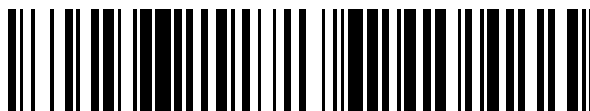


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 753**

51 Int. Cl.:

C07D 493/04 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2003** **E 10181230 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013** **EP 2287168**

54 Título: **Procedimientos para la preparación, el aislamiento y la purificación de epotilona B y estructuras cristalinas de rayos X de epotilona B**

30 Prioridad:

23.09.2002 US 412994

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.06.2013

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:

DAVIS, BRIAN, L.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 405 753 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

Procedimientos para la preparación, el aislamiento y la purificación de epotilona B y estructuras cristalinas de rayos X de epotilona B

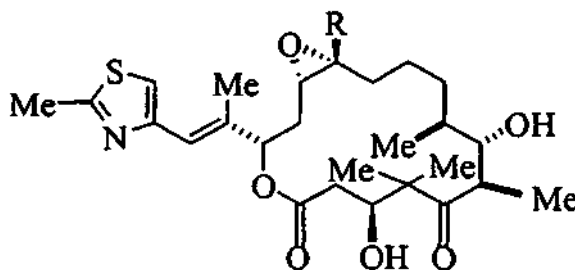
Campo de la invención

- 5 En la presente memoria se describen procedimientos mejorados para la producción, el aislamiento y la purificación de la epotilona B. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, un procedimiento de fermentación para la producción de epotilona B, el aislamiento a través de la adsorción en una resina y la posterior purificación.

Antecedentes de la invención

- 10 Las epotilonas son una clase relativamente nueva de compuestos macrólidos que se obtuvieron originalmente por fermentación de mixobacterias (*Sorangium cellulosum*). Estos compuestos se investigaron inicialmente como agentes protectores de las plantas, debido a sus propiedades antifúngicas. Las epotilonas adquirieron posteriormente interés debido a su actividad citotóxica en células animales y se caracterizaron posteriormente como agentes de polimerización de la tubulina. Ahora se sabe que las epotilonas ejercen efectos estabilizadores de microtúbulos similares a paclitaxel (TAXOL[®]) y la actividad citotóxica contra células que proliferan rápidamente, tales como células tumorales u otra enfermedad celular hiperproliferativa. El uso de epotilonas como agentes quimioterapéuticos se describe en Bollag et al., Cancer Research 55, 2325, 1995.

Las epotilonas A y B (epo A o epo B, respectivamente) tienen las estructuras



- 20 Epotilona A R=H
Epotilona B R=Me

- Un esquema para la obtención de epotilonas fue revelado por Höfle y col. en el documento WO 93/10121. Höfle cultivó una cepa de *Sorangium cellulosum* en un medio que contenía fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y sales minerales. Durante el cultivo de la cepa se añadió una resina adsorbente. Las epotilonas se eluyeron con el disolvente de la resina adsorbente. Las diferentes epotilonas se separaron por cromatografía de fase inversa y cristalizaron. Sin embargo, Höfle y col. reconocieron que este procedimiento producía sólo una cantidad mínima de epotilona B y también que la relación entre epotilona B y epotilona A en la fermentación fue baja. Esta baja proporción de epotilona B en relación con epotilona A hace que la recuperación de la epotilona B pura sea difícil. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de procedimientos mejorados de fermentación para producir epotilona B en preferencia a epotilona A y procedimientos mejorados de aislamiento y purificación de la epotilona B

Sumario de la invención

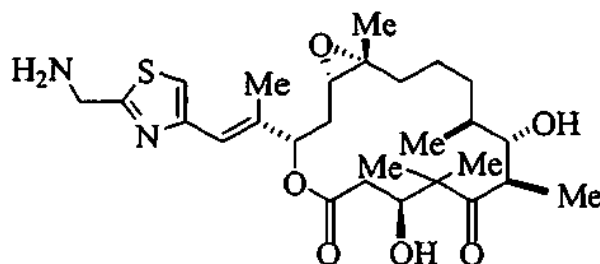
La presente invención se refiere a nuevas cepas de *Sorangium cellulosum* obtenidas por mutagénesis para la producción de epotilonas.

- También se divulgan procedimientos para mejorar la relación entre la epotilona B y A producida por la nueva cepa de *Sorangium cellulosum* proporcionando un aditivo para la fermentación. En una realización preferida, el aditivo es propionato, ácido propiónico con ajuste apropiado del pH, u otro precursor de propionato.

También se divulga en la presente invención un procedimiento de extracción mejorado para el aislamiento de la epotilona B del medio de fermentación usando una resina. También se divulgan procedimientos para el lavado de resina rica en epotilona para reducir los niveles de impureza y mejorar el procesamiento en sentido descendente.

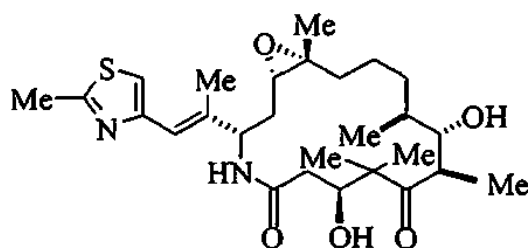
- 40 También se divulga en la presente invención un procedimiento mejorado para la purificación de epotilona B. En una realización, la purificación se consigue usando cristalización. En otra realización, la purificación se consigue por procedimientos cromatográficos que incluyen cromatografía de fase normal o cromatografía de fase inversa. En otra realización más, la purificación se consigue mediante una combinación de cristalización y purificación de las muestras por cromatografía, incluyendo la cromatografía normal y en fase inversa. En una realización adicional, el extracto de resina se procesa por cristalización solamente.

Le epotilona B ("epo B") es útil como un intermedio en la preparación del derivado 1 ("D1"), (como se describe en la patente US-6.262,094), donde el 2 metilo en el anillo tiazol se sustituye con una amina:



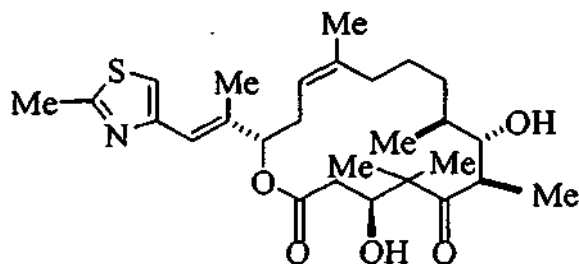
Derivado 1

- 5 La epotilona B también es útil en la preparación del derivado 2 ("D2") (tal conversión de la lactona de la epotilona B a la lactama de derivado 2 se describe por Borzilleri y col., J. Amer. Chem. Soc. 122, 8890, 2000, y en el documento WO 99/02514):



Derivado 2

- 10 Además, la epotilona B ("epo B") es útil para la preparación del derivado 3 (epotilona D, "D3") (como se describe en la patente US-6.320.045):



Derivado 3

- 15 Además, se divulgan en la invención las formas cristalinas de epotilona B producidas usando los procedimientos y materiales descritos en la presente memoria.

Se ha de entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplares.

Breve descripción de los dibujos

Las ventajas, la naturaleza y diversas características de la invención pueden aparecer más completas con la consideración de los dibujos adjuntos. En los dibujos:

- 20 La figura 1 muestra la estructura molecular en la celda unidad monoclinica de la forma epoB-EA β , con dos moléculas de epotilona B y dos moléculas de acetato de etilo en el canal adicional de la celda unidad monoclinica.
- La Figura 2 muestra la estructura molecular en la celda unidad monoclinica de la forma epoB-ANB, con dos moléculas de epotilona B y dos moléculas de acetonitrilo en el canal de la célula huésped de la celda unidad monoclinica.
- 25 La Figura 3 muestra la estructura molecular en la celda unidad monoclinica de la forma epoB-lp β , con dos moléculas de epotilona B y dos moléculas de isopropanol en el canal de la célula huésped de la celda unidad

monoclónica.

La Figura 4 muestra la estructura molecular en la celda unidad monoclónica de la forma epoB-To β , con dos moléculas de epotilona B y dos moléculas de tolueno en el canal huésped de la unidad monoclónica.

La Figura 5 muestra los patrones de PXRD observados (parte superior) y simulados (parte inferior) del solvato acetato de etilo (forma cristalina epoB-EA β) de la epotilona B. En la Figura 5, el patrón simulado se calculó a partir de los parámetros atómicos refinados de la estructura cristalina monoclónica a -33 °C y el patrón observado se midió a 23 °C.

