúngica, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas, enfermedades dependientes de la
15 angiogénesis, enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide, o como un pretratamiento profiláctico del cáncer.

Las enfermedades del sistema nervioso central y las enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedades priónicas, atrofia muscular espinal y bulbar (AMEB) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

20 Las enfermedades dependientes de la angiogénesis incluyen, pero sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética y otros diversos trastornos oftalmológicos, aterosclerosis y artritis reumatoide.

Las enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes de tipo I, lupus sistémico eritematoso y psoriasis.

25 "Paciente" incluye sujetos humanos y otros animales (especialmente, mamíferos), preferentemente, sujetos humanos. Por consiguiente, los procedimientos y usos de los análogos de ansamicina de la invención son de uso en medicina humana y veterinaria, preferentemente, medicina humana.

Los compuestos de la invención anteriormente mencionados o una formulación de los mismos se pueden administrar mediante cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, pero sin limitación, se pueden administrar parenteralmente (incluyendo la administración intravenosa), oralmente, tópicamente (incluyendo bucal, sublingual o
30 transdérmicamente), a través de un dispositivo médico (por ejemplo, un stent), por inhalación o mediante inyección (subcutánea o intramuscular). El tratamiento puede consistir en una sola dosis o en una pluralidad de dosis durante un período de tiempo.

Si bien es posible administrar un compuesto de la invención solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica junto con uno o más diluyentes o vehículos aceptables. Así pues, se proporciona una composición
35 farmacéutica que comprende un compuesto de la invención junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. El/los diluyentes/s o vehículo/s debe/n ser "aceptable/s" en el sentido de ser compatibles con el compuesto de la invención y no perjudiciales para los receptores de los mismos. Los ejemplos de vehículos adecuados se describen a continuación más detalladamente.

40 Los compuestos de la invención se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. La administración conjunta de dos (o más) agentes puede permitir el uso de dosis significativamente más bajas de cada uno, reduciendo así los efectos secundarios observados. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un agente terapéutico adicional junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención en terapia de combinación con un segundo agente, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer o de tumores malignos de linfocitos B.

En una realización, se administra un compuesto de la invención conjuntamente con otro agente terapéutico, por ejemplo, un agente terapéutico para el tratamiento del cáncer o de tumores malignos de linfocitos B. Los agentes preferidos incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos convencionales tales como bleomicina, capecitabina, cisplatino, citarabina, ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, leucovorina, metotrexato, mitoxantona, taxanos que incluyen paclitaxel y docetaxel, vincristina, vinblastina y vinorelbina; las terapias hormonales, anastrozol, goserelina, acetato de megestrol, prenisona, tamoxifeno y toremifeno; las terapias de anticuerpos monoclonales tales como el trastuzumab (anti-Her2), cetuximab (ant-EGFR) y bevacizumab (anti-VEGF); y los inhibidores de la proteína quinasa tales como imatinib, dasatinib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, temsirolimus; los inhibidores del proteasoma tales como bortezomib; inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) tales como el vorinostat; inhibidores de la angiogénesis tales como sunitinib, sorafenib, lenalidomida. Además, se
55 pueden administrar un compuesto de la invención en combinación con otras terapias, incluyendo, pero sin limitación,

radioterapia o cirugía.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos ampliamente conocidos en la técnica farmacéutica. Dichos procedimientos incluyen la etapa de asociar el principio activo (compuesto de la invención) con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Los compuestos de la invención se administrarán normalmente por vía oral o por cualquier vía parenteral en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente, en forma de una sal de adición de ácido o base no tóxica orgánica o inorgánica, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y del paciente que se vaya a tratar, así como de la vía de administración, las composiciones se pueden administrar a dosis variables.

Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada.

Dichos comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferentemente, almidón de maíz, almidón de patata o tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención se pueden combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Se puede fabricar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente, con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en forma suelta tal como un polvo o gránulos, opcionalmente, mezclado con un aglutinante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada), tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos o con incisiones, y pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado.

Formulaciones según la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades diferenciadas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada una cantidad predeterminada del principio activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de solución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso, o en forma de emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también se puede presentar como un bolo, electuario o pasta.

Formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente, sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

Debe entenderse que, además de los ingredientes particularmente mencionados con anterioridad, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para una administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizados, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos y similares. Estas composiciones se pueden preparar mediante procedimientos convencionales que contienen el agente activo. Por lo tanto, también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para las lociones. Dichos vehículos pueden estar presentes del aproximadamente 1 % al aproximadamente 98 % de la composición. Más habitualmente, constituirán aproximadamente hasta el 80 % de la composición. Únicamente a modo ilustrativo, las cremas o pomadas se

preparan mezclando cantidades suficientes de material hidrófilo y agua que contienen aproximadamente el 5-10 % en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tenga la consistencia deseada.

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas a la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, el agente activo se puede suministrar desde el parche por iontoforesis.

Para aplicaciones a tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las composiciones se aplican preferentemente en forma de pomada o crema tópica. Cuando se formulan en una pomada, el agente activo se puede emplear con una base de pomada bien parafínica o hidromiscible.

10 Alternativamente, el principio activo se puede formular en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

15 Para la administración parenteral, las formas líquidas de dosificación unitaria se preparan usando el principio activo y un vehículo estéril, por ejemplo, pero sin limitación, agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, prefiriéndose el agua. El principio activo, dependiendo del vehículo y de la concentración usada, puede estar suspendido o disuelto en el vehículo. En la preparación de soluciones, el principio activo se puede disolver en agua para inyección y esterilizar por filtración antes de usarlo para rellenar un vial o ampolla adecuado y sellarlo.

20 Ventajosamente, se pueden disolver en el vehículo agentes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes de tamponamiento. Para mejorar la estabilidad, se puede congelar la composición tras usarla para rellenar un vial y retirar el agua al vacío. Luego se sella el polvo liofilizado seco en el vial, pudiéndose suministrar un vial adjunto de agua para inyección para reconstituir el líquido antes de su uso.

25 Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera que las soluciones, excepto que el principio activo se suspende en el vehículo en lugar de disolverse, y la esterilización no puede efectuarse mediante filtración. El principio activo puede esterilizarse mediante su exposición a óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un agente tensioactivo o humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme del principio activo.

30 Los compuestos de la invención también se pueden administrar usando dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en los documentos US 5.399.163; US 5.383.851; US 5.312.335; US 5.064.413; US 4.941.880; US 4.790.824; o US 4.596.556. Entre los ejemplos de implantes y módulos ampliamente conocidos útiles en la presente invención se incluyen: documento US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar el medicamento a una velocidad controlada; documento US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; documento US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicamento para administrar el medicamento a una velocidad de infusión exacta; documento US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua del fármaco; documento US 4.439.196, que describe un sistema de administración osmótica de fármacos que tiene compartimientos de múltiples cámaras; y documento US 4.475.196, que describe un sistema de administración osmótica de fármacos. Los expertos en la técnica conocen muchos otros de dichos implantes, sistemas de administración y módulos.

40 La dosis por administrar de un compuesto de la invención variará según el compuesto en particular, la enfermedad implicada, el sujeto, la naturaleza y gravedad de la enfermedad, el estado físico del sujeto y la vía de administración seleccionada. Cualquier experto en la técnica puede determinar fácilmente la dosis apropiada.

Las composiciones pueden contener el 0,1 % en peso, preferentemente, el 5-60 %, más preferentemente, el 10-30 % en peso de un compuesto de la invención, dependiendo del procedimiento de administración.

45 El experto en la técnica reconocerá que la cantidad óptima y el espacio de tiempo entre cada dosis de un compuesto de la invención estará determinado por la naturaleza y el grado de la afección que se esté tratando, la forma, la vía y el sitio de administración, y la edad y el estado del sujeto que se está tratando en particular, y que, en última instancia, será un médico quien determine las dosis apropiadas que se vayan a usar. Esta dosificación se puede repetir con la frecuencia que sea apropiada. Si se desarrollan efectos secundarios, es posible modificar o reducir la cantidad y/o la frecuencia de la dosificación de acuerdo con la práctica clínica normal.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona procedimientos para la producción de análogos de ansamicina.

55 Los policétidos de ansamicina, por ejemplo, la geldanamicina y la herbimicina, son sintetizados por agrupaciones de biosíntesis de policétidos que son ampliamente conocidas en la técnica. Cabe considerar que la geldanamicina se biosintetiza en dos etapas. En la primera etapa, los genes PKS del núcleo ensamblan el núcleo del macrólido mediante el ensamblaje repetido de precursores de ácido carboxílico simples, dando una cadena de policétido que luego se cicla para formar la primera "progeldanamicina" intermedia libre de enzimas, véase la Figura 1. En la

segunda etapa, actúa una serie de enzimas de adaptación a "post-PKS" (por ejemplo, una monooxigenasa del citocromo P450, metiltransferasas, oxigenasas dependientes de FAD y una carbamoiltransferasa) para agregar los diversos grupos adicionales al molde de progeldanamicina, que produce la estructura final del compuesto precursor, véase la Figura 2. Los análogos de ansamicina se pueden biosintetizar de una manera similar. Se puede aprovechar esta producción biosintética mediante la biotransformación opcionalmente combinada con el diseño genético de cepas productoras adecuadas para dar como resultado la producción de nuevos compuestos.

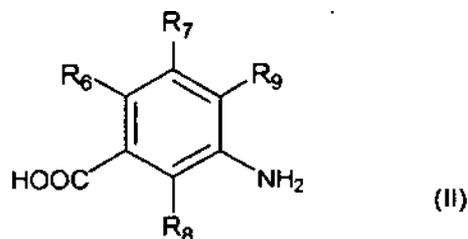
Sorprendentemente, los inventores han descubierto que suministrando a cepas productoras de ansamicina unidades iniciadoras no naturales (ácidos iniciadores o análogos de los mismos tales como ésteres), es posible incorporar estas unidades iniciadoras a las estructuras de ansamicina para producir nuevos análogos de ansamicina.

Así pues, según la invención, se proporciona un procedimiento para preparar un análogo de ansamicina que comprende:

- a) proporcionar una cepa que produzca una ansamicina tal como geldanamicina, una herbimicina (herbimicina A, B o C) o uno de sus análogos cuando se cultive en condiciones apropiadas;
- b) suministrar una unidad iniciadora que no sea AHBA a dicha cepa de modo que la unidad iniciadora se incorpore a dicho análogo de ansamicina;
- c) cultivar dicha cepa en condiciones adecuadas para la producción de un análogo de ansamicina; y
- d) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.

Lo adecuado es que la cepa de a) se caracterice por ser una cepa en la que se hayan eliminado o desactivado uno o más genes de la biosíntesis de AHBA. Esto puede evitar la competición por la incorporación de una unidad iniciadora no natural por parte de AHBA, lo que reduciría el rendimiento. Alternativamente, se puede mutar la cepa de a) para reducir la eficacia de la biosíntesis de AHBA. Lo adecuado es que las condiciones de etapa c) sean tales que la eficacia de la biosíntesis de AHBA sea sub-óptima. Por lo tanto, lo deseable es que el AHBA sea producido por la cepa hasta un nivel que, no obstante, permita la incorporación de la unidad iniciadora no natural suministrada. Lo común es que la cantidad de unidad iniciadora no natural suministrada incorporada sea de > 20 %, preferentemente, de >50 % de la incorporación de unidades iniciadoras totales.

Lo adecuado es que la unidad iniciadora se seleccione de:



en la que R_6 , R_7 , R_8 y R_9 son como se han definido anteriormente; o uno de sus análogos en el que se derive el resto ácido al como un éster (por ejemplo, el metilo o el etiléster).

Lo adecuado es que la unidad iniciadora no sea: ácido 3,5-diamino-benzoico, ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico o ácido 3-amino-4-clorobenzoico.

En una realización, la unidad iniciadora es un compuesto de fórmula (II), en la que R_6 , R_7 , R_8 y R_9 representan todos H.

En otra realización, la unidad iniciadora es un compuesto de fórmula (II), en la que R_6 , R_7 , R_8 y R_9 no representan todos H.

Otros ejemplos de unidades iniciadoras incluyen, pero sin limitación, aquéllos compuestos mostrados en las segundas columnas de las Tablas 4 y 5 que figuran más adelante, así como sus derivados apropiados (tales como sales y ésteres, etc.).

En una realización, la cepa es una cepa productora de ansamicina (por ejemplo, una cepa productora de geldanamicina o herbimicina) y la unidad iniciadora se selecciona de modo que la cepa produzca un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina.

En una realización, la unidad iniciadora se selecciona de modo que la cepa produzca un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina que esté opcionalmente sustituido con flúor.

En una realización, la unidad iniciadora se selecciona de modo que la cepa produzca un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina que esté sustituido con flúor.

En otra realización, la cepa es una cepa productora de macbecina y la unidad iniciadora se selecciona de modo que la cepa produzca un análogo de macbecina que no esté sustituido en las posiciones 18 ni 21 del anillo de benceno.

Lo adecuado es que el procedimiento (i) comprenda además la etapa de someter el producto de la etapa (d) a un procedimiento de modificación química o biotransformación, opcionalmente, seguido de la etapa de aislamiento de los compuestos resultantes o (ii) que comprenda además la etapa de someter el producto de la etapa (c) a un procedimiento de modificación química o biotransformación anterior a la etapa (d).

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para generar análogos tales como análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina, procedimiento que comprende:

- a) proporcionar una primera cepa huésped que produzca una ansamicina o un análogo de la misma cuando se cultive en condiciones apropiadas en la que, opcionalmente, se hayan eliminado o desactivado uno o más genes post-PKS y/o se hayan eliminado o desactivado uno o más genes de biosíntesis de la unidad iniciadora;
- b) suministrar a dicha cepa una unidad iniciadora no natural;
- c) cultivar dicha cepa huésped modificada en condiciones adecuadas para la producción de análogos de ansamicina tales como análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina; y
- d) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.

Lo adecuado es que la unidad iniciadora suministrada sea un ácido iniciador:

En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para producir análogos de 18,21-didesoxiansamicina, procedimiento que comprende:

- a) proporcionar una primera cepa huésped que produzca una ansamicina tal como geldanamicina, herbimicinas (por ejemplo, herbimicina A, B o C) o uno de sus análogos cuando se cultiva en condiciones apropiadas.
- b) suministrar a dicha cepa un ácido iniciador no natural;
- c) cultivar dicha cepa en condiciones adecuadas para la producción de análogos de 18,21-didesoxiansamicina; y
- d) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.

Lo adecuado es que el procedimiento comprenda además las etapas de:

- e) eliminar o desactivar uno o más genes de biosíntesis de la unidad iniciadora, o un homólogo de los mismos, teniendo lugar dicha etapa habitualmente antes de la etapa c).

Lo adecuado es que el procedimiento comprenda además o en su lugar la etapa de:

- f) eliminar o desactivar uno o más genes post-PKS, teniendo lugar dicha etapa habitualmente antes de la etapa c).

En la etapa (a) "una cepa huésped que produzca una ansamicina tal como geldanamicina, herbimicinas (por ejemplo, herbimicina A, B o C) o uno de sus análogos" incluye una cepa que produzca una ansamicina tal como geldanamicina, una herbimicina (por ejemplo, herbimicina A, B o C) o los compuestos de ansamicina que están englobados por las definiciones de R₁-R₁₁ cuando se cultiva en condiciones apropiadas. Las condiciones apropiadas (y las condiciones adecuadas de la etapa (c)) incluyen el suministro de un alimento iniciador adecuado y medio de crecimiento de una composición adecuada (que serán conocidos por el experto en la técnica o que se pueden determinar mediante procedimientos conocidos en sí).

Por ejemplo, en la etapa (a), la primera cepa huésped puede producir geldanamicina o uno de sus análogos cuando se cultiva en condiciones apropiadas.

Lo adecuado es que el alimento iniciador no natural sea un ácido benzoico sustituido (que no sea ácido 3-amino-5-hidroxi-benzoico, que es el ácido iniciador natural). Lo más adecuado es que sea un ácido 3-amino-benzoico opcionalmente sustituido además en torno al anillo. Lo adecuado es que el alimento iniciador no natural sea ácido 3-amino-benzoico sustituido con ninguno, uno, dos o tres átomos de flúor.

En una realización adecuada, el alimento de ácido iniciador no natural es ácido 3-aminobenzoico.

En otra realización adecuada, el alimento de ácido iniciador no natural es ácido 5-amino-2-fluorobenzoico.

En otra realización adecuada, el alimento de ácido iniciador no natural es ácido 5-amino-3-fluorobenzoico.

En otra realización adecuada, el alimento de ácido iniciador no natural es ácido 5-amino-2,3-difluorobenzoico.

En otra realización adecuada, el alimento de ácido iniciador no natural es ácido 5-amino-2,3,6-trifluorobenzoico.

El experto en la técnica apreciará que hay unidades iniciadoras no naturales alternativas que se podrían suministrar en la cepa para producir el/los mismo/s compuesto/s, por ejemplo, pero sin limitación, el metiléster, el etiléster, el *N*-

acetil-cisteamina-tioéster del ácido benzoico sustituido y el análogo de dicétido del compuesto intermedio biosintético activado apropiadamente para su incorporación, por ejemplo, en forma del *N*-acetil-cisteamina-tioéster. También se pueden suministrar compuestos ácidos en las formas salinas correspondientes.

5 La cepa huésped puede ser, por ejemplo, una cepa productora de ansamicina tal como cepa productora de geldanamicina o una cepa productora de herbimicina. Alternativamente, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, tal como una cepa productora de geldanamicina (o una cepa productora de herbimicina), en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes biosintéticos de la unidad iniciadora. En una realización más, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes post-PKS.

10 En una realización adicional, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, en la que se ha eliminado o desactivado *gdmM*.

En una realización más, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, en la que se han eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM* y, opcionalmente, más genes post-PKS.

15 En una realización de la invención, la cepa huésped es una cepa productora de geldanamicina.

En una realización alternativa, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes biosintéticos de la unidad iniciadora.

20 En una realización adicional, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes post-PKS.

En una realización más, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se ha eliminado o desactivado *gdmM*.

En una realización adicional, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se han eliminado o desactivado *gdmM* y, opcionalmente, más genes post-PKS.

25 En otra realización más, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más genes post-PKS, y luego se han reintroducido genes post-PKS genes para efectuar modificaciones post-PKS específicas. Se pueden usar genes post-PKS de la agrupación de la geldanamicina u otras agrupaciones de ansamicina tales como, pero sin limitación, agrupaciones de macbecina o herbimicina.

30 En una realización adicional, la cepa huésped es una cepa productora de herbimicina (por ejemplo, herbimicina A, B o C).

En una realización más, la cepa huésped es una cepa productora de autolitimicina.

En una realización adicional, la cepa huésped es una cepa productora de reblastatina.

35 En una realización adicional, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de herbimicina, en la que se ha eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM*.

En una realización más, la cepa huésped es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de herbimicina, en la que se ha eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM* y, opcionalmente, más genes post-PKS.

40 Genes biosintéticos de la unidad iniciadora que se pueden eliminar o desactivar incluyen, por ejemplo, los genes conocidos como ahba-3, ahba-1c, ahba-4, ahba-b, ahba-1a, ahba-1 b de la agrupación ahba-B de la cepa productora de geldanamicina, AM 3602 de *S. hygroscopicus* (véase Rascher *et al.*, 2005), o genes PH, OX, Ahs, Adh y AHk de la cepa productora de macbecina, ATCC 31280 de *Actinosynnema pretiosum* (véase la Tabla 3), así como aquellos homólogos de otras cepas que tengan una función similar. Por ejemplo, se pueden eliminar o desactivar todos los genes de la agrupación ahba-B de la cepa productora de geldanamicina AM 3602 de *S. hygroscopicus*.

45 Las eliminaciones anteriormente mencionadas se pueden combinar. Por ejemplo, la cepa huésped puede ser una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina (por ejemplo, cepa productora de geldanamicina o herbimicina), en la que se hayan eliminado o desactivado *gdmM* o un homólogo del mismo y uno o más de los genes biosintéticos de la unidad iniciadora y, opcionalmente, más genes post-PKS.

Lo adecuado es que el uno o más genes biosintéticos de la unidad iniciadora o los genes post-PKS se eliminen o desactiven selectivamente.

50 En una realización adicional, uno o más genes biosintéticos de la unidad iniciadora o genes post-PKS se desactivan en dicha cepa diseñada genéticamente mediante la integración de ADN en el/los gen/s de manera que no se

5 produzca proteína funcional. En una realización alternativa, se eliminan uno o más genes biosintéticos de la unidad iniciadora o genes post-PKS de dicha cepa diseñada genéticamente mediante una eliminación o eliminaciones dirigidas. En una realización más, se desactivan uno o más genes biosintéticos de la unidad iniciadora o genes post-PKS en dicha cepa diseñada genéticamente mediante mutagénesis dirigida a un sitio. En una realización adicional, se somete una cepa huésped productora de geldanamicina a mutagénesis, química o UV, y se selecciona una cepa modificada en la que una o más de las enzimas biosintéticas de la unidad iniciadora o enzimas post-PKS no sean funcionales. La presente invención también abarca las mutaciones de los reguladores que controlan la expresión de uno o más de los genes post-PKS. El experto en la técnica apreciará que la eliminación o desactivación de un regulador puede tener el mismo resultado que la eliminación o desactivación del gen. Los genes post-PKS se pueden introducir en dicha célula huésped bajo un promotor apropiado. En una realización preferida, uno o más de los genes eliminados se pueden introducir en el sitio de unión del fago cromosómico del fago phiBT1 de *Streptomyces* (Gregory *et al.*, 2003). El experto en la técnica apreciará que la complementación en *trans* no se limita a este sitio de unión del fago ni, de hecho, al uso de un sitio de unión. Por lo tanto, la complementación de genes auxiliares eliminados también se puede efectuar, pero sin limitación, mediante la introducción de uno o más genes auxiliares bajo un promotor apropiado en otros sitios de unión de fagos, tales como el sitio de unión para el fago phiC31 de *Streptomyces*, por ejemplo, mediante el uso de un derivado de pSET152 (Bierman *et al.*, 1992). El experto en la técnica reconocerá que hay más fagos ya conocidos, y cabe esperar que muchos otros fagos contengan funciones de integración que se podrían transferir a un vector de administración junto con un promotor adecuado para generar sistemas adicionales que se puedan usar para introducir genes en la cepa huésped (Smovkina *et al.*, 1990, Matsuura *et al.*, 1996, Van Mellaert *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1991). A medida que se caracterizan más fagos, cabe esperar que haya más integrasas disponibles que se pueda usar de manera similar. La introducción de genes post-PKS bajo un promotor apropiado también se puede efectuar, sin limitación, mediante la recombinación homóloga en una posición neutra del cromosoma, la recombinación homóloga en una posición no neutra del cromosoma (por ejemplo, para interrumpir un gen elegido). También se pueden usar vectores de auto-replicación, por ejemplo, pero sin limitación, vectores que contienen el origen de replicación de *Streptomyces* de pSG5 (por ejemplo, pKC1139 Bierman *et al.*, 1992), pLJ101 (por ejemplo, pLJ487, Kieser *et al.*, 2000) y SCP2* (por ejemplo, pLJ698, Kieser *et al.*, 2000).

En una realización más, se ha reintroducido en una cepa diseñada genéticamente en la que se han eliminado o desactivado uno o más genes post-PKS uno o más de los mismos genes post-PKS, o sus homólogos de una cepa productora de geldanamicina alternativa.

En otra realización más, una cepa diseñada genéticamente en la que se han eliminado o desactivado uno o más genes se complementa por uno o más de los genes post-PKS de una agrupación de PKS heteróloga, incluyendo, pero sin limitación, las agrupaciones que dirigen la biosíntesis de la rifamicina, ansamitocina, macbecina o herbimicina.

Un procedimiento de eliminación o desactivación selectiva de un gen post-PKS comprende:

- (i) diseñar oligos específicos basados en la secuencia del gen de interés, aislando el fragmento interno del gen de interés de una cepa productora de geldanamicina adecuada mediante PCR;
- (ii) integrar un plásmido que contenga este fragmento bien en la misma o en una cepa productora de geldanamicina diferente tras lo que se realiza una recombinación homóloga que provoca la interrupción del gen diana;
- (iii) cultivar la cepa así producida en condiciones adecuadas para la producción de análogos de ansamicina.

El experto en la técnica apreciará que se puede obtener una cepa equivalente mediante procedimientos alternativos a los descritos anteriormente, por ejemplo:

- Se pueden diseñar oligos degenerados basado en homólogo/s del gen de interés (por ejemplo, de agrupaciones biosintéticas de rifamicina, macbecina o herbimicina y/o otras secuencias disponibles) y se puede aislar el fragmento interno del gen de interés de una cepa productora de geldanamicina adecuada mediante PCR. Se pueden diseñar diferentes oligos degenerados que amplificarán satisfactoriamente una región apropiada del gen post-PKS, o uno de sus homólogos, de un productor de geldanamicina o una cepa productora de uno de sus homólogos.
- Se puede usar la secuencia del gen de la cepa NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* para generar los oligos que pueden ser específicos del gen de NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus*, y luego se puede amplificar un fragmento interno de cualquier cepa productora de geldanamicina, por ejemplo, NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* o DSM4137 de *Streptomyces* sp. o DSM40699 de *Streptomyces violaceusniger*.
- Se puede usar la secuencia del gen de la cepa NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* junto con la secuencia de genes homólogos (por ejemplo, de agrupaciones biosintéticas de geldanamicina de DSM4137 de *Streptomyces* sp o DSM40699 de *Streptomyces violaceusniger*) para generar oligos degenerados para el gen de NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus*, y luego se puede amplificar un fragmento interno de cualquier cepa productora de geldanamicina, por ejemplo, NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* o DSM4137 de *Streptomyces* sp. o DSM40699 de *Streptomyces violaceusniger*.

La Figura 2 muestra la actividad de los genes post-PKS en la agrupación biosintética de la geldanamicina. El experto en la técnica podría, por tanto, identificar qué genes post-PKS adicionales habría que eliminar o desactivar para obtener una cepa que produjera el/los compuesto/s de interés.

5 En estos sistemas, se puede observar que cuando se genera una cepa en la que uno o más de los genes post-PKS no funcionan como consecuencia de uno de los procedimientos descritos, incluyendo la desactivación o la eliminación, se puede producir más de un análogo de ansamicina. Los expertos en la técnica apreciarán que hay una serie de posibles razones para esto. Por ejemplo, puede haber un orden preferido de etapas post-PKS y la retirada de una sola actividad conduce a que todas las etapas posteriores se lleven a cabo en sustratos que no sean naturales para las enzimas implicadas. Esto puede conducir a la acumulación de compuestos intermedios en el caldo de cultivo debido a una disminución de la eficacia hacia los nuevos sustratos presentados a las enzimas post-PKS, o a productos de la derivación que ya no sean sustratos para el resto de las enzimas, posiblemente, por la alteración del orden de las etapas.

El experto en la técnica apreciará que la proporción de los compuestos observada en una mezcla se puede manipular usando variaciones en las condiciones de crecimiento.

15 El experto en la técnica apreciará que en una agrupación biosintética, algunos genes se organizan en operones, y la interrupción de un gen a menudo tendrá un efecto en la expresión de los genes posteriores del mismo operón.

Cuando se observa una mezcla de compuestos, éstos se pueden separar fácilmente usando técnicas estándar, algunas de las cuales se describen en los siguientes ejemplos.

20 Los análogos de ansamicina se pueden rastrear mediante una serie de procedimientos según lo descrito en la presente memoria, y en el caso de que un solo compuesto muestre un perfil favorable, es posible diseñar genéticamente una cepa para preparar preferentemente este compuesto. En el caso poco habitual de que esto no sea posible, se puede generar un compuesto intermedio que luego se biotransforme para producir el compuesto deseado.

25 La presente invención proporciona nuevos análogos de ansamicina generados mediante el cultivo de una cepa productora de un policétido de ansamicina o uno de sus análogos, por ejemplo, geldanamicina o uno de sus análogos, habiendo seleccionado opcionalmente la cepa la eliminación o la desactivación de uno o más genes post-PKS de la agrupación de genes PKS y proporcionando un alimento de ácido para su incorporación como unidad iniciadora. En concreto, la presente invención se refiere a nuevos análogos de ansamicina producidos mediante el suministro de una unidad iniciadora no natural a una cepa productora geldanamicina, opcionalmente, combinada con la eliminación o la desactivación seleccionada de uno o más genes post-PKS de la agrupación de genes PKS de la geldanamicina. Además, es posible reintroducir uno o más genes de post-PKS de una agrupación biosintética de ansamicina.

35 El experto en la técnica apreciará que no es necesario eliminar completamente un gen para que el producto génico se vuelva no funcional. Por consiguiente, la expresión "eliminado o desactivado", como se usa en la presente memoria, engloba cualquier procedimiento mediante el que el producto génico se vuelve no funcional, incluyendo, pero sin limitación: la eliminación del gen en su totalidad, la eliminación de parte del gen, la desactivación mediante la inserción en el gen diana, la mutagénesis dirigida a un sitio que hace que el gen bien no se exprese o se exprese para producir una proteína inactiva, la mutagénesis de la cepa huésped que hace que el gen bien no se exprese o se exprese para producir una proteína inactiva (por ejemplo, mediante la radiación o exposición a compuestos químicos mutagénicos, fusión de protoplastos o mutagénesis de transposones). Alternativamente, se puede afectar químicamente a la función de un producto génico activo con inhibidores. Por ejemplo, la metapirona (nombre alternativo: 2-metil-1,2-di(3-piridil-1-propanona), documento EP 0 627 009) y el ancimidol son inhibidores de oxigenasas, y estos compuestos se pueden añadir al medio de producción para generar análogos. Además, la sinefungina es un inhibidor de metiltransferasa que se puede usar de manera similar, pero para la inhibición de la actividad metiltransferasa *in vivo* (McCammon y Parks, 1981).

45 En una realización alternativa, se pueden eliminar o desactivar todos los genes post-PKS, y luego se pueden reintroducir uno o más de los genes mediante complementación (por ejemplo, en un sitio de acoplamiento, sobre un plásmido autorreplicante o mediante la inserción en una región homóloga del cromosoma). Por lo tanto, en una realización particular, la presente invención se refiere a procedimientos para la generación de análogos de análogos de ansamicina (por ejemplo, análogos de 18,21-didesoxiansamicina), procedimiento que comprende:

- a) proporcionar una primera cepa huésped que produzca geldanamicina cuando se cultive en condiciones apropiadas;
- b) opcionalmente, eliminar o desactivar selectivamente todos los genes post-PKS;
- c) suministrar a dicha cepa una unidad iniciadora no natural;
- 55 d) cultivar dicha cepa huésped modificada en condiciones adecuadas para la producción de análogos de ansamicina; y
- e) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.

En una realización alternativa, se reintroducen uno o más genes post-PKS eliminados. En una realización más, se reintroducen uno o más genes post-PKS de la agrupación de la geldanamicina de un organismo productor diferente. En una realización adicional, se reintroducen uno o más de los genes post-PKS seleccionados de la agrupación biosintética de la macbecina, grupo que consiste en *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* y *mbcP450*. En una realización más, se reintroducen dos o más genes post-PKS seleccionados del grupo que consiste en *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* y *mbcP450*. En una realización más, se reintroducen tres o más genes post-PKS seleccionados del grupo que consiste en *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* y *mbcP450*. En una realización más, se reintroducen cuatro o más genes post-PKS seleccionados del grupo que consiste en *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* y *mbcP450*. En una realización más, se reintroducen cinco o más genes post-PKS seleccionados del grupo que consiste en *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* y *mbcP450*.

Además, para el experto en la técnica será evidente que se podría eliminar o desactivar un subconjunto de los genes post-PKS y, opcionalmente, se podría reintroducir un subconjunto más pequeño de dichos genes post-PKS para obtener una cepa que, cuando se suministre una unidad iniciadora no natural, produzca análogos de ansamicina tales como análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina.

Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención se refiere a procedimientos para la generación de análogos de ansamicina (por ejemplo, análogos de 18,21,-didesoxi-ansamicina), procedimiento que comprende:

- a) proporcionar una primera cepa huésped que produzca geldanamicina cuando se cultive en condiciones apropiadas;
- b) eliminar o desactivar selectivamente *gdmM*;
- c) suministrar a dicha cepa una unidad iniciadora no natural;
- d) cultivar dicha cepa huésped modificada en condiciones adecuadas para la producción de análogos de ansamicina (por ejemplo, análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina); y
- e) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.

En una realización preferida más, la presente invención se refiere a procedimientos para la generación de análogos de ansamicina (por ejemplo, análogos de 18,21,-didesoxiansamicina), procedimiento que comprende:

- a) proporcionar una primera cepa huésped que produzca geldanamicina cuando se cultive en condiciones apropiadas;
- b) eliminar o desactivar selectivamente *gdmM*;
- c) opcionalmente, eliminar o desactivar selectivamente más genes post-PKS;
- d) suministrar a dicha cepa una unidad iniciadora no natural;
- e) cultivar dicha cepa huésped modificada en condiciones adecuadas para la producción de análogos de ansamicina (por ejemplo, análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina); y
- f) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.

Los expertos en la técnica saben bien que las agrupaciones de genes de policétidos se pueden expresar en huéspedes heterólogos (Pfeifer y Khosla, 2001). Por consiguiente, la presente invención incluye la transferencia de la agrupación biosintética de policétidos de ansamicina, por ejemplo, la agrupación de genes biosintéticos de la geldanamicina, con o sin resistencia y genes reguladores, bien completa o con eliminaciones, a un huésped heterólogo. Alternativamente, la agrupación biosintética de policétidos de ansamicina completa, por ejemplo, la agrupación biosintética completa de la geldanamicina se puede transferir a un huésped heterólogo, con o sin resistencia o genes reguladores, y luego se puede manipular mediante los procedimientos descritos en la presente memoria para eliminar o desactivar uno o más de los genes post-PKS o genes de la biosíntesis de la unidad iniciadora. Los procedimientos y los vectores para la transferencia según lo definido anteriormente de dichos trozos de ADN de gran tamaño son conocidos en la técnica (Rawlings, 2001; Staunton y Weissman, 2001) o se proporcionan en la presente memoria en los procedimientos que se dan a conocer. En el presente contexto, una cepa de células huésped preferida es una procarionta, más preferentemente, un actinomiceto o *Escherichia coli*; incluso más preferentemente incluye, pero sin limitación, *Actinosynnema mirum* (*A. mirum*), *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum* (*A. pretiosum*), *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus* sp., *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces violaceusniger*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces albus*, *Midromonospora* sp., *Micromonospora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei* o N902-109 de *Actinoplanes* sp.

En una realización, se transfiere toda la agrupación biosintética. En una realización alternativa, se transfiere toda la PKS sin ninguno de los genes de biosíntesis de la unidad iniciadora asociados y/o genes post-PKS.

55

En una realización adicional, se transfiere toda la agrupación biosintética de la geldanamicina y luego se manipula según la descripción de la presente memoria.

5 En una realización más, se transfiere toda la PKS sin ninguno de los genes de biosíntesis de la unidad iniciadora asociados y/o genes post-PKS, y se introducen en el nuevo huésped los genes post-PKS seleccionados, por ejemplo, pero sin limitación, *gdmN*, *mbcN*, *hbmN*, *gdmL* y/o *mbcP450*.

10 En un aspecto alternativo de la invención, el/los análogo/s de ansamicina de la presente invención se puede/n procesar además mediante biotransformación con una cepa apropiada. La cepa apropiada es una cepa de tipo natural disponible, por ejemplo, pero sin limitación, *Actinosynnema mirum*, *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*, *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus* sp. *Streptomyces violaceusniger*. Alternativamente, es posible diseñar genéticamente una cepa apropiada que permita la biotransformación con determinadas enzimas post-PKS, por ejemplo, pero sin limitación, aquéllas codificadas por *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT2*, *mbcP450* (según lo definido en la presente memoria), *gdmN*, *gdmM*, *gdmL*, *gdmP*, (Rascher *et al.*, 2003) la O-metil-transferasa de la geldanamicina, *hbmN*, *hbmL*, *hbmP*, (Rascher *et al.*, 2005) O-metil-transferasas de herbimicina y más monooxigenasas de herbimicina, *asm7*, *asm10*, *asm11*, *asm12*, *asm19* y *asm21* (Cassady *et al.*, 2004, Spiteller *et al.*, 2003). Cuando los genes todavía tienen que ser identificados o las secuencias no son de dominio público, es habitual para los expertos en la técnica adquirir dichas secuencias mediante procedimientos estándar. Por ejemplo, la secuencia del gen que codifica la O-metil-transferasa de geldanamicina no es de dominio público, pero cualquier experto en la técnica podría generar una sonda, bien una sonda heteróloga, usando una O-metil-transferasa similar, o una sonda homóloga mediante el diseño de cebadores degenerados de genes homólogos disponibles para llevar a cabo transferencias Southern en la cepa productora de geldanamicina y adquirir así este gen para generar sistemas de biotransformación.

20 En una realización particular, se puede haber eliminado o desactivado en la cepa una o más de sus agrupaciones de policétido nativas, bien por completo o en parte para prevenir la producción del policétido producido por dicha agrupación de policétido nativa. Dicha cepa diseñada genéticamente se puede seleccionar del grupo que incluye, por ejemplo, pero sin limitación: *Actinosynnema mirum*, *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*, *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus* sp., *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces violaceusniger*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonospora* sp., *Micromonospora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei* o N902-109 de *Actinoplanes* sp.

25 El experto en la técnica reconocerá que se podrían usar igualmente otras agrupaciones biosintéticas de policétidos de ansamicina, por ejemplo, las agrupaciones de la herbimicina, reblastatina o TAN para generar los compuestos de la invención.

30 Mediante el uso de una cepa productora de herbimicina, por ejemplo, pero sin limitación, AM3672 de *Streptomyces hygroscopicus* (Rascher *et al.*, 2005) o una cepa productora de un análogo de herbimicina, por ejemplo, pero sin limitación, una AM-3672 de *Streptomyces hygroscopicus* diseñada genéticamente en la que se hayan desactivado o eliminado uno o más de los genes post-PKS o genes de biosíntesis de la unidad iniciadora, opcionalmente, con uno o más genes post-PKS homólogos o heterólogos reintroducidos y a la que se suministra un ácido iniciador según lo descrito en la presente memoria. La secuencia de la agrupación PKS de la herbimicina está depositada en el GenBank (número de acceso AY947889) (Rascher *et al.*, 2005). Cuando se requieren genes no ubicados en esta secuencia, se localizan con el uso de sondas homólogas o heterólogas generadas mediante el diseño de oligos degenerados usando secuencias homólogas según lo descrito en la presente memoria.

35 El experto en la técnica reconocerá que se podría usar igualmente la agrupación de la reblastatina para generar los compuestos de la invención, mediante el uso de una cepa productora de reblastatina, por ejemplo, pero sin limitación, S6699 de *Streptomyces* sp. (Stead *et al.*, 2000) o una cepa productora de un análogo de reblastatina, por ejemplo, pero sin limitarse a S6699 de *Streptomyces* sp. en la que se hayan desactivado o eliminado uno o más de los genes post-PKS o genes de biosíntesis de la unidad iniciadora, opcionalmente, con uno o más genes post-PKS homólogos o heterólogos reintroducidos y a la que se suministra un ácido iniciador según lo descrito en la presente memoria.

40 El experto en la técnica reconocerá que, aplicando los procedimientos de la presente invención, habrá múltiples cepas adicionales que generen productos naturales que se puedan usar para producir los compuestos de la presente invención.