La figura 6 muestra los patrones de PXRD observados (parte superior) y simulados (parte inferior) del solvato tolueno (forma cristalina epoB-TO β) de la epotilona B. En la Figura 6, el patrón simulado se calculó a partir de los parámetros atómicos en la estructura cristalina monoclónica a -33 °C y el patrón observado se midió a 23 °C.

La figura 7 muestra los patrones de PXRD observados (parte superior) y simulados (parte inferior) del solvato acetonitrilo (forma cristalina EPOB-AN β) de la epotilona B. En la figura 7, el patrón simulado se calculó a partir de los parámetros refinados atómicas en la estructura cristalina monoclónica a -40 °C y el patrón observado se midió a 23 °C.

La figura 8 muestra los patrones de PXRD observados (parte superior) y simulados (parte inferior) del solvato alcohol isopropílico (forma cristalina epoB-IP β) de la epotilona B. En la figura 8, el patrón simulado se calculó a partir de los parámetros atómicos refinados en la estructura cristalina monoclónica a -3 °C, y el patrón observado se midió a 23 °C.

La Figura 9 muestra un patrón de PXRD observado para un solvato de grado primario que contiene tolueno de la grado de la epotilona B producido según el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, Etapa A.

La Figura 10 muestra el análisis térmico (DSC y TGA) para el solvato de grado primario que contiene tolueno de la Figura 9.

La Figura 11 muestra un patrón de PXRD observado para un solvato recristalizado que contiene tolueno de la epotilona B, producido según el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, Etapa B.

La Figura 12 muestra el análisis térmico (DSC y TGA) para el solvato recristalizado que contiene tolueno de la Figura 11.

La Figura 13 muestra un patrón de PXRD observado para el solvato que contiene acetato de etilo de la epotilona B, producido según el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, Etapa C.

La Figura 14 muestra el análisis térmico (DSC y TGA) para el solvato que contiene acetato de etilo de la Figura 13.

La Figura 15 muestra un patrón de PXRD observado (parte superior) del solvato que contiene tolueno preparado según el procedimiento descrito en el Ejemplo 7C, junto con un patrón de PXRD simulado (inferior) del solvato tolueno de la epotilona B a temperatura ambiente.

La Figura 16 muestra el análisis térmico (DSC y TGA) del solvato que contiene tolueno de la Figura 15.

Se ha de entender que estos dibujos son para fines de ilustración de los conceptos de la invención y no son de naturaleza limitativa. En cada una de las figuras 1 a 4, todos los átomos de hidrógeno del metilo y del metileno de la epotilona se han omitido para mayor claridad. En las Figs. 1-4, los enlaces de hidrógeno intermoleculares se muestran en las partes derecha inferior e izquierda superior de los diagramas como barras discontinuas y las distancias entre los enlaces de H (Angstroms) designan el oxígeno intermolecular - Distancias de oxígeno

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe cepas mutantes novedosas de *Sorangium cellulosum* que, en conjunto o por separado, producen fermentaciones con mayores concentraciones de epotilona B, principalmente por reducción de la cantidad relativa de epotilona A producida durante la fermentación. Las células de *Sorangium cellulosum* o de otros microorganismos adecuados se expande, por ejemplo, mediante uno o más cultivos en la etapa de crecimiento inicial y se usan para proporcionar inóculo para las fermentaciones productoras de epotilona. Durante las primeras horas de fermentación, por ejemplo, alrededor de las 24-72 horas, se produce el crecimiento de células, ya que las células usan los nutrientes del medio. A partir de entonces, se añaden nutrientes, tales como vitaminas, minerales, hidratos de carbono y aminoácidos (u otras fuentes de carbono o nitrógeno, tales como precursores de aminoácidos) al medio en una cantidad favorable para la producción de epotilonas. En una realización, los nutrientes, tales como vitaminas, minerales, carbohidratos y aminoácidos se añaden en una cantidad que mantiene la tasa de producción máxima de epotilona A o epotilona B durante la fermentación. En una realización, la tasa máxima de producción de epotilona A o epotilona B es una tasa de producción en la que se produce una mayor cantidad de epotilona A o epotilona B en comparación con la producida sin la adición de aditivos o nutrientes, o también tiene como resultado una tasa de producción mayor que la que se produciría si los aditivos o nutrientes se añadiesen en una cantidad que es inferior a la óptima. Durante la fermentación, el ácido propiónico, un precursor del mismo, o una sal del mismo, se añade en una cantidad eficaz para aumentar la proporción entre epotilona B y epotilona A (la "relación de producto").

La presente invención se refiere a nuevas cepas de *Sorangium cellulosum* que son útiles en la producción de las epotilonas. Estas nuevas cepas, en particular la cepa SC16408, se han obtenido por mutagénesis seguido de selección aleatoria.

Sarangium cellulosum fue aislado de una muestra de suelo recogida de las orillas del río Zambeze en Sudáfrica en 1985. El organismo fue descrito por primera vez para la producción de las epotilonas por Höfle y col. (citado anteriormente). La cepa usada por Höfle y col. se designó So ce90 y está depositada en la Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen (Colección Alemana de Microorganismos, DSM) con el N° de depósito 6773. La cepa So ce90 se sometió a mutagénesis UV seguido por selección al azar para generar la cepa So ce90B2. La cepa So ce90B2 (también designada SC16224) produjo títulos de epotilona B en matraces agitados (que contienen por ejemplo el 1,8 % p/v de resina por matraz) de aproximadamente 50 mg/l o 2,8 mg/g de resina (que puede, por ejemplo, variar de 3,5 o 4,5 mg/g) y una relación epotilona B/A de aproximadamente 0,6.

En la presente invención la cepa So ce90B2 o un derivado de la misma se sometió a mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG), seguido por la selección al azar para producir cepas SC16408 (que están depositadas como ATCC N° PTA-3880) y SC16449 (depositada como ATCC N° PTA-3881). Estas dos últimas cepas han sido depositadas en la American Type Culture Collection como depósitos de patentes de conformidad con el Tratado de Budapest. Los detalles del procedimiento de selección se exponen en los ejemplos.

La presente invención proporciona, en una realización, cepas de *Sorangium cellulosum* que producen (por ejemplo, en las condiciones de producción definidas a continuación) al menos aproximadamente 100 mg de epotilona B por litro de volumen de caldo. En otra realización, la invención proporciona cepas que producen, en las condiciones de producción de epotilona B comparativas, al menos 80 mg de epotilona B por litro de volumen de caldo y una proporción entre epotilona B y epotilona A de al menos 1. La presente invención proporciona en una realización cepas que producen 5 mg de epotilona B/g de resina de epotilona B o 5 mg/g de resina en una proporción de epotilona B/A de al menos 1,0. En otra realización, la proporción epotilona B/A es al menos 1,5. En otra realización más, la proporción epotilona B/A es de 1,5 a 4,0.

En la presente memoria se describen nuevos procedimientos para mejorar la proporción entre epotilona B y A producida por *Sorangium cellulosum* mediante la alimentación de un aditivo a la fermentación. En realizaciones preferidas, el aditivo comprende propionato, añadido después de que las células hayan crecido durante 96 horas, pero preferiblemente a aproximadamente 24-48 horas. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivaron durante aproximadamente 34 horas antes de añadir propionato. Los primeros estudios de GBF investigaron, entre otros factores que influyen en la fermentación, el efecto de la adición de propionato de una sola vez al medio a un nivel del 0,1 % para la mejora incremental de la proporción epotilona B/epotilona A (B/A). Los inventores han descubierto, sorprendentemente y es una de las características de la presente invención, que los títulos de las epotilonas, la epotilona B, en particular, y la proporción B/A producida en matraces agitados, fermentadores de 14 l y fermentadores de producción, había mejorado notablemente con la alimentación de propionato o propionato de sodio. La alimentación de propionato o de propionato de sodio produce una mejora significativa de los títulos de epotilona B. Por ejemplo, la producción de epotilona B en matraz fue mejorada por la suplementación con propionato de sodio dentro de un intervalo preferido, tal como se comprueba en el cultivo de 0,05 a 0,80 mg/ml (0,005-0,08 %) periódicamente (por ejemplo, por día) una vez iniciada la alimentación, más preferiblemente en un intervalo del 0,005-0,04 %. En una realización, la cantidad objetivo de propionato en el cultivo es del 0,02 % o menos. Además, también se encontró que otros compuestos relacionados con propionato incluyendo, pero sin limitarse al éster metílico del ácido propiónico y al éster etílico del ácido propiónico, mejoraban la producción de epotilona B y, en consecuencia, la proporción B/A.