45 Aunque el proceso para la preparación de los análogos de ansamicina de la invención según lo descrito anteriormente es sustancial o completamente biosintético, no se descarta producir o interconvertir los análogos de ansamicina de la invención mediante un proceso que comprenda procedimientos estándar de síntesis química.

50 Para permitir la manipulación genética de la agrupación de genes PKS de la geldanamicina, se usó la secuencia de la agrupación de genes depositada en GenBank (número de acceso AY179507) (Rascher *et al.*, 2003). Cuando se requieren genes no ubicados en esta secuencia, se localizan mediante el uso de sondas homólogas o heterólogas

generadas mediante el diseño de oligos degenerados usando secuencias homólogas según lo descrito en la presente memoria.

Para usar los genes post-PKS de la agrupación de la macbecina, se secuenció la agrupación de genes de la macbecina de *Actinosynnema pretiosum* subsp. *Pretiosum*, lo que se describe en el Ejemplo 1. El experto en la técnica apreciará que hay cepas alternativas que producen macbecina, por ejemplo, pero sin limitación *Actinosynnema Mirum*. Se puede secuenciar la agrupación de genes PKS de la macbecina de estas cepas como se describe en la presente memoria para *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*, y la información usada para generar cepas equivalentes. Otros aspectos de la invención incluyen:

- 5 - Una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina (por ejemplo, una cepa productora de geldanamicina o herbimicina (por ejemplo, herbimicina A, B o C), en la que se han eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM* y, opcionalmente, más genes post-PKS, particularmente, una cepa diseñada genéticamente en el que se haya eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM*. Adecuadamente, la cepa productora de ansamicina es un estreptomiceto tal como NRRL3602 de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* o DSM4137 de *Streptomyces* sp. o DSM40699 de *Streptomyces violaceusniger*.
- 10 - Una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes de biosíntesis de la unidad iniciadora, por ejemplo, una cepa productora de geldanamicina, por ejemplo, en la que se ha eliminado o desactivado *gdmO* o una cepa productora de herbimicina, por ejemplo, en la que se ha eliminado o desactivado *hbmO*.
- 15 - Una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina (por ejemplo, una cepa productora de geldanamicina o herbimicina), en la que se han eliminado o desactivado *gdmM* o un homólogo del mismo y uno o más genes de biosíntesis de la unidad iniciadora y, opcionalmente, más genes post-PKS. Por ejemplo, se pueden eliminar o desactivar todos los genes de la agrupación ahba-B de la cepa productora de geldanamicina AM 3602 de *S. hygroscopicus* (u homólogo de otras cepas). Alternativamente, se puede eliminar o desactivar parte de la agrupación ahba-B de la cepa productora de la geldanamicina AM3602 de *S. hygroscopicus* (o un homólogo de otras cepas) conduciendo a una cepa en la que se reduce o elimina la biosíntesis de AHBA, que se puede confirmar experimentalmente cuando el suministro de AHBA en dicha cepa restablece la buena producción de la geldanamicina o de otra ansamicina.
- 20 - Uso de dicha cepa diseñada genéticamente en la preparación de un análogo de ansamicina (por ejemplo, un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina).
- 25 - Análogos de ansamicina obtenidos o que se pueden obtener mediante cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados.
- 30

La ventaja de los compuestos de la invención es que cabe esperar que tengan una o más de las siguientes propiedades: unión fuerte a Hsp90, rápida tasa de unión a Hsp90, buena solubilidad, buena estabilidad, buena capacidad de formulación, buena biodisponibilidad oral, buenas propiedades farmacocinéticas, incluyendo pero sin limitación, baja glucuronidación, buena reabsorción celular, buena farmacocinética en el cerebro, baja unión a los eritrocitos, buen perfil toxicológico, buen perfil de hepatotoxicidad, buen perfil de nefrotoxicidad, pocos efectos secundarios y pocos efectos secundarios cardíacos.

Ejemplos

Procedimientos generales

40 Medio 1 - MAM

En 1 l de agua destilada

Almidón de trigo	10 g
Sólidos de infusión de maíz	2,5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCO ₃	3 g
Sulfato de hierro	0,3 g
Agar	20 g
Esterilización mediante autoclave a 121°C °C durante 20 minutos.	

Medio 2 - R6

A 700 ml de agua destilada

Sacarosa	200 g
Polvo de dextrina	10 g
Ácidos casamino	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
*Elementos traza	1 ml
K ₂ SO ₄	0,1 g
Agar	20 g
*1g/l de elementos traza de FeSO ₄ ·7H ₂ O, de MnCl ₂ ·4H ₂ O y de ZnSO ₄ ·7H ₂ O. Esterilización mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

- 5 Tras la esterilización, se añaden las siguientes soluciones estériles (cabe señalar que el ácido glutámico se esteriliza por filtración)

Sal monosodio de ácido L-glutámico (0,65M)	100 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O (0,48M)	100 ml
MOPS (pH 7,2) (0,1M)	100 ml

Extracción de caldos de cultivo para el análisis CL-EM

- 10 Se mezclaron vigorosamente caldo de cultivo (1 ml) y acetato de etilo (1 ml) durante 15-30 min, tras lo que se centrifugó durante 10 min. Se recogieron 0,5 ml de la capa orgánica, se evaporaron hasta la sequedad y luego se volvieron a disolver en 0,25 ml de metanol.

Procedimiento del análisis CL-EM

- 15 El CL-EM analítico se realizó mediante el procedimiento 1 de CL-EM en un sistema de CLAR Agilent HP1100 en combinación con un espectrómetro de masas de electronebulización en modo iónico positivo y/o negativo Bruker Daltonics Esquire 3000+. Procedimiento 1 de CL-EM: la cromatografía se realizó en una columna Phenomenex Hyperclone (BDS de C₁₈, tamaño de partícula de 3 micrómetros, 150 x 4,6 mm) eluyendo a un caudal de 1 ml/min mediante el siguiente procedimiento de elución en gradiente; T = 0, B al 10 %; T = 2, B al 10 %; T = 20, B al 100 %; T = 22, B al 100 %; T = 22,05, B al 10 %; T = 25, B al 10 %. Fase móvil A = agua + ácido fórmico al 0,1 %; fase móvil B = acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %. Los espectros UV se registraron entre 190 y 400 nm, tomándose lo cromatogramas extraídos a 210, 254 y 276 nm. Los espectros de masas se registraron entre 100 y 1.500 UMA.

- 20 *Procedimientos de dilucidación de las estructura de RMN*

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Advance 500 a 10,52 °C, funcionando a 500 MHz y 125 MHz para ¹H y ¹³C respectivamente. Se usaron las secuencias de pulsos patrón de Bruker para adquirir los espectros de COSY de ¹H-¹H, APT, HMBC y HMQC. Los espectros de RMN se referenciaron con respecto a las resonancias de protón residual o de carbono estándar de los disolventes en los que se procesaron.

- 25 *Evaluación de la pureza de los compuestos*

Se analizaron los compuestos purificados mediante el procedimiento 2 de CL-EM descrito. Procedimiento 2 de CL-EM: la cromatografía se realizó en una columna Phenomenex HyperClone BDS de C₁₈ (4,6 x 150 mm, tamaño de partícula de 3 micrómetros) eluyendo con un gradiente de agua + ácido fórmico al 0,1 %:acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %, (90:10) a (0:100) a 1 ml/min durante 20 min. Se analizó la pureza mediante EM a múltiples longitudes de

onda (210, 254 y 276 nm). Todos los compuestos resultaron tener una pureza de >95 % a todas las longitudes de onda. Finalmente, se confirmó la pureza mediante el examen de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

Bioanálisis in vitro para la actividad anticancerígena

- 5 La evaluación *in vitro* de la actividad anticancerígena de los compuestos en un grupo de líneas celulares tumorales humanas en un ensayo de proliferación en monocapas se realizó en la instalación de pruebas Oncotest, Instituto de Oncología Experimental, Oncotest GmbH, Freiburg. En la Tabla 1, se resumen las características de las líneas celulares seleccionadas.

Tabla 1 - Líneas celulares de prueba

N.º	Línea celular	Características
1	CNXF 498NL	SNC
2	CXF HT29	Colon
3	LXF 1121 L	Pulmón, células grandes
4	MCF-7	Mama, estándar del NCI
5	MEXF 394NL	Melanoma
6	DU145	Próstata - PTEN positivo

- 10 Se establecieron las líneas celulares Oncotest de xenoinjertos tumorales humanos según lo descrito por Roth *et al.*, (1999). El origen de los xenoinjertos donantes está descrito por Fiebig *et al.*, (1999). Se obtuvieron otras líneas celulares del NCI (DU145, MCF-7) o se adquirieron en DSMZ, Braunschweig, Alemania.

- 15 Todas las líneas celulares, a no ser que se especifique lo contrario, se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada (aire al 95 %, CO₂ al 5 %) en un medio "readymix" que contenía medio RPM11640, suero bovino fetal al 10 % y 0,1 mg/ml de gentamicina (PAA, Colbe, Alemania).

Se usó un análisis de yoduro de propidio modificado para evaluar los efectos del/de los compuesto/s de prueba en el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas (Dengler *et al.*, (1995)).

- 20 En síntesis, se cosecharon las células de cultivos en fase exponencial mediante tripsinización, se contaron y se sembraron en placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos a una densidad celular dependiente de la línea celular (5-10.000 células viables/pocillo). Tras 24 h de recuperación para dejar que las células volvieran a alcanzar un crecimiento exponencial, se añadieron 0,010 ml de medio de cultivo (6 pocillos control por placa) o medio de cultivo que contenía el análogo de ansamicina a los pocillos. Se sembró cada concentración por triplicado. Los compuestos se aplicaron a cinco concentraciones (100; 10; 1; 0,1 y 0,01 μM). Tras 4 días de exposición continua, se reemplazó el medio de cultivo celular con o sin compuesto de prueba por 0,2 ml de una solución acuosa de yoduro de propidio (PI) (7 mg/l). Para medir la proporción de células vivas, se pueden permeabilizar las células mediante la congelación de las placas. Tras descongelar las placas, se midió la fluorescencia usando el lector de microplacas Cytofluor 4000 (excitación a 530 nm, emisión a 620 nm), siendo directamente proporcional al número total de células viables.

La inhibición del crecimiento se puede expresar como tratado/control x 100 (%T/C).

30 Ejemplo 1 – Secuenciación de la agrupación de genes PKS de la macbecina

Se aisló ADN genómico de *Actinosynnema pretiosum* (ATCC 31280) y *Actinosynnema mirum* (DSM 43827, ATCC 29888) usando protocolos estándar descritos en Kieser *et al.*, (2000). La secuenciación del ADN se llevó a cabo en la instalación de secuenciación del Departamento de Bioquímica, Universidad de Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QW mediante procedimientos estándar.

- 35 Se emplearon los cebadores BIOSG104 5'-GGTCTAGAGGTCAGTGCCCCGCGTACCGTCGT-3' (SEC ID N.º 1) y BIOSG105 5'-GGCATATGCTTGTGCTCGGGCTCAAC-3' (SEC ID N.º 2) para amplificar el gen que codifica la carbamoil-transferasa *gdmN* de la agrupación de genes biosintéticos de la geldanamicina de NRRL 3602 de *Streptomyces hygroscopicus* (número de acceso de la secuencia: AY179507) usando técnicas estándar. Se llevaron a cabo experimentos de transferencia Southern usando los reactivos de DIG y kits para el marcaje y la detección de ácidos nucleicos no radiactivos según las instrucciones de los fabricantes (Roche). Se usó el fragmento de ADN de *gdmN* marcado con DIG como sonda heteróloga. Con la sonda generada de *gdmN* y el ADN genómico aislado de 2112 de *A. pretiosum*, se identificó un fragmento de *EcoRI* de aproximadamente 8 kb en un análisis de transferencia Southern. Se clonó el fragmento en Litmus 28 aplicando procedimientos estándar y se identificaron transformantes

mediante la hibridación de colonias. Se aisló el clon p3 y se secuenció el inserto de aproximadamente 7,7 kb. Se digirió el ADN aislado del clon p3 con *EcoRI* y *EcoRI/SacI*, y se aislaron las bandas a aproximadamente 7,7 kb y a aproximadamente 1,2 kb, respectivamente. Las reacciones de marcaje se llevaron a cabo según los protocolos de los fabricantes. Se crearon los bancos de cósmidos de las dos cepas nombradas anteriormente usando el vector SuperCos 1 y el kit de empaquetado Gigapack III XL (Stratagene) según las instrucciones de los fabricantes. Se rastrearon estos dos bancos mediante protocolos estándar y, como sonda, se usaron los fragmentos marcados con DIG del fragmento de *EcoRI* de 7,7 kb obtenido del clon p3. Se identificó el cósmido 52 del banco de cósmidos de *A. pretiosum* y se sometió a secuenciación en la instalación de secuenciación del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge. De igual manera, se identificaron el cósmido 43 y el cósmido 46 del banco de cósmidos de *A. mirum*. Los tres cósmidos contienen el fragmento de *EcoRI* de 7,7 kb, observado mediante el análisis de transferencia Southern.

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 0,7 kpb de la región PKS del cósmido 43 usando los cebadores BIOSG124 5'-CCCGCCCGCGCGAGCGGCGCGTGGCCGCCGAGGGC-3' (SEC ID N.º 3) y BIOSG125 5'-GCGTCTCGCGCAGCCACGCCACCAGCAGCTCCAGC-3' (SEC ID N.º 4) respectivamente, aplicando protocolos estándar, se clonaron y se usaron como una sonda para rastrear el banco de cósmidos de *A. pretiosum* para solapar clones. También se usó la información de las secuencias del cósmido 52 para crear las sondas derivadas de los fragmentos de ADN amplificados por los cebadores BIOSG130 5'-CCAACCCCGCCGCGTCCCGGGCCGCGCCGAACACG-3' (SEC ID N.º 5) y BIOSG131 5'-GTCGTGCGGTACGGGCGCGTGGGGCAGCTGTGT-5' (SEC ID N.º 6), así como BIOSG132 5'-GTCGGTGGACTGCCCTGCGCCTGATCGCCCTGCGC-3' (SEC ID N.º 7) y BIOSG133 5'-GGCCGGTGGTGTGCTGCCCGAGGACGGGGAGCTGCGG-3' (SEC ID N.º 8), que se usaron para rastrear el banco de cósmidos de *A. pretiosum*. Se aislaron los cósmidos 311 y 352, y se envió el cósmido 352 a secuenciación. El cósmido 352 contiene un solapamiento de aproximadamente 2,7 kb con el cósmido 52. Para rastrear más cósmidos, se amplificó un fragmento de la PCR de aproximadamente 0,6 kb, usando los cebadores BIOSG136 5'-CACCGCTCGCGGGGTGGCGCGGCGCACGACGTGGCTGC-3' (SEC ID N.º 9) y BIOSG 137 5'-CCTCCTCGGACAGCGGATCAGCGCCGCGCACAGCGAG-3' (SEC ID N.º 10) y el cósmido 311 como molde aplicando protocolos estándar. Se rastreó el banco de cósmidos de *A. pretiosum* y se aisló el cósmido 410. Se solapa aproximadamente 17 kb con el cósmido 352 y se envió a secuenciación. Se ensambló la secuencia de los tres cósmidos solapantes (cósmido 52, cósmido 352 y cósmido 410). La región secuenciada abarca 100 kpb, y se identificaron 23 marcos abiertos de lectura que podían constituir la agrupación de genes biosintéticos de la macbecina. En la Tabla 3, se muestra la ubicación de cada marco abierto de lectura de la SEC ID N.º 11.

Tabla 2 – Resumen de los cósmidos

Cósmido	Cepa
Cósmido 43	ATCC 29888 de <i>Actinosynnema mirum</i>
Cósmido 46	ATCC 29888 de <i>Actinosynnema mirum</i>
Cósmido 52	ATCC 31280 de <i>Actinosynnema pretiosum</i>
Cósmido 311	ATCC 31280 de <i>Actinosynnema pretiosum</i>
Cósmido 352	ATCC 31280 de <i>Actinosynnema pretiosum</i>
Cósmido 410	ATCC 31280 de <i>Actinosynnema pretiosum</i>

Tabla 3 – Ubicación de cada uno de los marcos abiertos de lectura para los genes post-PKS y los genes de biosíntesis de la unidad iniciadora

Posición de los nucleótidos de la SEC ID N.º 11	Nombre del gen	Función de la proteína codificada
14925-17909*	<i>mbcRII</i>	regulador transcripcional
18025-19074c	<i>mbcO</i>	aminohidroquinato sintasa
19263-20066c*	<i>mbc?</i>	desconocida, biosíntesis de AHBA

(continuación)

Posición de los nucleótidos de la SEC ID N.º 11	Nombre del gen	Función de la proteína codificada
20330-40657	<i>mbcAI</i>	PKS
40654-50859	<i>mbcAII</i>	PKS
50867-62491*	<i>mbcAIII</i>	PKS
62500-63276*	<i>mbcF</i>	amido sintasa
63281-64852*	<i>mbcM</i>	C21 monooxigenasa
64899-65696c*	<i>PH</i>	fosfatasa
65693-66853c*	<i>OX</i>	oxidorreductasa
66891-68057c*	<i>Ahs</i>	AHBA sintasa
68301-68732*	<i>Adh</i>	ADHQ deshidratasa
68690-69661 c*	<i>AHk</i>	AHBA quinasa
70185-72194c*	<i>mbcN</i>	carbamoiltransferasa
72248-73339c	<i>mbcH</i>	ruta de la metoximalonil-ACP
73336-74493c	<i>mbcI</i>	ruta de la metoximalonil-ACP
74490-74765c	<i>mbcJ</i>	ruta de la metoximalonil-ACP
74762-75628c*	<i>mbcK</i>	ruta de la metoximalonil-ACP
75881-76537	<i>mbcG</i>	ruta de la metoximalonil-ACP
76534-77802*	<i>mbcP</i>	C4,5 monooxigenasa
77831-79054*	<i>mbcP450</i>	P450
79119-79934*	<i>mbcMT1</i>	O-metiltransferasa
79931-80716*	<i>mbcMT2</i>	O-metiltransferasa

[Nota 1: c indica que el gen está codificado por la cadena de ADN complementaria; Nota 2: a veces ocurre que se puede identificar más de un posible codón de inicio candidato. El experto en la técnica lo reconocerá y podrá identificar otros posibles codones de inicio alternativos. Se han indicado aquellos genes que tienen más de un posible codón de inicio con el símbolo “*”. A lo largo de la tabla, se indican los que se consideran codones de inicio. Sin embargo, el experto en la técnica apreciará que puede ser posible generar proteína activa usando un codón de inicio alternativo].

Ejemplo 2 – Generación de una cepa con *gdmM* desactivado

Se llevó a cabo una eliminación en marco de *gdmM* de la siguiente manera.

5 2.1 Clonación de homólogos de ADN a la región flanqueante secuencia arriba de *gdmM*

Se usan los oligos *gdm1for* (SEC ID N.º 12) y *gdm1rev* (SEC ID N.º 13) para amplificar una región de ADN de 2268 pb de *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *geldanus* (NRRL 3602) en una reacción PCR estándar usando ADN genómico como molde y ADN polimerasa de Pfu. Una prolongación de 5' en cada oligo introduce sitios de restricción para ayudar a la clonación del fragmento amplificado. El producto de la PCR (PCR_{gdm 1}) cubre una región de homología secuencia arriba de *gdmM* hasta e incluyendo los 2 primeros aminoácidos de *gdmM*. Se clonó este fragmento de 2268 pb en pUC18 que se linealizó con *SmaI* y se desfosforiló, dando pUC18_{gdm1}.

10

Subcultivo para recombinantes secundarios

- Tras otros 3-4 días de la incubación, se llevan a cabo etapas de subcultivo usando placas con medio 2 sin antibiótico. Para ello, se raspa material de cada parche, se siembra en una placa de agar con medio 2 y se incuba a 37 °C hasta que se observa un buen crecimiento, comúnmente, a los tres días. Se realiza una segunda, tercera y cuarta etapa de subcultivo mediante la misma técnica. Se incuba la cuarta etapa de subcultivo a 28 °C para permitir la esporulación. Cuando la esporulación se hace visible tras varios días (comúnmente, 7-10 días), se aíslan suspensiones de esporas y se llevan a cabo series de dilución mediante técnicas estándar. Se extienden alícuotas de las series de dilución en placas con medio 1 y se incuban a 28 °C hasta que las colonias se hacen visibles. Se recoge cada colonia y se siembra por parcheo en paralelo en placas de medio 1 con y sin apramicina.
- 5
- 10 Se vuelven a sembrar los parches que crecen en la placa sin antibiótico, pero que no crecen en la placa con apramicina sobre placas de +/- apramicina para confirmar la pérdida del marcador de antibiótico. La cepa mutante codifica una proteína GdmM inactiva con una eliminación en marco de 543 aminoácidos.

- Se siembran por parcheo los mutantes por eliminación de *gdmM* sobre medio 1 y se cultivan a 28 °C durante cuatro días. Se usa un tapón circular de 6 mm de cada parche para inocular tubos Falcon de 50 ml individuales que contienen 10 ml de medio sembrado (por litro; 40 g de glucosa, 10 g de melazas de remolacha, 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de peptona, 2,5 g de triptona, 5 g de harina de avena). Se incuban estos cultivos sembrados durante 36-72 h a 28 °C, 300 rpm con una incisión de 2,5 cm. Luego se usan para inocular (0,5 ml en 10 ml) el medio de producción (el mismo que el medio sembrado) y se cultivan a 28 °C durante 6 días. Se extraen los metabolitos secundarios y se analizan mediante CL-EM para la producción de análogos de geldanamicina según lo descrito en los Procedimientos generales. Se diseña un mutante, *gdmM*⁻ de *S. hygroscopicus*, que debería producir compuesto 1, que se espera que sea indistinguible de KOS-1806 (Rascher *et al.*, 2005). El experto en la técnica puede diseñar fácilmente otras estrategias de desactivación de *gdmM* alternativas, por ejemplo, mediante la integración o la generación de un mutante de interrupción mediante la inserción de un gen de resistencia según lo publicado por Rascher (2005).
- 15
- 20

25 **Ejemplo 3 – Generación de nuevos análogos de geldanamicina suministrando análogos de AHBA a la cepa con *gdmM* desactivado *gdmM*⁻ de *S. hygroscopicus***

3.1 Biotransformación usando *gdmM*⁻ de *S. hygroscopicus*:

- Se siembra por parcheo *gdmM*⁻ de *S. hygroscopicus*, cuya generación se describe en el Ejemplo 2 anterior, en placas de MAM (medio 1) y se cultivan a 28 °C durante tres días. Se usa un tapón circular de 6 mm para inocular tubos Falcon de 50 ml individuales que contienen 10 ml de medio sembrado (por litro; 40 g de glucosa, 10 g de melazas de remolacha, 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de peptona, 2,5 g de triptona, 5 g de harina de avena). Se incuban estos cultivos sembrados durante 36-72 h a 28 °C, 300 rpm con una incisión de 2,5 cm. Luego se usan para inocular (0,5 ml en 10 ml) el medio de producción (el mismo que el medio sembrado) y se cultivan a 28 °C durante 24 h. Se añaden 0,1 ml de una solución de cultivo patrón 200mM suministrada (en metanol, véase la lista de la Tabla 4) a cada tubo Falcon, dando una concentración suministrada final de 2mM. Se incuban los tubos durante 6 días más a 28 °C.
- 30
- 35

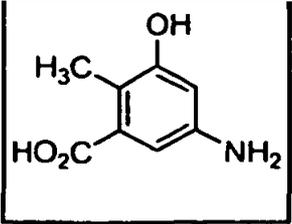
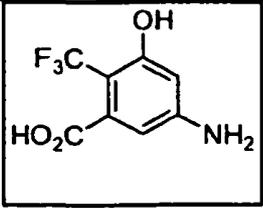
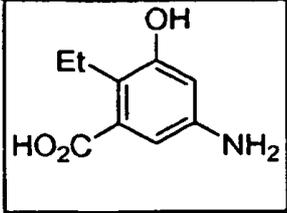
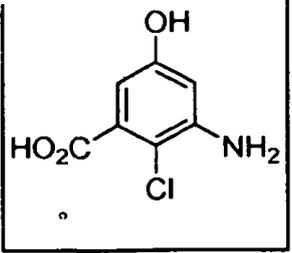
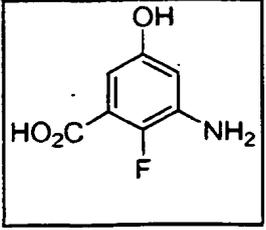
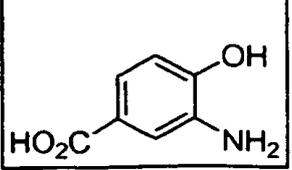
3.2 Identificación de nuevos análogos de geldanamicina mediante CL-EM en extractos de cultivo

- Se generan extractos de la fermentación descritos en el Ejemplo 3.1 y se analizan mediante CL-EM según lo descrito en los Procedimientos generales. En todos los casos, las principales ansamicinas que se espera observar se describen en la Tabla 4. La tabla describe el análogo de ácido benzoico sustituido que se suministra a la cepa, las principales masas de CL-EM y la masa de los compuestos principales. Las Figuras 3 y 4 muestran las estructuras de los compuestos que se espera producir.
- 40

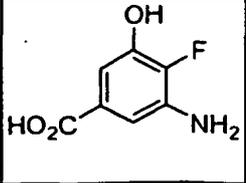
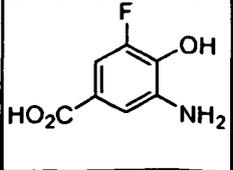
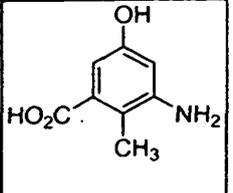
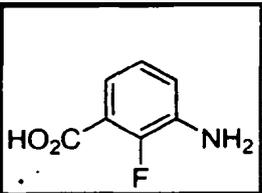
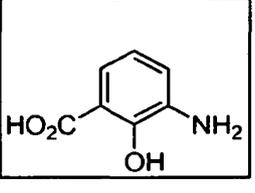
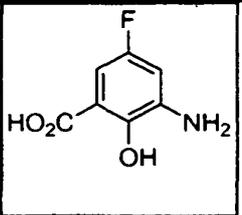
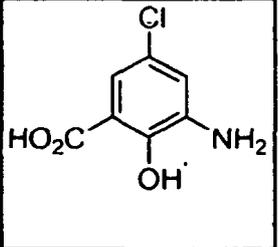
Tabla 4 – Compuestos identificados mediante CL-EM

Número del experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
3A		14	541	517	518,3
		15	525	501	502
3B		14	541	517	518,3
		16	541	517	518
3C		14	541	517	518,3
		17	543	519	520
3D		14	541	517	518,3
		18	543	519	520
3E		14	541	517	518,3
		19	559	535	536
3F		14	541	517	518,3
		20	561	537	538
3G		14	541	517	518,3
		21	579	555	556
3H		14	541	517	518,3
		22	559	535	536

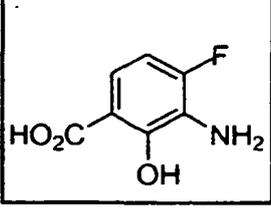
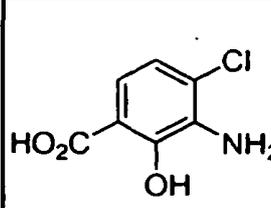
(Continuación)

Número del experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
3I		14	541	517	518,3
		23	555	531	532
3J		14	541	517	518,3
		24	609	585	586
3K		14	541	517	518,3
		25	569	545	546
3L		14	541	517	518,3
		26	575	551	552
3M		14	541	517	518,3
		27	559	535	536
3N		14	541	517	518,3
		28	541	517	518

(Continuación)

Número del experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
3O		14	541	517	518,3
		29	559	535	536
3P		14	541	517	518,3
		30	559	535	536
3Q		14	541	517	518,3
		31	555	531	532
3R		14	541	517	518,3
		32	543	519	520
3S		14	541	517	518,3
		33	541	517	518
3T		14	541	517	518,3
		34	559	535	536
3U		14	541	517	518,3
		35	575	551	552

(Continuación)

Número del experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
3V		14	541	517	518,3
		36	559	535	536
3W		14	541	517	518,3
		37	575	551	552

Ejemplo 4 – Generación de una cepa con desactivación de la biosíntesis de AHBA

- 5 La ventaja de producir una cepa con el/los gen/es implicado/s en la síntesis de AHBA desactivada es que hay una menor competición del AHBA natural en la cepa. El suministro de análogos de ácido benzoico sustituidos puede, por tanto, ser más eficaz y además conducir a una purificación más sencilla. El procedimiento que aparece a continuación está adaptado de Rascher *et al.*, 2005.

4.1 Construcción del plásmido pKC1139AHBA_{del}

- 10 Se usan los oligos LHSfor (SEC ID N.º 16) y LHSrev (SEC ID N.º 17) para amplificar una región de -1,65 kpb de ADN de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* (N RRL 3602) en una reacción PCR estándar usando ADN genómico como molde y ADN polimerasa de KOD. Se diseña una prolongación de 5' en cada oligo para introducir sitios de restricción que ayuden a la clonación del fragmento amplificado. El producto de la PCR amplificado (LHS de PCR) cubre una región de la cadena izquierda de la agrupación "B" de AHBA asociada con la producción de AHBA.
- 15 Se clona este fragmento de -1,65 kpb en pUC18 que se ha digerido previamente con *Sma*I y se desfosforila, dando pUC18LHS.

LHSfor CGCAAGCTTAGACCTCGACCACCGGTGTCTGGA
HindIII

(SEC ID N.º 16)

LHSrev CCGTCTAGACACGATTTCCAGCGCATGGCCCA
XbaI

(SEC ID N.º 17)

- 20 Se usan los oligos RHSfor (SEC ID N.º 18) y RHSrev (SEC ID N.º 19) para amplificar una región de ADN de -0,98 pb de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* (NRRL 3602) en una reacción PCR estándar usando ADN genómico como molde y ADN polimerasa de KOD. Se diseña una prolongación de 5' en cada oligo para introducir sitios de restricción que ayuden a la clonación del fragmento amplificado. El producto amplificado por PCR (LHS de PCR) cubre una región de la cadena derecha de la agrupación "B" de AHBA asociada con la producción de AHBA. Se clona este fragmento de -0,98 kpb en pUC18 que se ha digerido previamente con *Sma*I y se desfosforila, dando pUC18RHS.

RHSfor TGCTCTAGACTCACCCGCTCGCCTTCGTCA
XbaI
(SEC ID N.º 18)

RHSrev TGCGAATTCTGAGCCACCACGGCGTGTGACA
EcoRI
(SEC ID N.º 19)

5 Se clonan los productos PCRLHS y PCRRHS en pKC1139 en una etapa de la siguiente manera. Se digiere pKC1139 con *HindIII* y *EcoRI*, y se liga el fragmento de la estructura principal generado con PCRLHS en un fragmento de *HindIII/XbaI* y PCRRHS en un fragmento *XbaI/EcoRI*, tomando cada fragmento de PCR del clon pUC18, en una sola unión de tres partes. Se usa la digestión con enzimas de restricción para confirmar el plásmido final, que se designa pKC1139AHBA_{del}.

4.2 Transformación de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* (NRRL 3602) y selección de un mutante por eliminación de "B" de AHBA

10 Se transformó ET12567 de *Escherichia coli*, que alberga el plásmido pUZ8002, con pKC1139AHBA_{del} mediante electroporación para generar la cepa donante de *E. coli* para la conjugación. Se usa esta cepa para transformar *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* (NRRL 3602) mediante conjugación (Kieser *et al.*, (2000) Practical Streptomyces Genetics). Se siembran los exconjugantes en placas con medio 2 y se incuban a 28 °C. Se cubren las placas tras 24 h con 50 mg/l de apramicina y 25 mg/l de ácido nalidíxico. Los vectores basados en pKC1139 se autorreplican a 28 °C, de manera que se prevé que los transformantes contengan pKC1139AHBA_{del} como plásmido de autorreplicación. Tras 4-7 días, se siembran por parcheo las colonias en placas con medio 2 que contiene apramicina (50 mg/l) y ácido nalidíxico (25 mg/l). Luego se incuban las placas a 37 °C durante 3-4 días. Después se produce la integración del plásmido en el cromosoma mediante recombinación homóloga. Entonces se vuelven a sembrar por parcheo las colonias en placas con medio 2 que contiene apramicina y ácido nalidíxico, y se incuban a 37 °C durante 3-4 días para garantizar que no se pasan más células de *E. coli*.

20 Subcultivo para recombinantes secundarios

Tras otros 3-4 días de la incubación, se llevan a cabo etapas de subcultivo usando placas con medio 1 sin antibiótico.

25 Para ello, se raspa material de cada parche, se siembra en una placa de agar con medio 1 y se incuba a 37 °C hasta que se observa un buen crecimiento, comúnmente, a los tres días. Se realiza una segunda, tercera y cuarta etapa de subcultivo mediante la misma técnica. Se incuba la cuarta etapa de subcultivo a 28 °C para permitir la esporulación. Cuando la esporulación se hace visible tras varios días (comúnmente, 7-10 días), se aíslan suspensiones de esporas y se llevan a cabo series de dilución mediante técnicas estándar. Se extienden alícuotas de las series de dilución en placas con medio 1 y se incuban a 28 °C hasta que las colonias se hacen visibles. Se recoge cada colonia y se siembra por parcheo en paralelo en placas de medio 1 con y sin apramicina.

30 Se vuelven a sembrar los parches que crecen en la placa sin antibiótico, pero que no crecen en la placa de apramicina sobre placas de +/- apramicina para confirmar la pérdida del marcador de antibiótico. La cepa mutante contiene una gran eliminación en la región biosintética de "B" de AHBA.

35 Se siembran por parcheo los mutantes por eliminación sobre medio 1 y se cultivan a 28 °C durante cuatro días. Se usa un tapón circular de 6 mm de cada parche para inocular tubos Falcon de 50 ml individuales que contienen 10 ml de medio sembrado (por litro; 40 g de glucosa, 10 g de melazas de remolacha, 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de peptona, 2,5 g de triptona, 5 g de harina de avena). Se incuban estos cultivos sembrados durante 36-72 h a 28 °C, 300 rpm con una incisión de 2,5 cm. Luego se usan para inocular (0,5 ml en 10 ml) el medio de producción (el mismo que el medio sembrado) y se cultivan a 28 °C durante 6 días. Se extraen los metabolitos secundarios y se analizan mediante CL-EM para la producción de análogos de geldanamicina según lo descrito en los Procedimientos generales. Un mutante se designa AHBA de *S. hygroscopicus* y se caracteriza por la falta de producción de geldanamicina. Además, se debería restablecer la producción de geldanamicina suministrando AHBA a las 24 horas en la producción.

Ejemplo 5 – Generación de una cepa con desactivación tanto de gdmM como de la biosíntesis de AHBA mediante la transformación de gdmM⁻ de *Streptomyces hygroscopicus* con pKC1139AHBA^{del}

Se puede mejorar el éxito de alimentar a gdmM⁻ de *Streptomyces hygroscopicus* eliminando la competición por AHBA. Por lo tanto, mediante exactamente el mismo procedimiento que para el Ejemplo 4, se lleva a cabo una eliminación de "B" de AHBA en gdmM⁻ de *Streptomyces hygroscopicus*, generando una cepa superior para la producción de compuestos de la invención.

Se transformó ET12567 de *Escherichia coli*, que alberga el plásmido pUZ8002, con pKC1139AHBA^{del} mediante electroporación para generar la cepa donante de *E. coli* para la conjugación. Se usa esta cepa para transformar *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* (NRRL 3602) mediante conjugación usando procedimientos estándar (Kieser *et al.*, (2000) Practical Streptomyces Genetics). Los exconjugantes se seleccionaron según lo descrito anteriormente (Ejemplo 4) y los recombinantes secundarios se seleccionaron como se ha descrito anteriormente.

La cepa de doble eliminación final se designa gdmM-AHBAB⁻ de *Streptomyces hygroscopicus* y se caracteriza por su falta de producción de geldanamicina o análogos de geldanamicina. Cuando se complementan los cultivos de producción con AHBA, se restablece la producción de KOS-1806 (Rascher *et al.*, 2005).

Ejemplo 6 – Generación de nuevos análogos de geldanamicina, mediante el suministro a una cepa de gdmM⁻ y la síntesis AHBA desactivados: gdmM⁻AHBAB⁻ de *Streptomyces hygroscopicus*

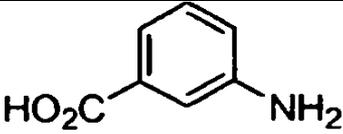
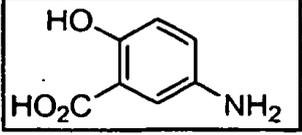
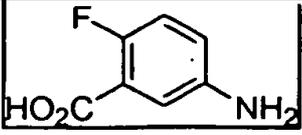
16.1. Biotransformación usando gdmM⁻AHBAB⁻ de *Streptomyces hygroscopicus*:

Se siembra por parcheo gdmM⁻AHBAB⁻ de *Streptomyces hygroscopicus*, cuya generación se describe en el Ejemplo 5 anterior, en placas de MAM (medio 1) y se cultivan a 28 °C durante tres días. Se usa un tapón circular de 6 mm para inocular tubos Falcon de 50 ml individuales que contienen 10 ml de medio sembrado (por litro; 40 g de glucosa, 10 g de melazas de remolacha, 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de peptona, 2,5 g de triptona, 5 g de harina de avena). Se incuban estos cultivos sembrados durante 36-72 h a 28 °C, 300 rpm con una incisión de 2,5 cm. Luego se usan para inocular (0,5 ml en 10 ml) el medio de producción (el mismo que el medio sembrado) y se cultivan a 28 °C durante 24 h. Se añaden 0,1 ml de solución de cultivo patrón suministrada 200mM (en metanol, véase la lista de la Tabla 5) a cada tubo Falcon, dando una concentración final suministrada de 2mM. Se incuban los tubos durante 6 días más a 28 °C.

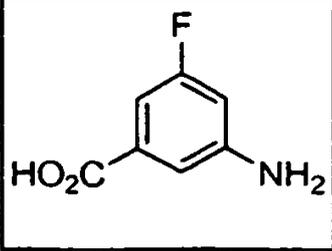
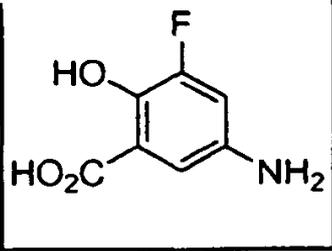
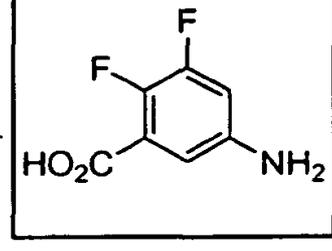
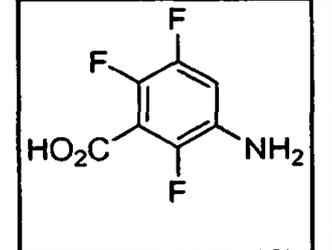
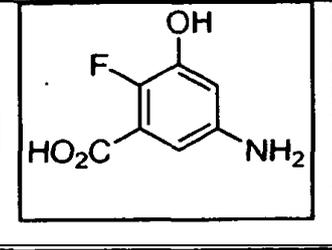
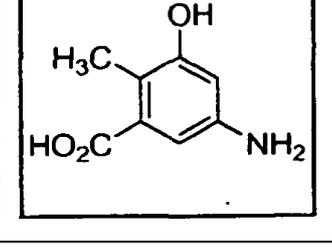
16.2 Identificación de nuevos análogos de geldanamicina mediante CL-EM en extractos de cultivo

Se generan extractos de la fermentación descritos en el Ejemplo 16.1 y se analizan mediante CL-EM según lo descrito en los Procedimientos generales. En todos los casos, las principales ansamicinas que se espera observar se describen en la Tabla 5, y estas ansamicinas no se deben ver en los extractos de las fermentaciones no alimentadas. La tabla describe el análogo de ácido benzoico sustituido que se suministra a la cepa, las masas de CL-EM y la masa del compuesto. Las Figuras 3 y 4 muestran las estructuras de los compuestos que se esperan producir.