En una realización, particularmente útil para fermentaciones en un matraz, se añade una alimentación adicional que contiene una mezcla de fosfato monobásico y dibásico, seleccionándose la proporción para lograr un pH adecuado. Esta alimentación se puede incorporar en una alimentación de propionato o se añaden separadamente.

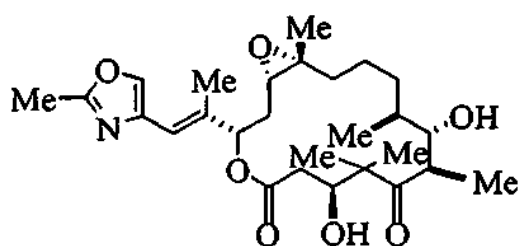
En la presente memoria, se describe un procedimiento de purificación a gran escala de epotilona que usa con éxito la adición de resina. Se vio que la inclusión de resina era útil en el aislamiento y la purificación de epotilonas y también para mejorar drásticamente los títulos de epotilona. En una realización preferida, la resina es una resina polimérica de estireno/divinilbenceno, tal como una resina XAD, preferiblemente XAD-16 o el equivalente (disponible como Amberlite XAD-16 de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO o Rohm and Haas Co., Filadelfia, PA). Otras resinas Amberlite con superficies hidrófobas, tales como a base de estireno XAD-4, XAD-1180 o XAD-1600 (Rohm and Haas Co.) también pueden ser útiles en la invención, así como resinas tales como las resinas a base de estireno XD-207, HP20, HP21, SP825, SP850, SP700 o SP207 (que son más hidrófobas debido a la adición de grupos de bromo) (estas resinas son de Mitsubishi, Tokio, Japón o Mitsubishi Chemical America, Inc., White Plains, NY). La resina se puede incorporar en el medio dentro de un amplio intervalo, tal como del 0,2 % p/v al 5,0 % p/v y preferiblemente del 1,5 % p/v al 4,0 % p/v.

La resina que contiene epotilonas de la fermentación se lava opcionalmente con agua y o bien acetonitrilo acuoso al 20-30 % o metanol acuoso para eliminar las impurezas polares, o con una solución que contiene detergente, preferiblemente un detergente iónico tal como un detergente basado en alquil sulfato y una cantidad de una amina (añadida a la solución en forma de base). Las cantidades se seleccionan para mejorar la calidad del extracto de epotilona obtenido después de la resina. Un lavado acuoso preferido usa dodecilsulfato sódico al 0,5 % p/v y amoníaco al 0,5 % p/v. En esta última realización, antes de la extracción con disolvente, la resina se lava preferiblemente una o más veces con agua.

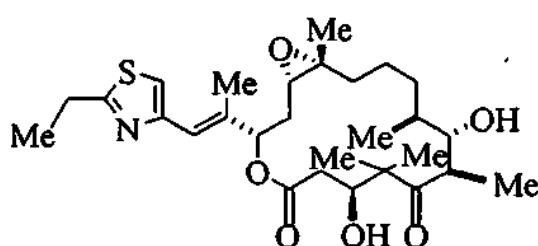
La resina que contiene epotilonas de la fermentación preferiblemente se extrae con un disolvente que es inmisible con (separados de la fase de) una fase acuosa, tal como acetato de etilo o metil-t-butil éter (MTBE), para eliminar las epotilonas adsorbidas en la resina. Disolventes adicionales que pueden ser útiles para la extracción de epotilona B

incluyen n-butanol, acetato de isopropilo, acetato de n-propilo, acetato de n-butilo y acetato de t-butilo. El extracto rico en disolvente se concentra preferiblemente y la epotilona B se cristaliza en el concentrado. En una realización, el extracto rico en disolvente se lava con agua y el disolvente rico lavado con agua se concentra y opcionalmente se filtra por pulido. Cuando el disolvente es adecuado, como es el acetato de etilo, la epotilona B se cristaliza mediante la realización de un intercambio de disolvente por destilación en un anti-disolvente. En otras palabras, se añade un segundo disolvente con un punto de ebullición relativamente alto en el que la epotilona B es esencialmente insoluble en el disolvente rico y el disolvente rico se separa por destilación en un grado suficiente para permitir la cristalización. Se puede usar vacío para conducir o facilitar la destilación. En una realización, el disolvente se concentra y se añade una cantidad adecuada de anti-disolvente. Anti-disolventes útiles incluyen tolueno, hexanos y heptanos. La suspensión resultante se puede calentar y enfriar hasta una temperatura ajustada seleccionada para mejorar la calidad de los cristales resultantes. Se pueden usar oscilaciones de la temperatura para aumentar la pureza de cristal, minimizar las partículas finas y producir una suspensión más rápida de filtrar. Para algunos otros disolventes, tales como MTBE, la concentración por destilación del disolvente rico produce un medio eficaz de cristalización eficaz al enfriarse (sin el uso de un anti-disolvente). Los cristales resultantes se filtran preferiblemente para dar un grado primario de epotilona B.

Durante la extracción y cristalización inicial, la epotilona B se separa de la mayoría de las impurezas presentes en el extracto inicial, especialmente la epotilona A. La epotilona de grado primario B contiene normalmente epotilona A como una impureza principal. Generalmente también están presentes otras dos impurezas estructuralmente similares derivadas de la fermentación, concretamente el siguiente análogo de oxazol y el análogo de etil tiazol:



Oxazol



Etil tiazol

Los procedimientos de purificación posteriormente aplicados (incluyendo los pasos de recrystalización y cromatografía) descritos en la presente memoria para la epotilona B implican, entre otras cosas, la eliminación de estos dos compuestos a un nivel que ya no se considera significativo.

La epotilona B de grado primario (es decir, epo B en forma cristalina que contiene tolueno, grado primario), preferentemente obtenida como se describe arriba, puede ser a continuación recrystalizada por calentamiento en acetato de etilo seguido de la adición de tolueno con calentamiento continuado. La mezcla se enfría a continuación, la suspensión cristalina resultante se filtra y la torta se lava con tolueno para dar una vez epotilona B recrystalizada (es decir, epo B en forma cristalina que contiene tolueno, recrystalizada). Alternativamente, la epotilona B de grado primario se puede procesar a través de una etapa de cromatografía de fase inversa de alto rendimiento preparativa (por ej., en RP/C-1.8 en la forma de una columna) como se expone en los ejemplos. Opcionalmente, antes de cargar la muestra de epotilona en la columna, se añade un volumen anterior de un disolvente orgánico adecuado, o una mezcla de disolventes orgánicos, para reducir la precipitación de la epotilona. En una realización, el disolvente orgánico es uno tal como dimetilsulfóxido (DMSO). Opcionalmente, se añade un volumen de salida de un disolvente orgánico adecuado o una mezcla de disolventes orgánicos para reducir la precipitación de la epotilona. Las epotilonas se eluyen a continuación con un disolvente orgánico adecuado, una mezcla de disolventes orgánicos o una solución acuosa de un disolvente orgánico. En una realización, las epotilonas se eluyen con una mezcla de acetonitrilo y agua. El perfil de elución usando estos disolventes puede, por ejemplo, ser lineal o en gradiente y se elige para obtener bajos niveles de impurezas. Se combinan las fracciones que contienen epotilona B de pureza deseada, se concentran y se extraen con un disolvente que incluye, pero no se limita a, acetato de etilo. Los extractos ricos en disolventes se concentran a continuación y cristalizan, por ejemplo, mediante la adición de un disolvente de polaridad baja, tal como n-heptano o heptanos y opcionalmente se enfrían. La suspensión se filtra, se lava con disolvente/anti-disolvente (en una proporción y cantidad seleccionada para no disolver cantidades significativas de epotilona B), tal como acetato de etilo/n-heptano en una proporción de 2:1. Los cristales lavados se secan para producir epotilona B de alta calidad.