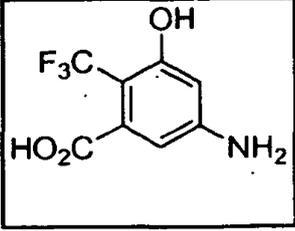
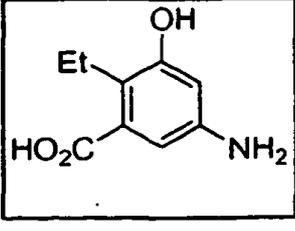
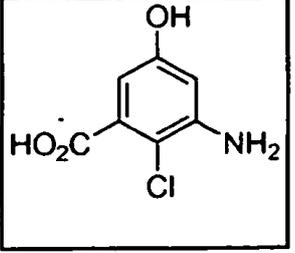
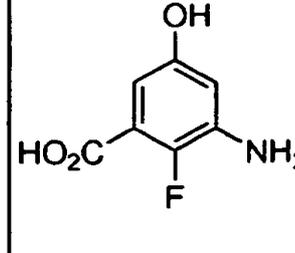
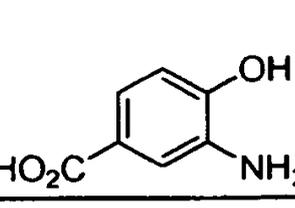
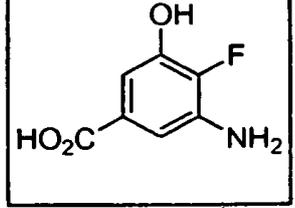
Tabla 5 – compuestos identificados mediante CL-EM

Número de experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
6A		15	525	501	502
6B		16	541	517	518
6C		17	543	519	520

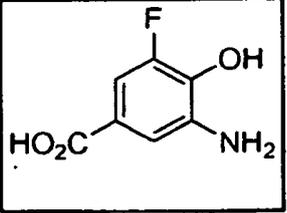
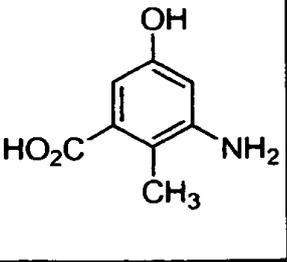
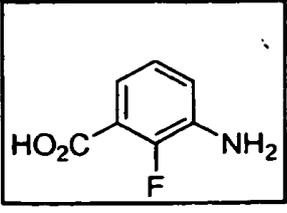
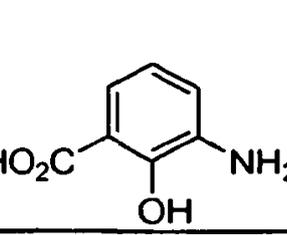
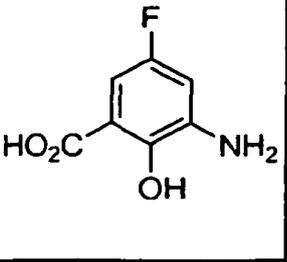
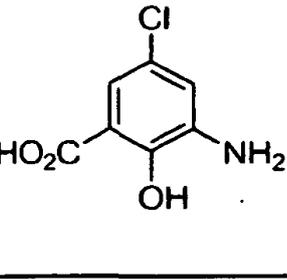
(Continuación)

Número de experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
6D		18	543	519	520
6E		19	559	535	536
6F		20	561	537	538
6G		21	579	555	556
6H		22	559	535	536
6I		23	555	531	532

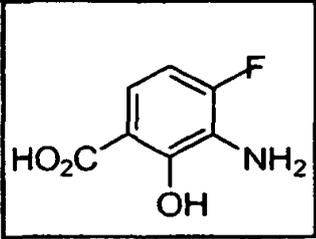
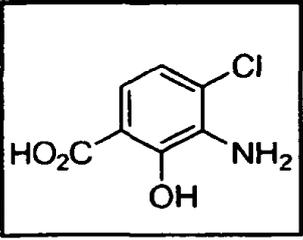
(Continuación)

Número de experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
6J	 <chem>Nc1cc(O)c(C(F)(F)F)c(C(=O)O)c1</chem>	24	609	585	586
6K	 <chem>Nc1cc(O)c(CC)c(C(=O)O)c1</chem>	25	569	545	546
6L	 <chem>Nc1cc(O)c(Cl)c(C(=O)O)c1</chem>	26	575	551	552
6M	 <chem>Nc1cc(O)c(F)c(C(=O)O)c1</chem>	27	559	535	536
6N	 <chem>Nc1ccc(O)c(C(=O)O)c1</chem>	28	541	517	518
6O	 <chem>Nc1cc(O)c(F)c(C(=O)O)c1</chem>	29	559	535	536

(Continuación)

Número de experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
6P	 <chem>Nc1cc(O)c(F)c(C(=O)O)c1</chem>	30	559	535	536
6Q	 <chem>Cc1cc(O)c(N)c(C(=O)O)c1</chem>	31	555	531	532
6R	 <chem>Nc1cc(F)c(C(=O)O)c1</chem>	32	543	519	520
6S	 <chem>Nc1cc(O)c(C(=O)O)c1</chem>	33	541	517	518
6T	 <chem>Nc1cc(O)c(F)c(C(=O)O)c1</chem>	34	559	535	536
6U	 <chem>Nc1cc(O)c(Cl)c(C(=O)O)c1</chem>	35	575	551	552

(Continuación)

Número de experimento	Análogo de AHBA suministrado	Compuesto producido	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	Masa
6V		36	559	535	536
6W		37	575	551	552

Todas las referencias que incluyen patentes y solicitudes de patente que aparecen en la presente solicitud están incorporadas en la presente memoria por referencia en la mayor extensión posible. A lo largo de la memoria y de las reivindicaciones que figuran a continuación, a no ser que el contexto exija lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende" y las variaciones tales como "que comprende" implican la inclusión de un número entero una etapa o un grupo de números enteros establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o de etapas.

Referencias

- Allen, I. W. y Ritchie, D. A. (1994), "Cloning and analysis of DNA sequences from *Streptomyces hygroscopicus* encoding geldanamycin biosynthesis". *Mol. Gen. Genet.* 243: 593-599.
- Bagatell, R. y Whitesell, L. (2004), "Altered Hsp90 function in cancer: A unique therapeutic opportunity". *Molecular Cancer Therapeutics* 3:1021-1030.
- Beliakoff, J. y Whitesell, L. (2004), "Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy". *Anti-Cancer Drugs* 15: 651-662.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Nagaraja Rao, R. y Schoner, B. E. (1992), "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp". *Gene* 116: 43-49.
- Blagosklonny, M. V. (2002), "Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogues". *Leukemia* 16:455-462.
- Blagosklonny, M.V., Toretzky, J., Bohlen, S. y Neckers, L. (1996), "Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90". *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 93:8379-8383.
- Bohlen, S.P. (1998), "Genetic and biochemical analysis of p23 and ansamicina antibiotics in the function of Hsp90-dependent signaling proteins". *Mol Cell Biol* 18:3330-3339.
- Carreras, C. W., Schirmer, A., Zhong, Z. y Santi D. V. (2003), "Filter binding assay for the geldanamycin-heat shock protein 90 interaction". *Analytical Biochemistry* 31.7:40-46.
- Cassady, J. M., Chan, K. K., Floss, H. G. y Leistner E. (2004), "Recent developments in the maytansinoid antitumour agents". *Chem. Pharm. Bull.* 52(1) 1-26.
- Chiosis, G., Huezio, H., Rosen, N., Mimnaugh, E., Whitesell, J. y Neckers, L. (2003), "17AAG: Low target binding affinity and potent cell activity - finding an explanation". *Molecular Cancer Therapeutics* 2:123-129.
- Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J. y Solit, D. (2004), "Hsp90: the vulnerable chaperone". *Drug Discovery Today* 9: 881-888.
- Csermely, P. y Soti, C. (2003), "Inhibition of Hsp90 as a special way to inhibit protein kinases". *Cell. Mol. Biol. Lett.*

8:514-515.

DeBoer, C y Dietz, A. (1976), "The description and antibiotic production of *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus*". *J. Antibiot.* 29:1182-1188.

5 DeBoer, C., Meulman, P. A., Wnuk, R. J., y Peterson, D. H. (1970), "Geldanamicina, a new antibiotic". *J. Antibiot.* 23: 442-447.

Dengler W. A., Schulte J., Berger D. P., Mertelsmann R. y Fiebig H. H. (1995), "Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay". *Anti-Cancer Drugs*, 6:522-532.

Dikalov, s., Landmesser, U., Harrison, DG., 2002, "Geldanamicina Leads to Superoxide Formation by Enzymatic and Non-enzymatic Redox Cycling", *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28), pp25480-25485.

10 Donze O. y Picard, D. (1999), "Hsp90 binds and regulates the ligand-inducible α subunit of eukaryotic translation initiation factor kinase Gcn2". *Mol Cell Biol* 19:8422-8432.

Egorin M. J., Lagattuta T. F., Hamburger D. R., Covey J. M., White K. D., Musser SM, Eiseman J. L. (2002), "Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats." *Cancer Chemother Pharmacol*, 49(1), pp 7-19.

15 Eustace, B. K., Sakurai, T., Stewart, J. K., et al. (2004), "Functional proteomics screens reveal an essential extracellular role for hsp90a in cancer cell invasiveness". *Nature Cell Biology* 6:507-514.

Fang, Y., Fliss, A. E., Rao, J. y Caplan A. J. (1998), "SBA1 encodes a yeast Hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins". *Mol Cell Biol* 18:3727-3734.

20 Fiebig H. H., Dengler W. A. y Roth T., "Human tumor xenografts: Predictivity, characterization, and discovery of new anticancer agents". En: Fiebig H. H., Burger A. M. (eds). "Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development". *Contrib. Oncol.* 1999, 54: 29 - 50.

Gregory, M. A., Till R, y Smith M. C. M. (2003), "Integration site for *Streptomyces* phage Φ PBT1 and the development of site-specific integrating vectors". *Journal of Bacteriology* 185: 5320-5323.

25 Goetz, M. P., Toft, D. O., Ames, M. M. y Ehrlich, C. (2003), "The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy". *Annals of Oncology* 14:1169-1176.

Harris, S. F., Shiau A. K. y Agard D. A. (2004), "The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site". *Structure* 12: 1087-1097.

30 Hong, Y.-S., Lee, D., Kim, W., Jeong, J.-K. et al. (2004), "Inactivation of the carbamoyltransferase gene refines post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent geldanamycin". *J. Am. Chem. Soc.* 126:11142-11143.

Hostein, I., Robertson, D., DiStefano, F., Workman, P. y Clarke, P.A. (2001), "Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis". *Cancer Research* 61:4003-4009.

35 Hu, Z., Liu, Y., Tian, Z.-Q., Ma, W., Starks, C.M. et al. (2004), "Isolation and characterization of novel geldanamycin analogues". *J. Antibiot.* 57:421-428.

Hur, E., Kim, H.-H., Choi, S. M., et al. (2002), "Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 α /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol". *Molecular Pharmacology* 62:975-982.

40 Iwai Y, Nakagawa, A., Sadakane, N., Omura, S., Oiwa, H., Matsumoto, S., Takahashi, M., Ikai, T., Ochiai, Y. (1980), "Herbimycin B, a new benzoquinoid ansamicin with anti-TMV y herbicidal activities". *The Journal of Antibiotics*, 33(10), pp1114-1119.

Jez, J. M., Chen, J. C.-H., Rastelli, G., Stroud, R. M. y Santi, D. V. (2003), "Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90". *Chemistry y Biology* 10:361-368.

45 Kaur, G., Belotti, D, Burger, A. M., Fisher-Nielson, K., Borsotti, P. et al. (2004), "Antiangiogenic properties of 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-Demethoxygeldanamycin: an orally bioavailable heat shock protein 90 modulator". *Clinical Cancer-Research* 10:4813-4821.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., y Hopwood, D.A. (2000), "Practical *Streptomyces* Genetics", John Innes Foundation, Norwich.

Kumar, R., Musiyenko, A. y Barik S. (2003), "The heat shock protein 90 of *Plasmodium falciparum* and antimalarial

- activity of its inhibitor, geldanamycin". *J Malar* 2:30.
- Kurebayashi, J., Otsuke, T., Kurosumi, M., Soga, S., Akinaga, S. y Sonoo, H. (2001), "A radicicol derivative, KF58333, inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1a and vascular endothelial growth factor, angiogenesis and growth of human breast cancer xenografts". *Jpn. J. Cancer Res.* 92:1342-1351.
- 5 Le Brazidec, J.-Y., Kamal, A., Busch, D., Thao, L., Zhang, L. *et al.* (2003), "Synthesis and biological evaluation of a new class of geldanamycin derivatives as potent inhibitors of Hsp90". *J. Med. Chem.* 47: 3865-3873.
- Lee M. H., Pascopella L, Jacobs W. R. Jr, Hatfull G. F. (1991), "Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium tuberculosis, and bacille Calmette-Guerin". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU.; 88:3111-5.
- 10 Lee, Y.-S., Marcu, M.G. y Neckers, L. (2004), "Quantum chemical calculations and mutational analysis suggest heat shock protein 90 catalyzes trans-cis isomerization of geldanamycin". *Chem. Biol.* 11:991-998.
- Liu, X.-D., Morano, K.A. y Thiele D.J. (1999); "The yeast Hsp110 family member, Sse1, is an Hsp90 cochaperone". *J Biol Chem* 274:26654-26660.
- 15 Mandler, R., Wu, C., Sausville, E. A., Roettinger, A. J., Newman, D. J., Ho, D. K., King, R., Yang, D., Lippman; M. E., Landolfi, N. F., Dadachova, E., Brechbiel, M. W. y Waldman, T. A. (2000), "Immunoconjugates of geldanamycin and anti-HER2 monoclonal antibodies: antiproliferative activity on human breast carcinoma cell lines". *Journal of the National Cancer Institute* 92:1573-1581.
- Matsushima, P., M. C. Broughton, *et al.* (1994). "Conjugal transfer of cosmid DNA from Escherichia coli to Saccharopolyspora spinosa: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production". *Gene* 146(1): 39-45.
- 20 Matsuura, M., Noguchi, T., Yamaguchi, D., Aida, T., Asayama, M., Takahashi, H. y Shirai, M. (1996). "The sre gene (ORF469) encodes a site-specific recombinase responsible for integration of the R4 phage genome". *J Bact.* 178(11):3374-3376.
- McLaughlin S. H., Smith, H. W. y Jackson S. E. (2002), "Stimulation of the weak ATPase activity of human Hsp90 by a client protein". *J. Mol. Biol.* 315: 787-798.
- 25 McCammon, M. T. y L. W. Parks (1981). "Inhibition of sterol transmethylation by S-adenosylhomocysteine analogs". *J Bacteriol* 145(1): 106-12.
- Muroi M, Izawa M, Kosai Y, Asai M. (1981), "The structures of macbecin I and II". *Tetrahedron*, 37, pp 1123-1130.
- Muroi, M., Izawa M., Kosai, Y., y Asai, M. (1980), "Macbecins I and II, New Antitumor antibiotics. II. Isolation and characterization". *J Antibiotics* 33:205-212.
- 30 Neckers, L (2003), "Development of small molecule Hsp90 inhibitors: utilizing both forward and reverse chemical genomics for drug identification". *Current Medicinal Chemistry* 9:733-739.
- Neckers, L. (2002), "Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents". *Trends in Molecular Medicine* 8: S55-S61.
- 35 Nimmanapalli, R., O'Bryan, E., Kuhn, D., Yamaguchi, H., Wang, H.-G. y Bhalla, K.N. (2003), "Regulation of 17-AAG-induced apoptosis: role of Bcl-2, Bcl-xL, and Bax downstream of 17-AAG-mediated down-regulation of Akt, Raf-1, and Src kinases". *Neoplasia* 102:269-275.
- Omura, S., Iwai, Y., Takahashi, Y., Sadakarie, N., Nakagawa, A., Oiwa, H., Hasegawa, Y., Ikai, T., (1979), "Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of Streptomyces". *The Journal of Antibiotics*, 32(4), pp255-261.
- 40 Omura, S., Miyano, K., Nakagawa, A., Sano, H., Komiyama, K., Umezawa, I., Shibata, K, Satsumabayashi, S., (1984), "Chemical modification and antitumor activity of Herbimycin A. 8,9-epoxide, 7,9-carbamate, and 17 or 19-amino derivatives". *The Journal of Antibiotics*, 37(10), pp1264-1267.
- Ono, Y., Kozai, Y. y Ootsu, K. (1982), "Antitumor and cytotoxic activities of a newly isolated benzenoid ansamycin, Macbecin I". *Gann.* 73:938-44.
- 45 Patel, K., M. Piagentini, Rascher, A., Tian, Z. Q., Buchanan, G. O., Regentin, R., Hu, Z., Hutchinson, C. R. y McDaniel, R. (2004). "Engineered biosynthesis of geldanamycin analogs for hsp90 inhibition". *Chem Biol* 11 (12): 1625-33.
- Pfeifer, B. A. y C. Khosla (2001). "Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(1): 106-118.
- Rascher, A., Hu, Z., Viswanathan, N., Schirmer, A. *et al.* (2003), "Cloning and characterization of a gene cluster

- for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602". *FEMS Microbiology Letters* 218:223-230.
- 5 Rascher, A., Z. Hu, Buchanan, G. O., Reid, R. y Hutchinson, C. R. (2005). "Insights into the biosynthesis of the benzoquinone ansamycin geldanamycin and herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption". *Appl Environ Microbiol* 71(8): 4862-71.
- Rawlings, B. J. (2001). "Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part B)". *Natural Product Reports* 18(3): 231-281.
- 10 Roth T., Burger A. M., Dengler W., Willmann H. y Fiebig H. H. "Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening". En: Fiebig H. H, Burger A. M (eds). "Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development". *Contrib. Oncol.* 1999, 54: 145 - 156.
- Rowlands, M. G., Newbatt, Y. M., Prodromou, C., Pearl, L. H., Workman, P. y Aherne, W. (2004), "High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity". *Analytical Biochemistry* 327:176-183
- 15 Schulte, T. W., Akinaga, S., Murakata, T., Agatsuma, T. *et al.* (1999), "Interaction of radicicol with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones". *Molecular Endocrinology* 13:1435-1488.
- Shibata, K., Satsumabayashi, S., Nakagawa, A., Omura, S. (1986a), "The structure and cytotoxic activity of herbimycin C". *The Journal of Antibiotics*, 39(11), pp1630-1633.
- Shibata, K., Satsumabayashi, S., Sano, H., Komiyama, K., Nakagawa, A., Omura, S. (1986b), "Chemical modification of Herbimycin A: synthesis and in vivo antitumor activities of halogenated and other related derivatives of herbimycin A". *The Journal of Antibiotics*, 39(3), pp415-423.
- 20 Shirling, E. B. y Gottlieb, D. (1966), "International Journal of Systematic Bacteriology", 16:313-340
- Smith-Jones, P. M., Solit, D. B., Akhurst, T., Afroze, F., Rosen, N. y Larson, S. M. (2004), "Imaging the pharmacodynamics of HER2 degradation in response to Hsp90 inhibitors". *Nature Biotechnology* 22:701-706.
- 25 Smovkina, T., Mazodier, P., Boccard, F., Thompson, C. J. y Guerineau, M. (1990), "Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes". *Gene* 94: 53-59.
- Spiteller, P., Bai, L., Shang, G., Carroll, B.J., Yu, T.-W. y Floss, H. G. (2003). "The post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent ansamitocin by *Actinosynnema pretiosum*". *J Am Chem Soc* 125(47): 14236-7
- 30 Sreedhar A.S., Nardai, G. y Csermely, P. (2004), "Enhancement of complement-induced cell lysis: a novel mechanism for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors". *Immunology Letters* 92:157-161.
- Sreedhar, A.S., Soti, C. y Csermely, P. (2004a), "Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases". *Biochimica Biophysica Acta* 1697:233-242.
- Staunton, J. y K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." *Natural Product Reports* 18(4): 380-416.
- 35 Stead, P., Latif, S., Blackaby, A. P. *et al.* (2000), "Discovery of novel ansamycin derivatives possessing potent inhibitory activity in a cell-based oncostatin M signalling assay". *J Antibiotics* 53:657-663.
- Supko, J.G., Hickman, R. L., Grever, M. R. y Malspeis, L (1995), "Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent". *Cancer Chem- other. Pharmacol.* 36:305-315.
- 40 Takahashi, A., Casais, C., Ichimura K. y Shirasu, K. (2003), "HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 20:11777-11782.
- Tanida, S., Hasegawa, T. y Higashide E. (1980), "Macbecins I and II, New Antitumor antibiotics. I. Producing organism, fermentation and antimicrobial activities". *J Antibiotics* 33:199-204.
- Tian, Z.-Q., Liu, Y., Zhang, D., Wang, Z. *et al.* (2004), "Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives". *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12:5317-5329.
- 45 Uehara, Y. (2003), "Natural product origins of Hsp90 inhibitors". *Current Cancer Drug Targets* 3:325-330.
- Van Mellaert, L., Mei, L., Lammertyn, E., Schacht, S., y Anne, J. (1998), "Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector". *Microbiology* 144:3351-3358.