Pueden usarse otros procedimientos de purificación, tales como cromatografía en fases normales tales como sílice o fases normales basadas en sílice. Por ejemplo, se puede usar la cromatografía de alto rendimiento en fase normal. Las muestras se pueden cargar en la columna en un disolvente de relativamente baja polaridad, tal como cloruro de metileno y las epotilonas se eluyen con un disolvente de mayor polaridad, tal como una mezcla de acetato de etilo y heptano. El perfil de elución usando estos disolventes puede, por ejemplo, ser lineal o en gradiente y se elige para obtener bajos niveles de impurezas. Las fracciones deseadas se combinan, se concentran y cristalizan, por ejemplo en acetato de etilo mediante la adición de un disolvente de polaridad baja, tal como n-heptano, heptanos o tolueno. La suspensión se filtra, se lava con disolvente/anti-disolvente (en una proporción y cantidad seleccionada para no

disolver cantidades significativas de epotilona B), tales como acetato de etilo/n-heptano en una proporción de 2:1 o acetato de etilo/tolueno. Los cristales lavados se secan para producir epotilona B de alta calidad.

- 5 En ciertos casos, cuando no es necesaria una eliminación intensiva del etil tiazol o de los análogos de oxazol, como en la síntesis de D1, la epotilona B se puede purificar por cristalización solo. El material de epotilona B sólido se disuelve, por ejemplo, en acetato de etilo caliente y se cristaliza (o recristaliza) por enfriamiento a temperatura ambiente o más fría, seguido de filtración y secado (por ejemplo, al vacío). Las cristalizaciones se pueden repetir para obtener la pureza deseada, tal como de 2 a 3 veces

El medio de crecimiento para el cultivo del microorganismo productor de epotilona puede ser, por ejemplo, de la siguiente forma:

Componente	Preferido (g/l)	Más preferido (g/l)	Aún más preferido (g/l)
Leche descremada en polvo	0,5-12	1-8	2-6
Harina tostada Nutrisoy ¹	0,5-12	1-8	2-6
Tastone - 154 ¹	0,5-12	1-6	1-4
Maltrin-M040 ¹	4-18	6-14	8-12
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2-2,4	0,4-1,6	0,8-1,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2-2,4	0,4-1,6	0,8-1,2
EDTA, FeIII, sal Na	0,002- 0,02	0,004-0,016	0,006-0,014
HEPES	6-20	8-16	10-14
Glicerol	0,5-12	1-8	2-6
¹ Se han usado otras leches descremadas, harinas de soja, extractos de levadura y almidones indistintamente con resultados comparables,			

- 10 El medio de producción para el cultivo del microorganismo productor de epotilona y para la producción de epotilonas, especialmente en matraces agitados, puede ser, por ejemplo formulado como antes con la siguiente diferencia con respecto al glicerol y la adición de resina:

Componente	Preferido (g/l)	Más preferido (g/l)	Aún más preferido (g/l)
Glicerol	2-20	4-16	6-14
Resina	10-40	12-35	15-30

Una solución alimenticia de nutrientes útil, especialmente para su uso en matraces agitados, comprende:

Componente	Preferido (%)
Propionato sódico	2-5
Maltrin-M040	8-12
Tastone-154	2-5

- 15 Dicha solución alimenticia de nutrientes puede contener además una mezcla de fosfato de sodio dibásico y fosfato monosódico, como sigue

Componente	Preferido (%)
Fosfato disódico	1,0-2,0
Fosfato monosódico	0,3-0,7

La relación entre fosfato disódico y fosfato monosódico se selecciona para minimizar la desviación del pH del cultivo de del pH deseado después de la adición de la solución alimenticia.

- 20 Para uso en fermentadores, los componentes nutrientes descritos anteriormente, con la excepción de HEPES, que preferiblemente se elimina, se pueden usar preferiblemente con antiespumante (por ejemplo, de Dow Corning, AF Emulsión, Calidad alimenticia) como sigue:

Componente	Preferido (g/l)	Más preferido (g/l)	Aún más preferido (g/l)
Antiespumante	0,5-5	1-4,5	1,5-4

Se puede añadir sosa cáustica (solución de hidróxido de sodio o potasio) al medio de fermentación según sea necesario para mantener un intervalo de pH útil. La resina se puede añadir como sigue:

Componente	Preferido (g/l)	Más preferido (g/l)	Aún más preferido (g/l)
Resina	10-50	12-45	15-40

- 5 En la fermentación de producción, el propionato y los nutrientes se añaden preferiblemente por separado, según sea necesario. El propionato puede, por ejemplo, comprender de 80 a 150 g/l de propionato sódico, añadiéndose la cantidad más preferiblemente para mantener (por ejemplo, como se determina por HPLC) niveles de propionato de 0,05 a 0,20 mg/ml. La adición de propionato se puede iniciar 20-40 horas después de añadir el cultivo de siembra en el fermentador. Los nutrientes se complementan, por ejemplo, con un producto base estéril de la siguiente manera:

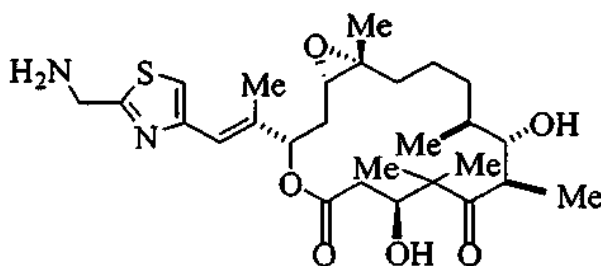
Componente	Preferido (%)
Tastone-154	15 - 25
Maltrin-M040	55 - 75
Antiespumante	0,5 - 1,5

- 10 Para las fermentaciones a más largo plazo, los nutrientes adicionales se añaden preferiblemente, por ejemplo, a partir del siguiente producto base estéril, que se añade en un mayor volumen en comparación con el producto base anterior:

Componente	Preferido (%)
Leche en polvo descremada	40 - 60
Maltrin-M040	14 - 180
Glicerol	60 - 90
Antiespumante	0,5 - 1,5

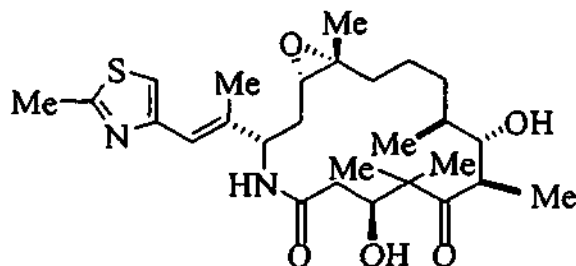
Estos nutrientes de los dos soluciones nutritivas anteriores se pueden seleccionar para evitar iniciar una fase de crecimiento.

- 15 En la presente memoria se describen también procedimientos para la producción de epitolona B, en los que la epitolona B ("epo B") se convierte en el derivado 1 ("D1") como se describe en la patente US- 6.262.094), que tiene la siguiente fórmula:



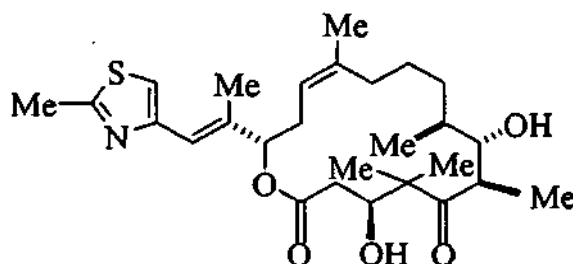
Derivado 1

- 20 En la presente memoria se describen también procedimientos para la producción de epitolona B en los que la epitolona B se convierte en el derivado 2 ("D2") (descrito por Borzilleri y col., J. Amer. Chem. Soc. 122, 8890, 2000 y en el documento WO 99/02514), que tienen la fórmula:



Derivado 2

En la presente memoria se describen además procedimientos para la producción de epotilona B en los que la epotilona B ("epo B") se convierte en el derivado 3 (epotilona D, "D3") (como se describe en el patente US-6.320.045 divulgada en la presente memoria), que tiene la siguiente fórmula:



Derivado 3

Formas cristalinas de la epotilona B

Estas formas cristalográficamente isoestructurales tienen una estructura monoclinica de clatrato con un grupo espacial $P2_1$ que contiene canales de disolvente lipófilos que se extienden a lo largo del eje B por todos los cristales (1 canal/celda unidad). Cada canal puede contener hasta dos moléculas de disolvente tal como tolueno, acetonitrilo, acetato de etilo, alcohol isopropílico o MTBE (que idealmente da lugar a solvatos 1:1 de epotilona B). La cristalización en mezclas de disolvente tolueno/acetato de etilo (por ejemplo, mezcla 1:1) se traduce en la incorporación preferente de tolueno en los canales de clatrato (es decir, se obtiene la forma epoB-TO β , no la epoB-EA β). Ambos donantes de enlaces de hidrógeno de la epotilona (hidroxilos) están involucrados en enlaces de hidrógeno interepotilona y no están disponibles para unirse a, y limitan, los disolventes adicionales.

Las formas epoB-TO β , epoB-AN β , epoB-EA β y epoB-IP β exhiben los datos de la celda unidad presentados en la Tabla I. Las condiciones de cristalización para la obtención de estas formas de cristales que contienen tolueno, acetonitrilo, acetato de etilo e isopropanol se presentan a continuación en los ejemplos. Los patrones de PXRD para los cristales preparados usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 7 se muestran en las figuras 9, 11 y 13, también como se describe más adelante

Los parámetros ilustrativos específicos tabulados de estas formas cristalina son los siguientes y se presentan en la Tabla 1:

Forma	
epoB-TO β	Cristalizó en tolueno como se describe en el Ejemplo 8A.
epoB-AN β	Cristalizó en tolueno como se describe en el Ejemplo 8B.
epoB-EA β	Cristalizó en acetato de etilo (EtOAc) como se describe en el Ejemplo 8C.
epoB-IP β	Cristalizó en alcohol isopropílico (AIP) como se describe en el Ejemplo 8D.

Las coordenadas atómicas fraccionarias para epoB-AN β , epoB-EA β , epoB-IP β y epoB-TO β se muestran en las Tablas 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Los patrones de PXRD mostrados en las Figuras 9, 11 y 13 se caracterizan por los datos enumerados en las Tablas 6, 7 y 8, a continuación

TABLA 1

Datos de la celda unidad												
Forma	T (°C)	a(Å)	b(Å)	c(Å)	B	V	Z	V/Z	sg	d (calc) ₁	R	Sitios ideales del disolvente
Epo B-TOß	-33	11,853 (1)	10,613 (2)	14,328 (2)	113,04 (1)	1659 (1)	2	829	P2 ₁	1,201	0,09	1 tolueno por epo B
Epo B-ANß	-40	11,961 (1)	10,543 (1)	13,601 (2)	111,89 (1)	1592 (1)	2	796	P2 ₁	1,145	0,07	1 acetonitrilo por epo B
Epo B-EAß -33	-33	11,939 (1)	10,587 (1)	13,882 (1)	111,87 (1)	1628 (1)	2	814	P2 ₁	1,215	0,07	1 EtOAc por epo B
EpoB-Ipß	-3	11,928 (2)	10,610 (1)	13,870 (2)	111,92 (1)	1628 (1)	2	814	P2 ₁	1,158	0,09	1 AIP por epo B

¹Densidades ideales calculadas, asumiendo una ocupación del disolvente 1:1.

TABLA 2

Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato acetonitrilo, Forma EpoB-ANß (se han omitido la mayoría de los átomos de hidrógeno)

5

Átomo	X	Y	Z
C1	0,4422	0,2380	0,3076
C2	0,5619	0,2882	0,3165
C3	0,6422	0,1833	0,3013
C4	0,7565	0,2263	0,2807
C5	0,8531	0,2847	0,3800
C6	0,8409	0,4180	0,4193
C7	0,8968	0,4218	0,5419
C8	0,8360	0,3345	0,5975
C9	0,7205	0,3935	0,6018
C10	0,6345	0,2947	0,6184
C11	0,5287	0,3609	0,6355
C12	0,4328	0,2722	0,6397
C13	0,3118	0,2674	0,5573
C14	0,2626	0,3435	0,4562
C15	0,2748	0,2789	0,3613
O16	0,3977	0,3084	0,3684
C16	0,7197	0,3194	0,1878
C17	0,8080	0,1051	0,2508

(continuación)

Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato acetonitrilo, Forma EpoB-AN β (se han omitido la mayoría de los átomos de hidrógeno)

Átomo	X	Y	Z	
C18	0,9083	0,5112	0,3717	
C19	0,9258	0,3048	0,7095	
C20	0,4763	0,1572	0,7109	
C21	0,1833	0,3270	0,2580	
C22	0,1927	0,4656	0,2359	
C23	0,1008	0,2458	0,1993	
C24	-0,0043	0,2676	0,1034	
C25	-0,0708	0,1728	0,0409	
C26	-0,1519	0,3799	-0,0163	
C27	-0,2252	0,4942	-0,0664	
S	-0,1936	0,2297	-0,0595	
N	-0,0507	0,3873	0,0719	
O1	0,3897	0,1501	0,2552	
O2	0,6748	0,1045	0,3926	
O5	0,9464	0,2278	0,4266	
O7	0,8893	0,5485	0,5778	
O12	0,3313	0,3359	0,6550	
H3	0,5936	0,1283	0,2313	
H6	0,7466	0,4426	0,3937	
H7	0,9913	0,3942	0,5683	
H8	0,8117	0,2471	0,5514	
H13	0,2618	0,1794	0,5410	
H15	0,2633	0,1778	0,3662	
H3O	0,6691	0,0154	0,3705	
H7O	0,9636	0,5994	0,5825	
N27	0,4609	0,5049	0,0188	(acetonitrilo)
C28	0,3963	0,4080	0,0038	(acetonitrilo)
C29	0,3379	0,2975	-0,0775	(acetonitrilo)

TABLA 3

Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato acetato de etilo, Forma EpoB-EA β (se han omitido la mayoría de los átomos de hidrógeno)

Átomo	X	Y	Z
C1	0,4400	0,2438	0,3107
C2	0,5605	0,2943	0,3190
C3	0,6416	0,1904	0,3056
C4	0,7559	0,2327	0,2857
C5	0,8532	0,2913	0,3822
C6	0,8410	0,4228	0,4212
C7	0,8957	0,4275	0,5404
C8	0,8319	0,3405	0,5928
C9	0,7164	0,4000	0,5966
C10	0,6298	0,3042	0,6134
C11	0,5231	0,3717	0,6266
C12	0,4266	0,2844	0,6321
C13	0,3066	0,2780	0,5503
C14	0,2581	0,3526	0,4526
C15	0,2706	0,2867	0,3589
O16	0,3940	0,3148	0,3668
C16	0,7203	0,3272	0,1940
C17	0,8079	0,1121	0,2559
C18	0,9092	0,5160	0,3757
C19	0,9227	0,3099	0,7056
C20	0,4667	0,1703	0,7040
C21	0,1800	0,3335	0,2576
C22	0,1887	0,4688	0,2331
C23	0,0962	0,2506	0,2011
C24	-0,0076	0,2687	0,1042
C25	-0,0762	0,1706	0,0472
C26	-0,1515	0,3743	-0,0242
C27	-0,2158	0,4821	-0,0821
S	-0,1923	0,2232	-0,0566
N	-0,0487	0,3847	0,0652
O1	0,3878	0,1559	0,2575
O3	0,6749	0,1137	0,3972
O6	0,9464	0,2337	0,4280

(continuación)

Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato acetato de etilo, Forma EpoB-EA β (se han omitido la mayoría de los átomos de hidrógeno)

Átomo	X	Y	Z	
O7	0,8889	0,5526	0,5755	
O12	0,3257	0,3484	0,6457	
H3	0,5927	0,1346	0,2372	
H6	0,7463	0,4478	0,3947	
H7	0,9884	0,3992	0,5620	
H8	0,8080	0,2533	0,5499	
H13	0,2573	0,1911	0,5357	
H15	0,2575	0,1863	0,3624	
H3O	0,6713	0,0150	0,3759	
H7O	0,9745	0,5994	0,5930	
O28	0,5242	0,5794	0,0077	(acetato de etilo)
O31	0,4179	0,4326	0,0063	(acetato de etilo)
C28	0,4731	0,5098	0,0256	(acetato de etilo)
C29	0,4265	0,4705	0,0892	(acetato de etilo)
C31	0,3610	0,3621	-0,0408	(acetato de etilo)
C30	0,2548	0,3272	-0,0460	(acetato de etilo)

TABLA 4**5 Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato alcohol isopropílico, Forma EpoB-IP β (se han omitido la mayoría de los átomos de hidrógeno)**

Átomo	X	Y	Z
C1	0,4418	0,2548	0,3104
C2	0,5609	0,3055	0,3186
C3	0,6429	0,2009	0,3049
C4	0,7565	0,2462	0,2851
C5	0,8541	0,3018	0,3837
C6	0,8410	0,4357	0,4229
C7	0,8977	0,4390	0,5415
C8	0,8345	0,3493	0,5940
C9	0,7184	0,4107	0,5972
C10	0,6325	0,3111	0,6156
C11	0,5261	0,3793	0,6303
C12	0,4292	0,2892	0,6329
C13	0,3087	0,2842	0,5528