- Vasilevskaya, I. A.; Rakitina, T. V. y O'Dwyer, P. J. (2003), "Geldanamycin and its 17-Allilamino-17-Demetoxi analogue antagonize the action of cisplatin in human colon adenocarcinoma cells: differential caspase activation as a basis of interaction". *Cancer Research* 63: 3241-3246.
- 5 Watanabe, K., Okuda, T., Yokose, K., Furumai, T. y Maruyama, H.H. (1982), "Actinosynnema mirum, a new producer of nocardicin antibiotics". *J. Antibiot.* 3:321-324.
- Weber, J. M., Losick, R. (1988), "The use of a chromosome integration vector to a map erythromycin resistance and production genes in *Sacharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*)". *Gene* 68(2), 173-180
- Wegele, H., Müller, L. y Buchner, J. (2004), "Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding". *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151:1-44.
- 10 Wenzel, S.C., Gross, F, Zhang, Y., Fu, J., Stewart, A. F. y Müller, R (2005), "Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in *Pseudomonads* via Red/ET recombineering". *Chemistry & Biology* 12: 249-356.
- 15 Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. y Neckers, L.M. (1994), "Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamicinas: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91: 8324-8328.
- Winklhofer, K.F., Heller, U., Reintjes, A. y Tatzelt J. (2003), "Inhibition of complex glycosylation increases the formation of PrPsc". *Traffic* 4:313-322.
- Workman P. (2003), "Auditing the pharmacological accounts for Hsp90 molecular chaperone inhibitors: unfolding the relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics". *Molecular Cancer Therapeutics* 2:131-138.
- 20 Workman, P. y Kaye, S.B. (2002), "Translating basic cancer research into new cancer therapeutics". *Trends in Molecular Medicine* 8:S1-S9.
- Young, J. C.; Moarefi, I. y Hartl, U. (2001), "Hsp90: a specialized but essential protein folding tool". *J. Cell. Biol.* 154: 267-273.

Listado de secuencias

- 25 <110> Biotica Technology Limited
Martin, Christine
- <120> NUEVOS COMPUESTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU PRODUCCIÓN
- <130> BOA- P132PC
- 30 <150> GB 0622342.4 4
<151> 09-11-2006
- <150> GB 0720875.4
<151> 24-10-2007
- <160> 19
- <170> Patent In versión 3. 4
- 35 <210> 1
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Cebador
- <400> 1
ggt ct agagg t cagt gcccc cgcgt accgt cgt 33
- 45 <210>2
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 389 740 T3

<220>
<223> Cebador

<400> 2
ggcatatgct tggctcggg ct caac 26

5 <210>3
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 3
cccgcccgcg cgagcggcgc gtggccgccc gagggc 36

15 <210>4
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

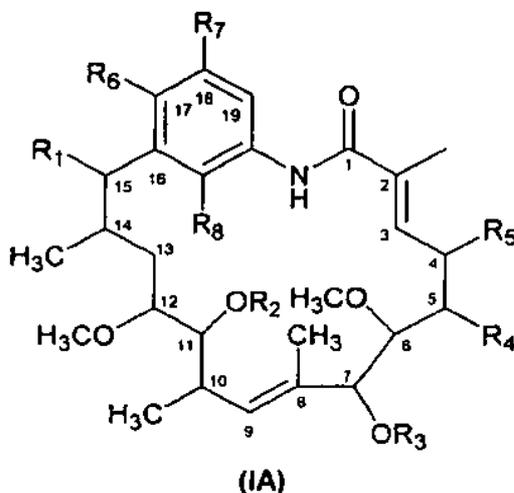
<220>
<223> Cebador

20 <400> 4
gcgtcctcgc gcagccacgc caccagcagc tccagc 36

<210>5
<211> 35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (IA) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:



en la que:

- 5 R₁ representa H, OH o OMe;
R₂ representa H o Me;
R₃ representa H o CONH₂;
R₄ y R₅ representan ambos H;
R₆ representa H, OH, OMe o F;
- 10 R₇ representa H o F;
R₈ representa H o F;
R₉ representa H.
2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que:
- cuando R₆ representa H o OH, entonces no todos los R₇, R₈ y R₉ representan H.
- 15 3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que R₁ representa H.
4. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que R₁ representa OH.
5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R₂ representa H.
6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R₃ representa CONH₂.
7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R₆, R₇ y R₈ no representan todos H.
- 20 8. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R₆, R₇ y R₈ representan todos H.
9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que cuando R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, R₆ representa H y R₇ representa H, entonces R₈ no representa H.
10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R₆ representa H o F.
- 25 11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R₁ representa H, R₂ representa H y R₃ representa CONH₂ y R₆ representa OH.
12. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, R₆ representa OH y cada uno de R₇ y R₈ representa H.
13. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, R₆ representa F y cada uno de R₇ y R₈ representa H.
- 30 14. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, R₆ representa F y cada uno de R₇ y R₈ representa H.
15. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, R₆

representa H, R₇ representa F y R₈ representa H.

16. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, R₆ representa OH, R₇ representa F y R₈ representa H.

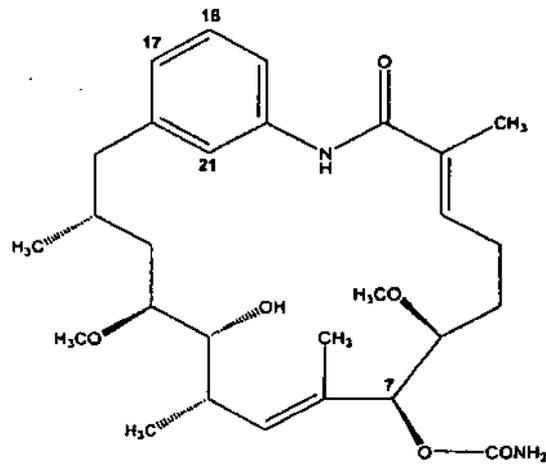
5 17. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, R₆ representa H, R₇ representa F y R₈ representa H.

18. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₆ y R₇ representa F y R₈ representa H.

19. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa OH, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₆ y R₇ representa F y R₈ representa H.

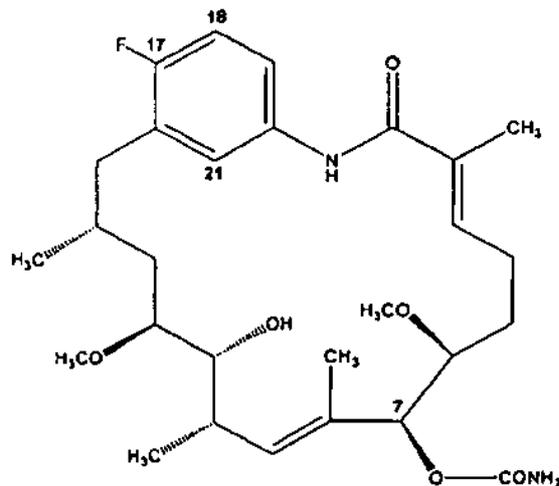
10 20. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa CONH₂, cada uno de R₆, R₇ y R₈ representa F.

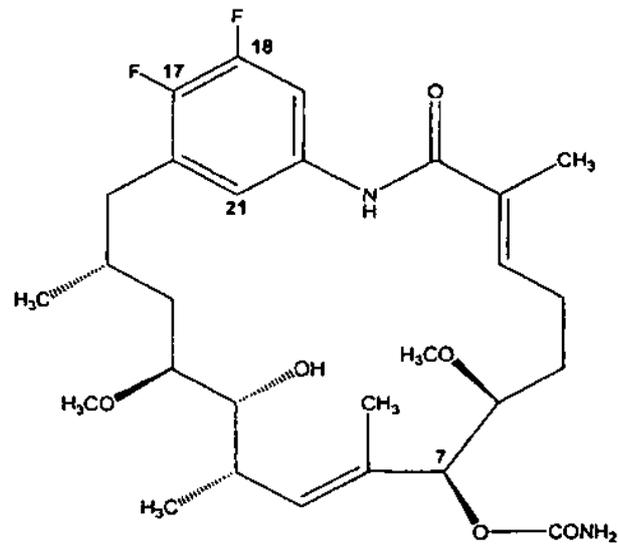
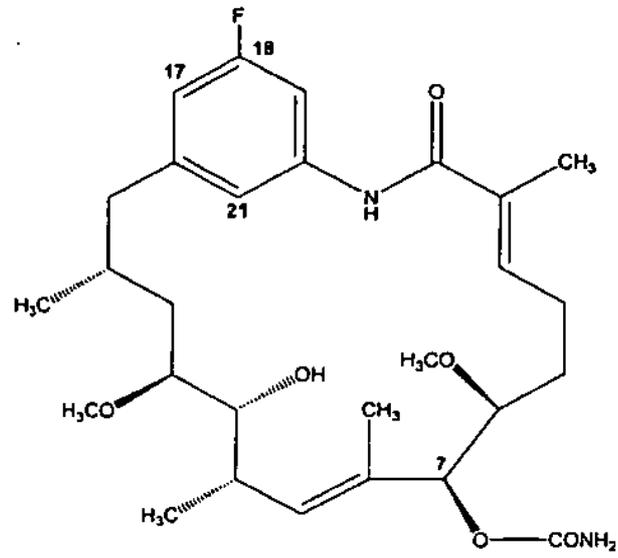
21. Un compuesto según la reivindicación 1, que es:

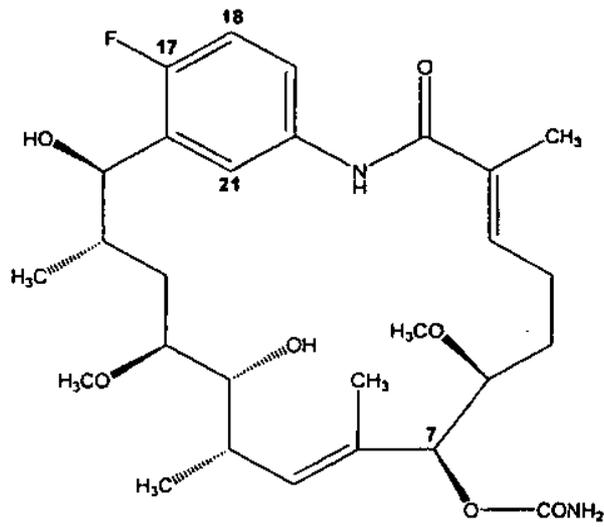
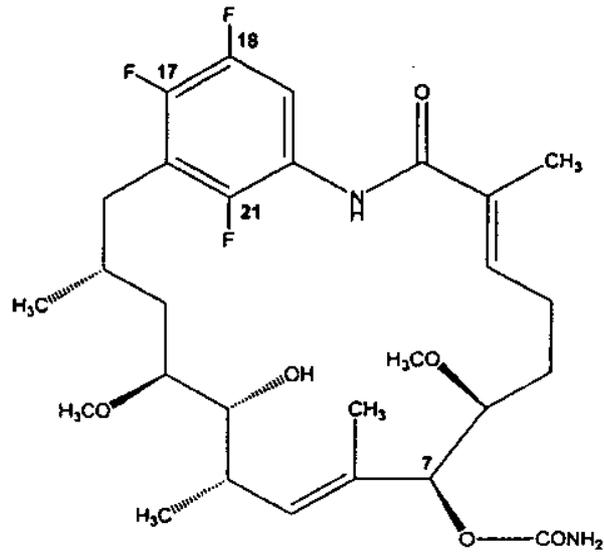


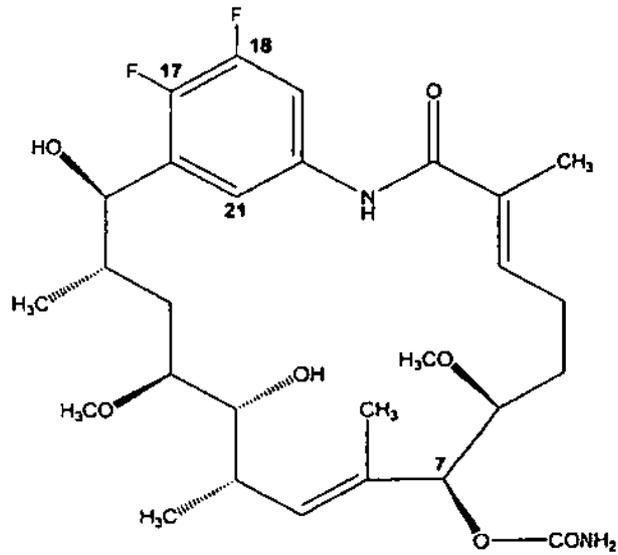
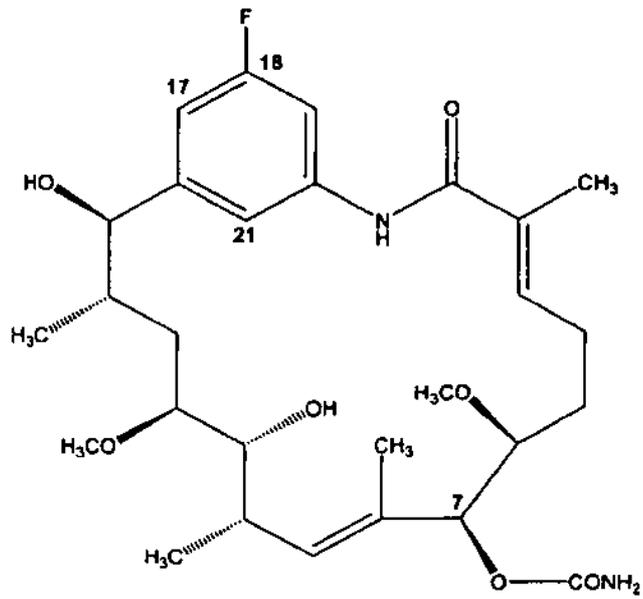
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

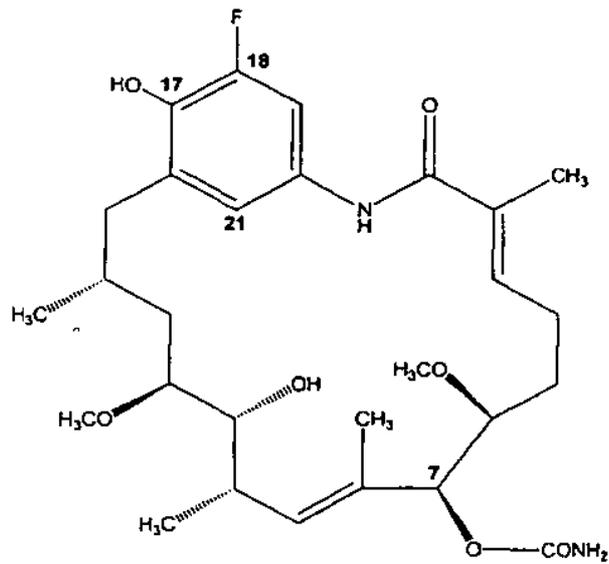
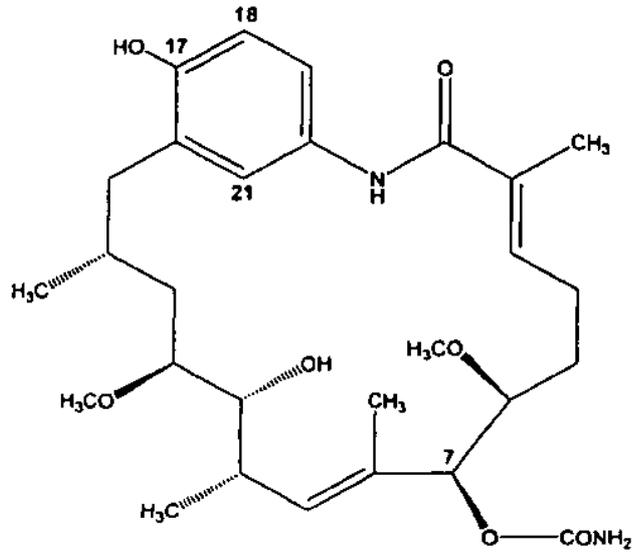
15 22. Un compuesto según la reivindicación 1, que se selecciona entre:





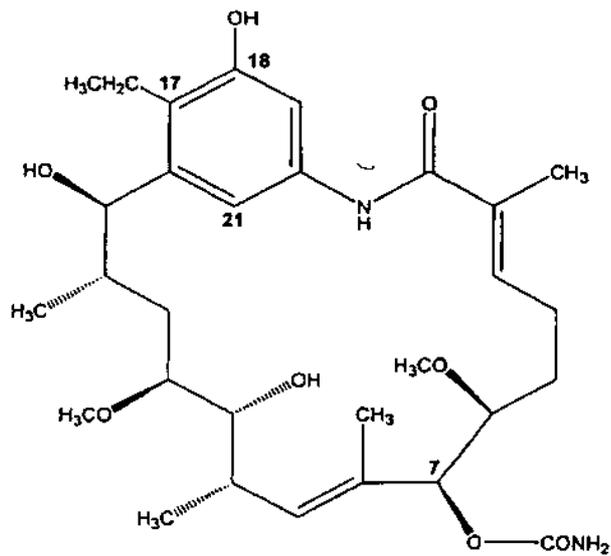
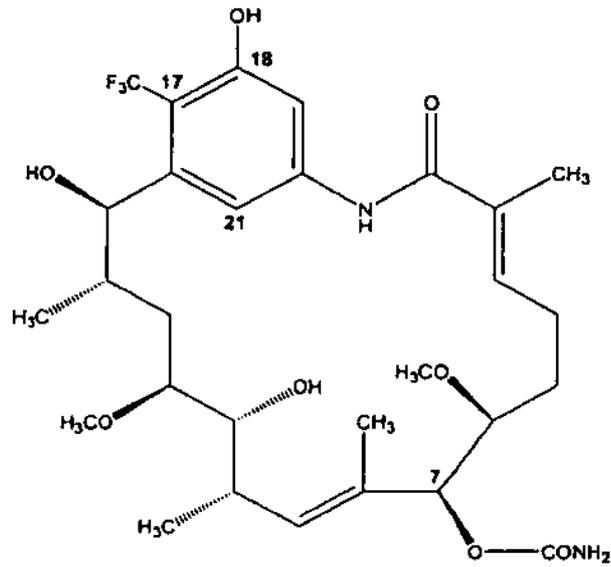






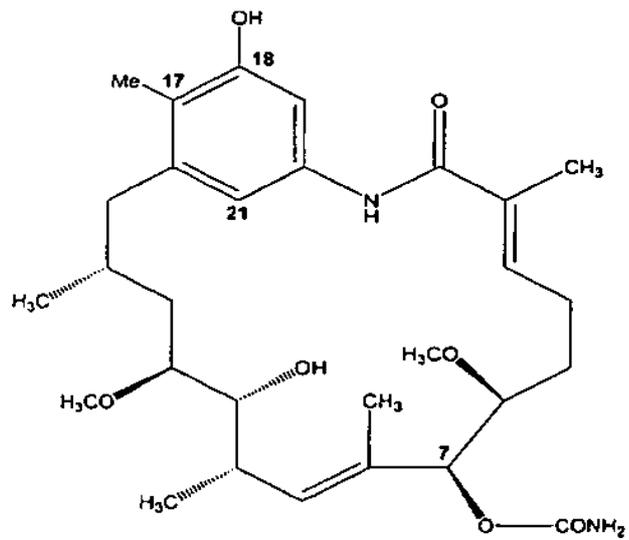
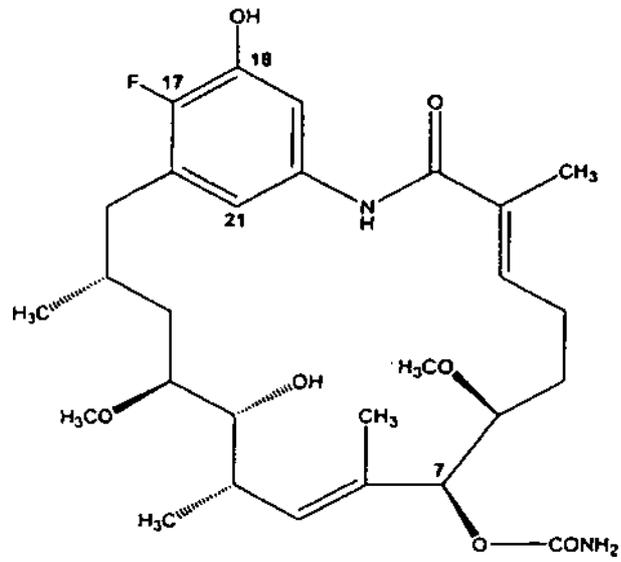
y las sales farmacéuticamente aceptables de uno cualquiera de los mismos.