(continuación)

Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato alcohol isopropílico, Forma EpoB-IP β (se han omitido la mayoría de los átomos de hidrógeno)

Átomo	X	Y	Z	
C14	0,2607	0,3630	0,4551	
C15	0,2736	0,2932	0,3613	
O16	0,3950	0,3241	0,3669	
C16	0,7179	0,3380	0,1935	
C17	0,8084	0,1250	0,2541	
C18	0,9098	0,5290	0,3774	
C19	0,9269	0,3222	0,7069	
C20	0,4742	0,1736	0,7031	
C21	0,1807	0,3387	0,2590	
C22	0,1879	0,4780	0,2352	
C23	0,1028	0,2530	0,2009	
C24	-0,0041	0,2724	0,1029	
C25	-0,0678	0,1712	0,0456	
C26	-0,1517	0,3781	-0,0198	
C27	-0,2289	0,4888	-0,0775	
S	-0,1896	0,2262	-0,0575	
N	-0,0526	0,3893	0,0653	
O1	0,3903	0,1657	0,2594	
O3	0,6763	0,1239	0,3954	
O5	0,9485	0,2459	0,4293	
O7	0,8898	0,5642	0,5781	
O12	0,3283	0,3539	0,6476	
H3	0,5946	0,1457	0,2365	
H6	0,7464	0,4597	0,3977	
H7	0,9915	0,4115	0,5668	
H8	0,8111	0,2625	0,5504	
H13	0,2582	0,1971	0,5380	
H15	0,2640	0,1927	0,3679	
H3O	0,6731	0,0260	0,3733	
H7O	0,9599	0,6223	0,5696	
O28	0,4344	0,2122	0,0495	(alcohol isopropílico)
C28	0,3601	0,2863	-0,0462	(alcohol isopropílico)
C30	0,4351	0,3798	-0,0762	(alcohol isopropílico)
C29	0,2460	0,3279	-0,0487	(alcohol isopropílico)

TABLA 5

Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato tolueno, Forma EpoB-TO β (se han omitido la mayoría de los átomos de hidrógeno)

Átomo	X	Y	Z
C1	0,4314	0,2211	0,3158
C2	0,5581	0,2739	0,3228
C3	0,6395	0,1704	0,3110
C4	0,7506	0,2081	0,2888
C5	0,8509	0,2746	0,3880
C6	0,8414	0,4043	0,4212
C7	0,8976	0,4053	0,5382
C8	0,8372	0,3234	0,5911
C9	0,7204	0,3812	0,5930
C10	0,6312	0,2790	0,6075
C11	0,5255	0,3494	0,6227
C12	0,4302	0,2588	0,6250
C13	0,3014	0,2537	0,5473
C14	0,2538	0,3361	0,4501
C15	0,2643	0,2640	0,3626
C16	0,3877	0,2964	0,3648
C17	0,7158	0,3123	0,2026
C18	0,8082	0,0907	0,2610
C19	0,9061	0,4961	0,3806
C20	0,9323	0,2951	0,6989
C21	0,4703	0,1447	0,6945
C22	0,1702	0,3170	0,2598
C23	0,1709	0,4486	0,2391
C24	0,0898	0,2230	0,2030
C25	-0,0145	0,2462	0,1060
C26	-0,0811	0,1430	0,0546
C27	-0,1432	0,3561	-0,0251
C28	-0,2089	0,4563	-0,0926
S	-0,1987	0,1985	-0,0555
N	-0,0507	0,3632	0,0580
O1	0,3838	0,1303	0,2676
O3	0,6742	0,0956	0,3983

(continuación)

Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato tolueno, Forma EpoB-TO β (se han omitido la mayoría de los átomos de hidrógeno)

Átomo	X	Y	Z
O5	0,9468	0,2169	0,4313
O7	0,8912	0,5329	0,5727
O12	0,3254	0,3255	0,6408
H3	0,5816	0,1062	0,2496
H6	0,7457	0,4264	0,3944
H7	0,9919	0,3719	0,5628
H8	0,8141	0,2297	0,5521
H13	0,2871	0,1529	0,5221
H15	0,2567	0,1589	0,3722
H3O	0,6633	-0,0002	0,3785
H7O	0,9663	0,5756	0,5776
C28	0,4258	0,4317	0,0030 (tolueno)
C29	0,3526	0,3996	0,0429 (tolueno)
C30	0,2586	0,3239	0,0126 (tolueno)
C31	0,2245	0,2386	-0,0713 (tolueno)
C32	0,2984	0,2800	-0,1182 (tolueno)
C33	0,3923	0,3496	-0,1016 (tolueno)
C34	0,5043	0,4979	-0,0119 (tolueno)

TABLA 6

Datos de PXRD para la epotilona B, solvato que contiene tolueno, producida usando el procedimiento del Ejemplo 7, Paso A y mostrado en la Figura 9

Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	espaciado reticular d (Å)	Intensidad relativa (%)	Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	espaciado reticular d (Å)	Intensidad relativa (%)
6,680	13,2212	48,5	20,720	4,2833	4,2
8,210	10,7604	2,1	21,320	4,1641	1,4
10,610	8,3312	2,2	21,890	4,0570	6,3
12,590	7,0251	4,3	24,200	3,6747	3,2
13,370	8,6169	25,8	24,500	3,6304	4,7
14,840	5,9646	1,9	24,800	3,5871	14,4
15,680	5,6469	0,9	26,150	3,4049	4,4
16,160	5,4802	2,3	26,870	3,3153	4,5
16,550	5,3520	2,9	28,370	3,1433	4,3
18,170	4,8783	5,0	29,930	2,9829	2,2
18,410	4,8152	10,6	30,890	2,8924	2,0
20,090	4,4162	100,0	31,400	2,8466	2,2

TABLA 7

Datos de PXRD para la epotilona B, solvato que contiene tolueno, producida usando el procedimiento del Ejemplo 7, Paso B y mostrado en la Figura 9

Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	espaciado reticular d (A)	Intensidad relativa (%)	Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	espaciado reticular d (A)	Intensidad relativa (%)
6,680	13,2212	62,1	20,720	4,2833	9,0
8,210	10,7604	3,4	21,320	4,1641	4,4
10,610	8,3312	6,9	21,890	4,0570	21,8
12,590	7,0251	8,1	24,200	3,6747	10,8
13,370	6,6169	26,9	24,500	3,6304	9,7
14,870	5,9526	5,9	24,800	3,5871	18,9
15,680	5,6469	3,7	26,150	3,4049	12,8
16,160	5,4802	4,5	26,900	3,3117	4,9
16,580	5,3424	9,1	28,340	3,1466	7,6
18,170	4,8783	20,3	29,960	2,9800	5,9
18,440	4,8075	28,2	30,950	2,8869	5,3
20,090	4,4162	100,0	31,400	2,8466	4,1

TABLA 8

Datos de PXRD para la epotilona B, solvato que contiene acetato de etilo, producida usando el procedimiento del Ejemplo 7, Paso C y mostrado en la Figura 13

Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	espaciado reticular d (A)	Intensidad relativa (%)	Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	espaciado reticular d (A)	Intensidad relativa (%)
6,800	12,9881	26,2	20,720	4,2833	100,0
6,950	12,7082	32,5	22,610	3,9294	25,5
8,450	10,4553	4,0	24,470	3,6347	8,9
10,850	8,1474	9,4	24,860	3,5786	13,5
11,690	7,5638	2,8	25,190	3,5325	7,8
13,070	6,7681	11,6	26,120	3,4088	5,7
13,850	6,3887	10,2	26,600	3,3483	5,9
14,990	5,9053	4,7	27,050	3,2936	3,5
16,040	5,5210	5,4	27,530	3,2373	5,2
16,850	5,2574	11,0	28,850	3,0921	6,7
18,200	4,8703	13,5	29,090	3,0671	6,7
18,770	4,7237	16,9	30,020	2,9742	4,0
19,130	4,6356	14,3	30,320	2,9454	4,6
20,480	4,3330	72,2	30,740	2,9062	5,6
20,600	4,3080	71,6	31,220	2,8626	6,5

Definiciones

Las siguientes expresiones tendrán, para los propósitos de esta solicitud, los respectivos significados presentados a continuación:

- 10 "Condiciones de producción comparativas de epotilona B". Para medir la producción relativa entre epotilona B y epotilona A o la producción neta de epotilona B entre cepas, son necesarias condiciones estándar. Las "condiciones de producción comparativas de epotilona B" se presentan a continuación. Obsérvese que las condiciones estándar pueden estar apropiadamente escaladas (por ej., matraces de producción de 125 ml según el Ejemplo 2), como se describe en los Ejemplos:

1) Etapa F1:

- 15 Se transfiere un ml de un vial congelado o matraz de mantenimiento a un matraz de 125 ml que contiene aproximadamente 10 ml de medio E (composición descrita a continuación). El matraz F1 se incuba durante 3-4 días a 30 °C y 160 rpm.