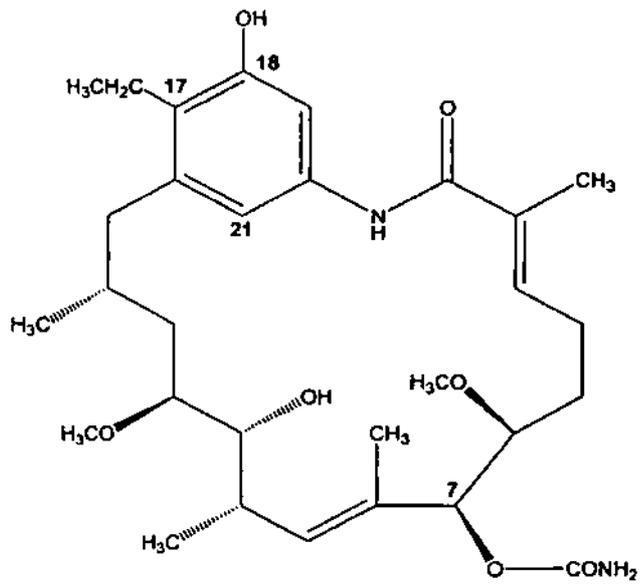
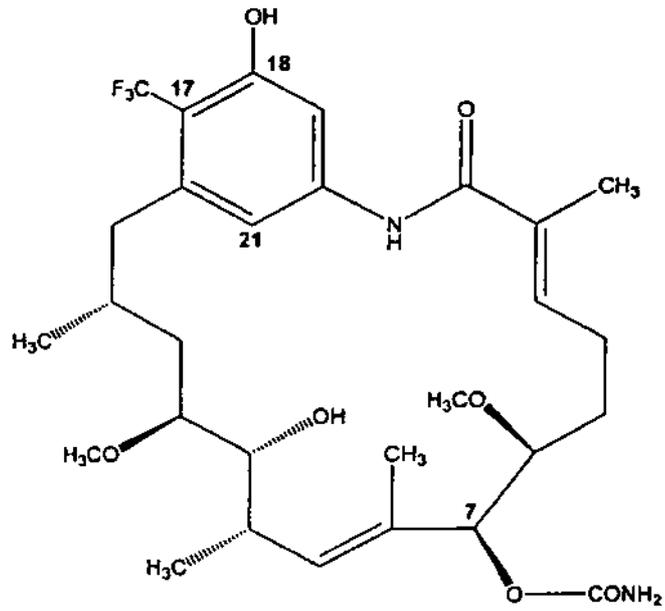
23. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado entre:

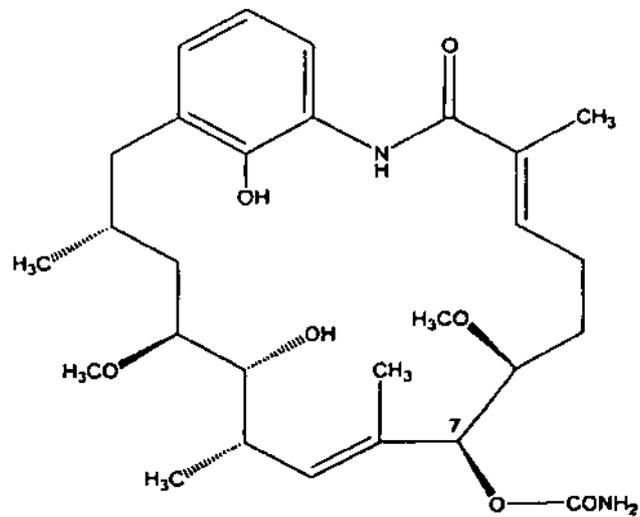
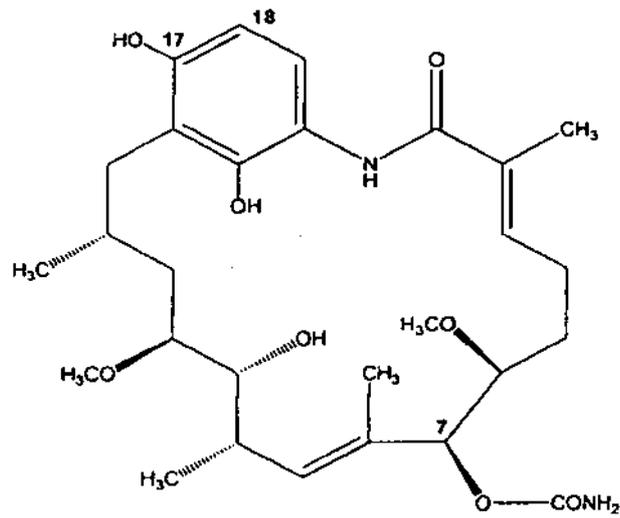
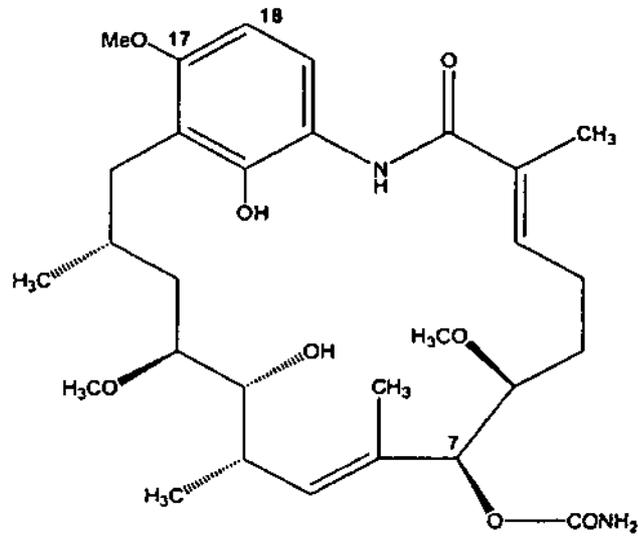


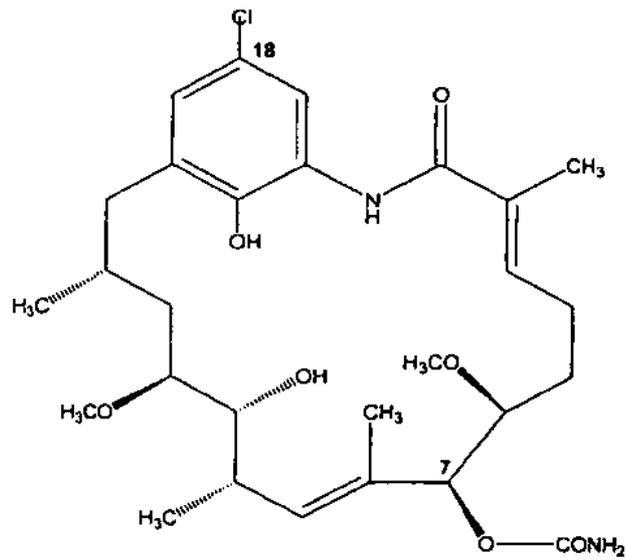
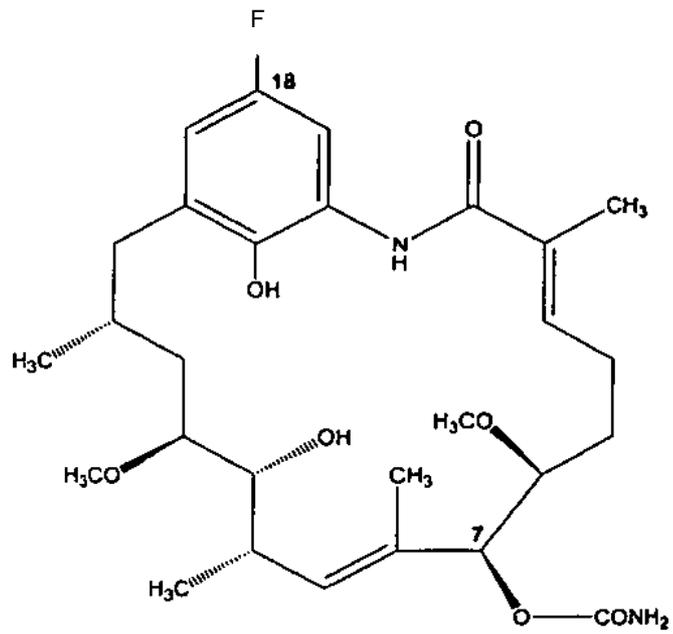
y las sales farmacéuticamente aceptables de uno cualquiera de los mismos.

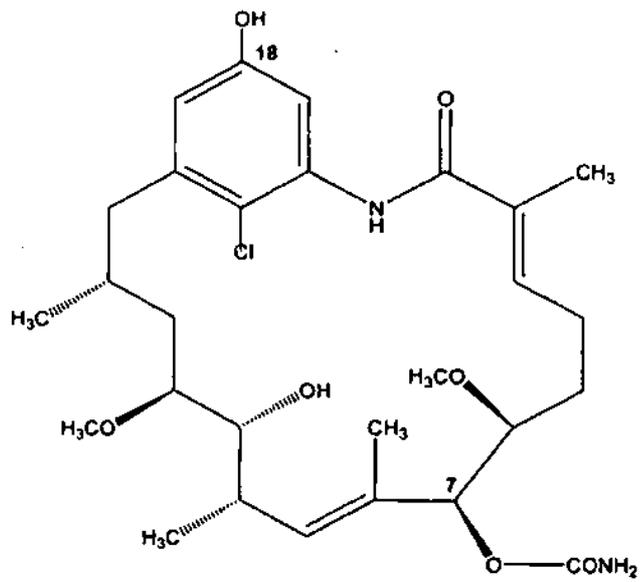
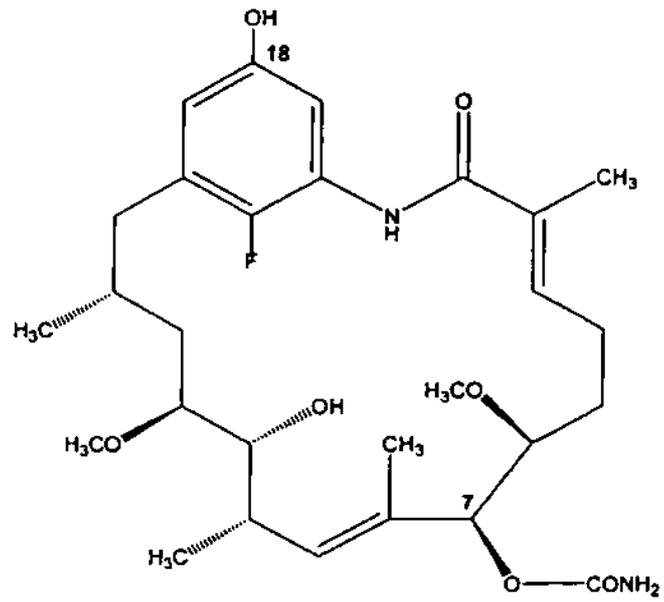
- 5 24. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado entre:

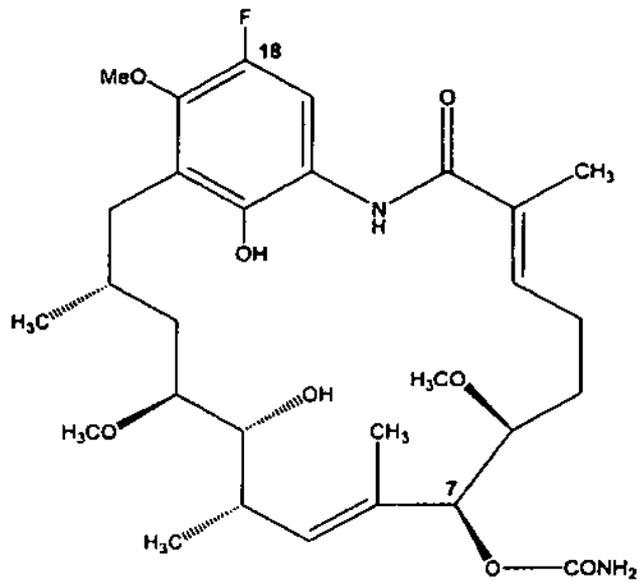






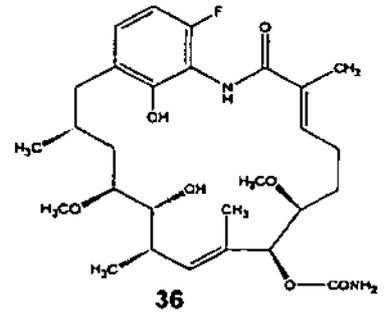
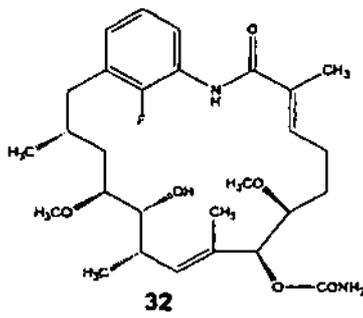
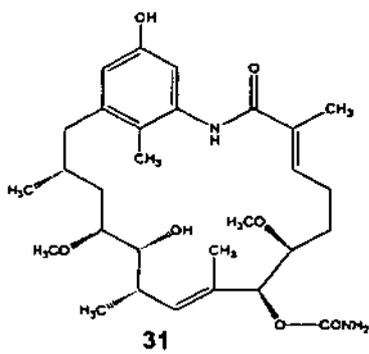
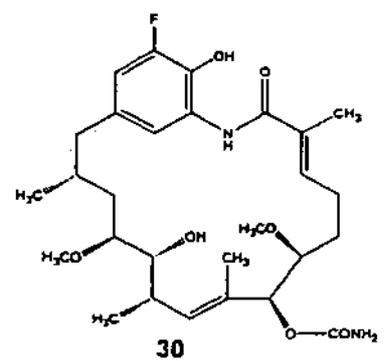
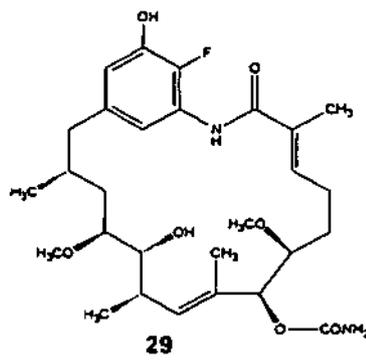
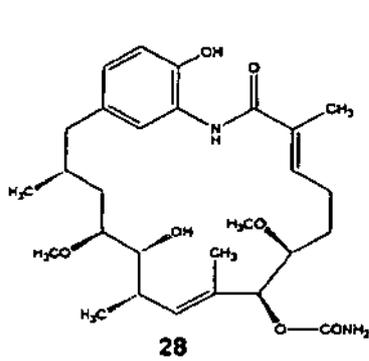




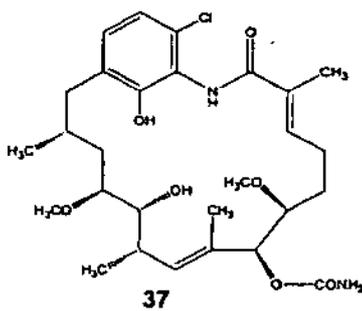


y las sales farmacéuticamente aceptables de uno cualquiera de los mismos.

25. Un compuesto seleccionado entre:



5



y las sales farmacéuticamente aceptables de uno cualquiera de los mismos.

26. Un procedimiento para preparar un análogo de ansamicina según la reivindicación 1 que comprende:

- 5 a) proporcionar una cepa que produzca una ansamicina o un análogo de la misma cuando se cultiva en condiciones apropiadas;
 b) suministrar una unidad iniciadora que no sea AHBA a dicha cepa de modo que la unidad iniciadora se incorpore a dicho análogo de ansamicina;
 c) cultivar dicha cepa en condiciones adecuadas para la producción de un análogo de ansamicina; y
 d) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.

10 27. Un procedimiento según la reivindicación 26, en el que la unidad iniciadora suministrada en la etapa (b) no es ácido 3-aminobenzoico.

28. Un procedimiento según la reivindicación 26 ó 27, en el que la unidad iniciadora suministrada en la etapa (b) no es ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico ni ácido 3-amino-4-clorobenzoico.

29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a la reivindicación 28, en el que la cepa de a) se **caracteriza por** ser una cepa en la que se han eliminado o desactivado uno o más genes de la biosíntesis de AHBA.

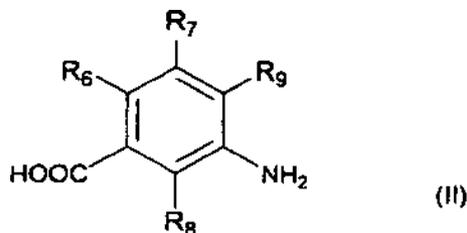
15 30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a la reivindicación 28, en el que la cepa de a) está mutada para disminuir la eficacia de la biosíntesis de AHBA.

31. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 o la reivindicación 32, en el que las condiciones de la etapa c) son tales que la eficacia de la biosíntesis de AHBA es subóptima.

20 32. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que el AHBA es producido por la cepa hasta un nivel que, no obstante, permita la incorporación de la unidad iniciadora no natural suministrada.

33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que la cantidad de unidad iniciadora no natural suministrada incorporada es > 20 % de la incorporación de unidad iniciadora total.

34. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33, en el que la unidad iniciadora se selecciona de:



25 en el que R₆, R₇, R₈ y R₉ son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20;
 o un análogo del mismo, en el que se deriva el resto ácido.

30 35. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, en el que la cepa es una cepa productora de ansamicina y la unidad iniciadora se selecciona de modo que la cepa produzca un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina.

36. Un procedimiento según la reivindicación 35, en el que la unidad iniciadora se selecciona de modo que la cepa produzca un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina que está opcionalmente sustituido con flúor.

37. Un procedimiento según la reivindicación 36, en el que la unidad iniciadora se selecciona de modo que la cepa produzca un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina que está sustituido con flúor.

35 38. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en el que la cepa es una cepa productora de ansamicina y la unidad iniciadora se selecciona de modo que la cepa produzca un análogo de ansamicina que no esté sustituido en las posiciones 18 ó 21 del anillo de benceno.

40 39. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 38 que (i) comprende además la etapa de someter el producto de la etapa (d) a un proceso de modificación química o biotransformación, opcionalmente seguido por la etapa de aislamiento de los compuestos resultantes o (ii) que comprende además la etapa de someter el producto de la etapa (c) a un proceso de modificación química o biotransformación anterior a la etapa (d).

40. Un procedimiento para la generación de análogos de ansamicina según la reivindicación 1, procedimiento que comprende:

- a) proporcionar una primera cepa huésped que produzca una ansamicina o un análogo de la misma cuando se cultive en condiciones apropiadas en las que, opcionalmente, se hayan eliminado o desactivado uno o más genes post-PKS y/o se hayan eliminado o desactivado uno o más genes de biosíntesis de la unidad iniciadora;
- b) suministrar a dicha cepa una unidad iniciadora no natural;
- 5 d) cultivar dicha cepa huésped modificada en condiciones adecuadas para la producción de análogos de ansamicina; y
- d) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.
41. Un procedimiento según la reivindicación 40, en el que la unidad iniciadora no es ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico ni ácido 3-amino-4-clorobenzoico.
- 10 42. Un procedimiento según la reivindicación 40 o la reivindicación 41, en el que la unidad iniciadora no es ácido 3-amino-benzoico.
43. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 42, en el que la unidad iniciadora suministrada es un ácido iniciador.
- 15 44. Un análogo de ansamicina que se puede obtener mediante el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 43.
45. Una composición farmacéutica que comprende un análogo de ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 44, junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 20 46. Un análogo de ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 44 o una composición según la reivindicación 45 para su uso como un medicamento.
47. Un análogo de ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 44, o una composición según la reivindicación 45 para su uso en el tratamiento de cáncer, tumores malignos de linfocitos B, malaria, infección fúngica, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas, enfermedades dependientes de la angiogénesis, enfermedades autoinmunes y/o
- 25 como un pretratamiento profiláctico para el cáncer.
48. Un análogo de ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o una composición para su uso según la reivindicación 46 ó 47, en el que el análogo de ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra en combinación con otro tratamiento.
- 30 49. Un análogo de ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o una composición para su uso según la reivindicación 48, en el que el otro tratamiento se selecciona del grupo que consiste en: bleomicina, capecitabina, cisplatino, citarabina, ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, leucovorina, metotrexato, mitoxantona, los taxanos que incluyen paclitaxel y docetaxel, vincristina, vinblastina y vinorelbina; las terapias hormonales, anastrozol, goserelina, acetato de megestrol, prednisona, tamoxifeno y toremifeno; las terapias de anticuerpos monoclonales tales como el trastuzumab (anti-Her2), cetuximab (anti-EGFR) y bevacizumab (anti-VEGF); y los inhibidores de la proteína quinasa tales como imatinib, dasatinib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, temsirolimus; los inhibidores del proteasoma tales como bortezomib; inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) tales como el vorinostat; inhibidores de la angiogénesis tales como sunitinib, sorafenib, lenalidomida, radioterapia o cirugía.
- 35 50. Un procedimiento para la producción de un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 44, procedimiento que comprende:
- a) proporcionar una primera cepa huésped que produzca una ansamicina o un análogo de la misma cuando se cultive en condiciones apropiadas;
- b) suministrar a dicha cepa una unidad iniciadora no natural;
- 45 c) cultivar dicha cepa huésped en condiciones adecuadas para la producción de análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina; y
- d) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.
51. Un procedimiento para la producción de un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 50, procedimiento que comprende:
- 50 a) proporcionar una primera cepa huésped que produzca geldanamicina o un análogo de la misma cuando se cultive en condiciones apropiadas;
- b) suministrar a dicha cepa una unidad iniciadora no natural;
- c) cultivar dicha cepa huésped en condiciones adecuadas para la producción de análogos de 18,21-didesoxi-ansamicina; y
- 55 d) opcionalmente, aislar los compuestos producidos.

52. El procedimiento según la reivindicación 50 ó 51, en el que el procedimiento comprende además la etapa de:
- e) eliminar o desactivar uno o más de los genes de biosíntesis de la unidad iniciadora, o un homólogo de los mismos, teniendo lugar dicha etapa habitualmente antes de la etapa c).
53. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 52, en el que el procedimiento comprende además la etapa de:
- f) eliminar o desactivar uno o más genes post-PKS, teniendo lugar dicha etapa habitualmente antes de la etapa c).
54. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, en el que la unidad iniciadora no natural de la etapa b) es un ácido 3-amino-benzoico.
55. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, en el que la unidad iniciadora no natural de la etapa b) es un ácido 5-amino-2-fluorobenzoico, ácido 5-amino-3-fluorobenzoico, ácido 5-amino-2,3-difluorobenzoico o ácido 5-amino-2,3,6-trifluorobenzoico.
56. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 55, en el que en la etapa (a), la cepa es una cepa productora de ansamicina.
57. El procedimiento según la reivindicación 56, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa productora de geldanamicina.
58. El procedimiento según la reivindicación 56, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa productora de herbimicina.
59. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 58, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes de biosíntesis de la unidad iniciadora.
60. El procedimiento según la reivindicación 59, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes de biosíntesis de la unidad iniciadora.
61. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 60, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes post-PKS.
62. El procedimiento según la reivindicación 61, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes post-PKS.
63. El procedimiento según la reivindicación 61, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de herbimicina, en la que se han eliminado o desactivado uno o más de los genes post-PKS.
64. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 50 a 63, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, en la que se ha eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM* y, opcionalmente, más genes post-PKS.
65. El procedimiento según la reivindicación 64, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se ha eliminado o desactivado *gdmM* y, opcionalmente, más genes post-PKS.
66. El procedimiento según la reivindicación 64, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de herbimicina, en la que se ha eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM* y, opcionalmente, más genes post-PKS.
67. El procedimiento según la reivindicación 64, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, en la que se ha eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM*.
68. El procedimiento según la reivindicación 67, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de geldanamicina, en la que se ha eliminado o desactivado *gdmM*.
69. El procedimiento según la reivindicación 67, en el que, en la etapa (a), la cepa es una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de herbimicina, en la que se ha eliminado o desactivado el homólogo de *gdmM*.

70. Una cepa diseñada genéticamente basada en una cepa productora de ansamicina, en la que se han eliminado o desactivado *gdmM* o un homólogo del mismo, y uno o más de los genes biosintéticos de la unidad iniciadora y, opcionalmente, más genes post-PKS.
- 5 71. Una cepa según la reivindicación 70, en la que se han eliminado o desactivado todos los genes de la agrupación *ahba-B* de AM3602 de *S. hygrosopicus* u homólogo de otras cepas.
72. Una cepa según la reivindicación 70 o la reivindicación 71 que es una cepa productora de geldanamicina.
73. Una cepa según la reivindicación 70 o la reivindicación 71 que es una cepa productora de herbimicina.
74. Una cepa según la reivindicación 72, en la que *gdmO* está eliminado o desactivado.
75. Una cepa según la reivindicación 73, en la que *hdmO* está eliminado o desactivado.
- 10 76. Una cepa diseñada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 70 a 75, en la que la cepa productora de ansamicina es un estreptomiceto.
77. Una cepa diseñada genéticamente según la reivindicación 76, en la que la cepa es una cepa productora de geldanamicina que es NRRL3602 de *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *geldanus* o DSM4137 de *Streptomyces* sp. o DSM40699 de *Streptomyces violaceusniger*.
- 15 78. Uso de una cepa diseñada genéticamente según una cualquiera de las reivindicaciones 70 a 77 en la preparación de un análogo de ansamicina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
79. Uso de una cepa diseñada genéticamente según la reivindicación 78, en el que el análogo de ansamicina es un análogo de 18,21-didesoxi-ansamicina.

Figura 1

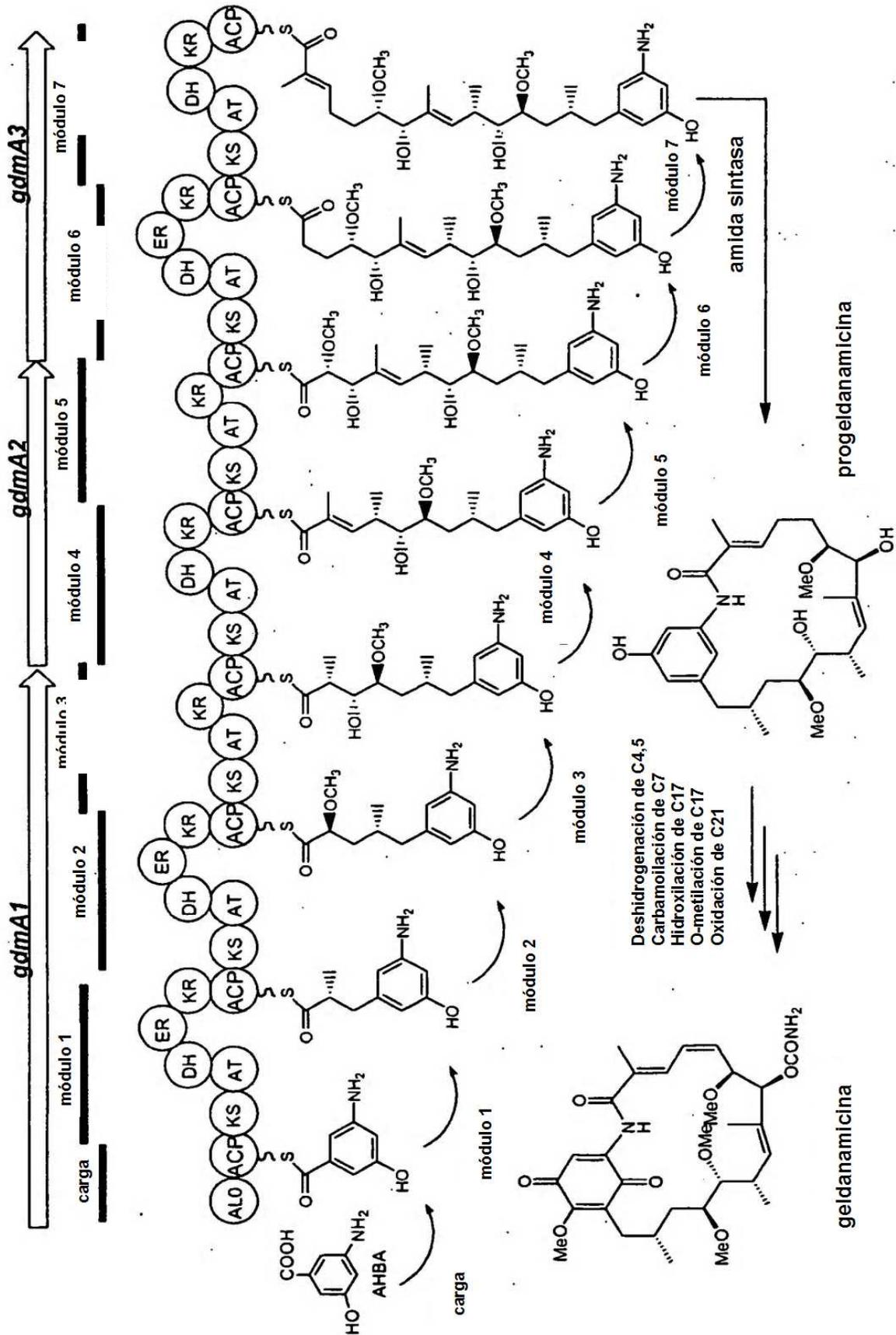


Figura 2

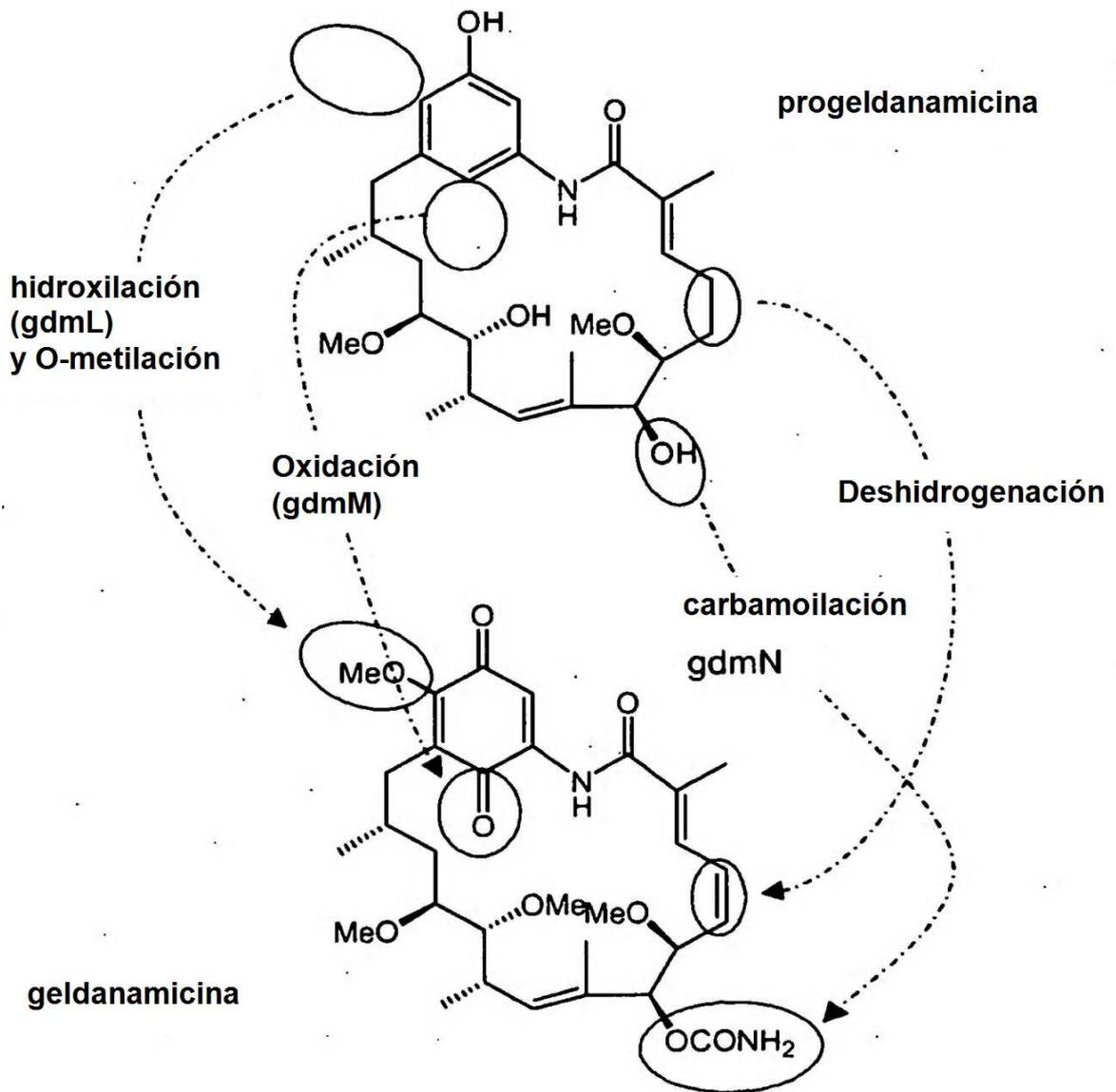


Figura 3

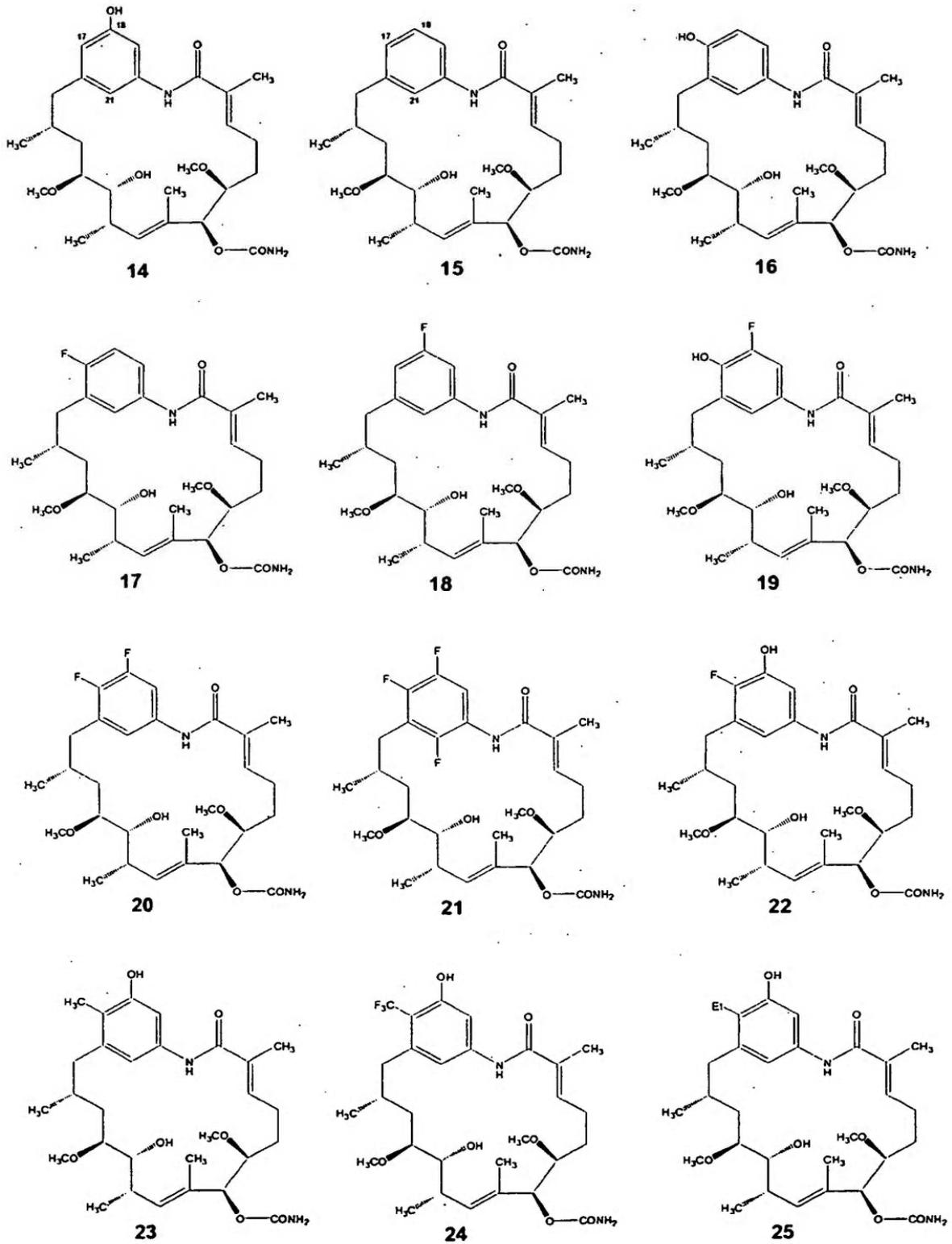


Figura 4