2) Etapa F2:

El contenido completo del matraz F1 (aprox. 10 ml) se transfiere (10 %) hasta un matraz de 250 ml que contiene 90 ml de medio E. Este matraz F2 se incuba de modo similar durante 3-4 días a 30 °C y 160 rpm.

3) Etapa de producción:

- 5 Se inoculan matraces de producción (matraces de 250 ml que contienen 90 ml de medio E, véase más adelante las formulaciones del medio) de la etapa 2. Alternativamente se pueden usar "matraces de mantenimiento" y estos proceden de una transferencia rutinaria del cultivo del matraz cada 3-4 días a niveles que varían desde el 5 % hasta el 10 %. La fase de producción incorpora al menos 15 g/l de resina. Una vez inoculados, los matraces de producción se incuban a 30 °C y 160 rpm durante 14 días. Se incorpora alimentación para aumentar la proporción entre epotilona B y A. La alimentación comienza a las 72 horas posteriores a la inoculación, según se indica a continuación:

Se añade un ml de alimentación por frasco de producción (volumen de cultivo 100 ml) por día desde los días 3-11, continuándose las adiciones también hasta el día 14, cuando esté indicado.

- 15 La alimentación que contiene propionato contiene 10 % Maltrin-M040, 4 % propionato sódico y 3 % Tastone-154, de tal modo que cuando se añade como una dilución de 100 veces, la concentración final en el cado de cultivo, por día, se convierte en 0,1 % Maltrin-M040, 0,04 % propionato sódico y 0,03 % Tastone-154 (excluyendo niveles residuales de adiciones previas).

Los matraces generalmente se cosecharon para realizar el ensayo 14 días posinoculación.

- 20 "Precursor de ácido propiónico" se refiere a cualquier compuesto que se puede añadir a un cultivo adecuado en una cantidad efectiva para generar una cantidad de ácido propiónico efectiva para aumentar la proporción entre epotilona B y epotilona A. El ácido propiónico se puede generar espontáneamente, por ejemplo, con ésteres lábiles mediante la acción de enzimas celulares. Los expertos en la materia sabrán reconocer compuestos candidatos que se pueden analizar fácilmente para generar ácido propiónico o para incrementar la proporción entre epotilona B y epotilona A. Ejemplos incluyen ésteres metílicos y etílicos del ácido propiónico.

- 25 Por "alimentación", se entiende que al menos uno o más nutrientes o aditivos, tales como propionato sódico, una mezcla o solución que contiene propionato sódico, una vitamina, un mineral o una fuente de hidratos de carbono o una fuente de aminoácidos, añadida en más de una ocasión durante el transcurso de la fermentación, tal como, por ejemplo, periódicamente, mediante alimentación por pulsos y mediante alimentación básicamente continua. Hay que entender que una alimentación continua durante toda la fermentación está incluida dentro del significado de la expresión "añadida en más de una ocasión".

"Que contiene tolueno" significa un solvato que predominantemente contiene una cantidad de tolueno medida mediante técnicas analíticas usadas por el experto en la materia, en el que solvato que contiene tolueno puede o no puede contener uno o más disolventes adicionales.

- 35 "Que contiene acetato de etilo" significa un solvato que predominantemente contiene una cantidad de acetato de etilo medida mediante técnicas analíticas usadas por el experto en la materia, en el que solvato que contiene acetato de etilo puede o no puede contener uno o más disolventes adicionales.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se llevaron a cabo usando técnicas estándar que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia, excepto donde se describa lo contrario en detalle

- 40 También se describen los siguientes elementos:

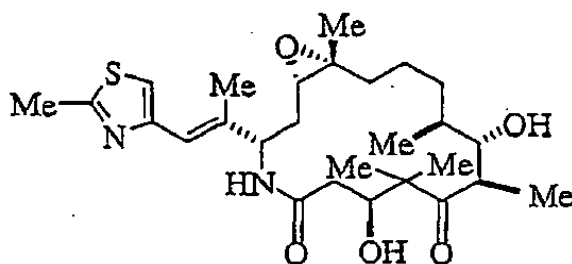
1. Un procedimiento para el aislamiento de la epotilona B a partir de un microorganismo productor de epotilona que comprende:

- 45 (a) fermentación de una cepa de microorganismo productor de epotilona en presencia de una resina que absorbe epotilona B por interacción hidrófoba;
(b) recoger la resina en un medio a base de agua;
(c) extracción de la resina con un disolvente seleccionado para extraer epotilona B y para separarlo del medio a base de agua y
(d) cristalización de epotilona B a partir de la fase de extracción antes de una etapa de cromatografía.

- 50 2. El procedimiento del apartado 1, en el que la epotilona B cristalizada de la etapa (d) es sustancialmente pura.

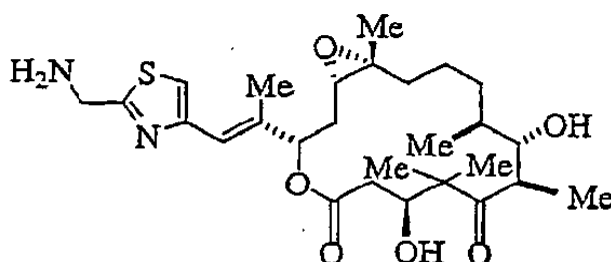
3. El procedimiento del apartado 1, en el que la resina se extrae con un disolvente polar.

4. El procedimiento del apartado 1, en el que dicha etapa de fermentación comprende además la alimentación de un aditivo capaz de mejorar la cantidad de epotilona B producido en comparación con la cantidad de epotilona A producida.
5. El procedimiento del apartado 4, en el que el aditivo es TASTONE™, maltrina o glicerol.
- 5 6. El procedimiento del apartado 1, en el que dicha etapa de fermentación comprende la alimentación continua de un aditivo capaz de mejorar la proporción entre epotilona B y epotilona A.
7. El procedimiento del apartado 4, en el que dicho aditivo es una sal o éster del ácido propiónico.
8. El procedimiento del apartado 7, en el que dicho aditivo es propionato sódico, éster metílico del ácido propiónico o éster etílico del ácido propiónico.
- 10 9. El procedimiento del apartado 1, en el que la cristalización se lleva a cabo para reducir la cantidad de epotilona A hasta aproximadamente el 55 % o menos de la cantidad de epotilona A presente después de la etapa de extracción (c).
10. El procedimiento del apartado 9, que comprende además
- 15 (e) al menos una segunda etapa de cristalización eficaz para reducir la cantidad de epotilona A hasta aproximadamente el 55 % o menos de la cantidad de epotilona A presente después de la etapa de cristalización (d).
11. El procedimiento del apartado 1, en el que el microorganismo productor de epotilona es *Sorangium cellulosum*.
- 20 12. El procedimiento del apartado 11, en el que dicho microorganismo es la cepa ATCC PTA N° 3880 de *Sorangium cellulosum*.
13. El procedimiento del apartado 11, en el que dicho microorganismo es la cepa ATCC PTA N° 3881 de *Sorangium cellulosum*.
14. El procedimiento del apartado 1, en el que la resina es un polímero a base de estireno/divinilbenceno.
15. El procedimiento del apartado 14, en el que la resina es XAD-16.
- 25 16. El procedimiento del apartado 1, en el que dicha etapa (d) comprende:
 - (i) la adición de un segundo disolvente en el que la epotilona B no es soluble o es poco soluble;
 - (ii) retirar al menos una porción del disolvente de extracción y
 - (iii) la transición del disolvente o mezcla de disolventes resultante a una temperatura a la que la epotilona B se cristaliza.
- 30 17. El procedimiento del apartado 16, en el que el disolvente de extracción es acetato de etilo o MTBE y el segundo disolvente es tolueno.
18. El procedimiento del apartado 1, que comprende además:
 - (f) antes del paso (c), el lavado de la resina con acetonitrilo acuoso, o metanol acuoso, o un medio acuoso que contiene un detergente y un reactivo de amina añadida en forma de base, seleccionándose el medio acuoso para que no eluya la epotilona B.
- 35 19. El procedimiento del apartado 1, en el que la etapa (c) comprende además filtrado por pulido del disolvente que contiene la epotilona B.
20. El procedimiento del apartado 1, que comprende además la conversión de la epotilona B, o un solvato de la misma, en el Derivado 2, o un solvato del mismo, que tiene la fórmula:



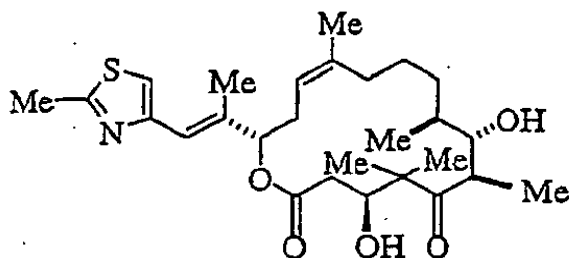
Derivado 2

21. El procedimiento del apartado 1, que comprende además la conversión de la epotilona B, o un solvato de la misma, en el Derivado 1, o una sal o un solvato del mismo, que tiene la fórmula:



Derivado 1

5 22. El procedimiento del apartado 1, que comprende además la conversión de la epotilona B, o un solvato de la misma, en el Derivado 3, o un solvato del mismo, que tiene la fórmula:



Derivado 3

23. Un procedimiento para el cultivo de un microorganismo que produce epotilona A o epotilona B, que comprende:

10 alimentar un cultivo del microorganismo que se va a cultivar en condiciones seleccionadas para promover la producción de epotilonas con ácido propiónico, un precursor del mismo, o una sal de uno de los anteriores, en el que la sincronización entre la alimentación y la cantidad de ácido propiónico, un precursor del mismo, o una sal de uno de los anteriores, se seleccionan para proporcionar al menos un aumento de dos veces en la proporción entre epotilona B y epotilona A con respecto a la proporción entre epotilona B y epotilona A
15 producida por un cultivo del microorganismo cultivado en ausencia de la alimentación de ácido propiónico, un precursor del mismo, o una sal de uno de los anteriores; y aislar epotilona B del cultivo.

24. El procedimiento del apartado 23, en el que la sincronización entre la puesta en contacto y la cantidad de ácido propiónico, un precursor del mismo, o una sal de uno de los anteriores, se seleccionan para proporcionar
20 al menos un aumento de tres veces en la proporción entre epotilona B y epotilona A.

25. El procedimiento del apartado 23 en el que la sincronización entre la puesta en contacto y la cantidad de ácido propiónico, un precursor del mismo, o una sal de uno de los anteriores, se seleccionan para proporcionar

un aumento de la proporción entre epotilona B y epotilona A de por lo menos 1,5.

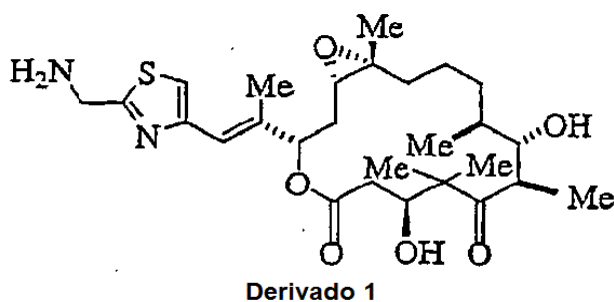
26. El procedimiento del apartado 23 en el que el microorganismo es una cepa de *Sorangium cellulosum*.

27. El procedimiento del apartado 23, en el que el ácido propiónico, un precursor del mismo, o una sal de uno de los anteriores, se añade durante o después de la fase de crecimiento del cultivo.

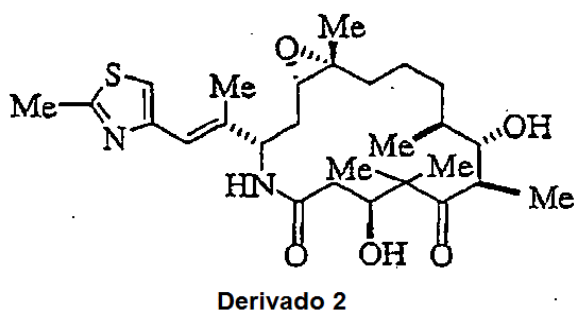
5 28. El procedimiento del apartado 27, que comprende además la alimentación del cultivo con una vitamina, un mineral, una fuente de hidratos de carbono o una fuente de aminoácidos en una cantidad que aumenta la cantidad de epotilona B producida respecto a la cantidad de epotilona B produce en ausencia de alimentación.

29. El procedimiento del apartado 27, que comprende además la alimentación del cultivo con una mezcla de fosfato monobásico y dibásico.

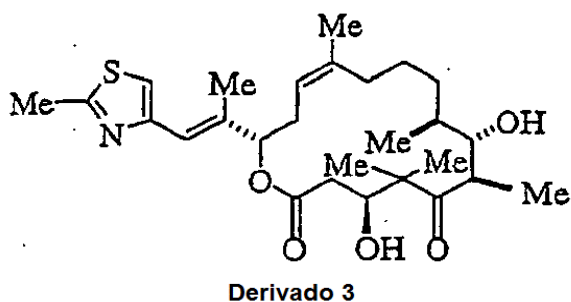
10 30. El procedimiento del apartado 23, que comprende además la conversión de la epotilona B, o un solvato de la misma, en el Derivado 1, o una sal o un solvato del mismo, que tiene la fórmula:



31. El procedimiento del apartado 23, que comprende además la conversión de la epotilona B, o un solvato de la misma, en el Derivado 2, o un solvato del mismo, que tiene la fórmula:



15 32. El procedimiento del apartado 23, que comprende además la conversión de la epotilona B, o un solvato de la misma, en el Derivado 3, o un solvato del mismo, que tiene la fórmula:



33. Una cepa de *Sorangium cellulosum* que produce, en condiciones de producción de epotilona B comparativas, al menos 5 mg de epotilona B/g de resina.

34. Una cepa del elemento 33 que produce epotilonas con una proporción epotilona B/A ratio de al menos 1,0.
35. Una cepa de *Sorangium cellulosum* depositada como ATCC N° PTA-3880.
36. Una cepa de *Sorangium cellulosum* depositada como ATCC N° PTA-3881.
- 5 37. Un procedimiento de purificación de una epotilona aislada del procedimiento del apartado 1 por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en fase inversa, que comprende:
 - (a) equilibrar una columna de HPLC de fase inversa que comprende una resina de separación con un disolvente acuoso orgánico o una mezcla acuosa de disolventes orgánicos;
 - (b) proporcionar una muestra de carga disuelta en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos adecuados;
 - 10 (d) la inyección en la columna de la muestra de carga y un volumen de salida de un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos adecuado eficaz para reducir la precipitación de la epotilona en el volumen de carga y
 - (d) eluir la columna con un disolvente orgánico acuoso o una mezcla acuosa de disolventes orgánicos, que se inicia con un menor contenido orgánico más bajo y aumenta posteriormente hasta un contenido mayor
 - 15 que el de la mezcla usada en la etapa de equilibrado, para obtener la epotilona.
38. El procedimiento del apartado 37 en el que la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) se realiza usando un aparato que comprende un volumen de carga que interviene entre un puerto de inyección y una columna de separación.
39. El procedimiento del apartado 37, en el que el disolvente orgánico de la etapa (b) es dimetilsulfóxido.
- 20 40. El procedimiento del apartado 37, en el que el disolvente orgánico de la etapa (c) es dimetilsulfóxido.
41. El procedimiento del apartado 37, en el que el disolvente orgánico de la etapa (d) es acetonitrilo acuoso o metanol acuoso.
42. El procedimiento del apartado 37, en el que el paso de inyección comprende el uso de un volumen inmediatamente anterior de dimetilsulfóxido eficaz para reducir la precipitación de la epotilona en el volumen de carga.
- 25 43. El procedimiento del apartado 37, que comprende además:
 - (e) cristalizar la epotilona para obtener epotilona B purificada.
44. Un procedimiento de purificación de una epotilona aislada del procedimiento del apartado 1 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase normal que comprende:
 - 30 (a) equilibrar una columna de HPLC de fase normal que comprende un gel o una resina de separación con un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos;
 - (b) proporcionar una muestra de carga disuelta en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos;
 - (d) la inyección en la columna de la muestra de carga y
 - 35 (d) eluir la columna con un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos, que se inicia con un contenido de disolvente polar menor y que aumenta posteriormente hasta una mezcla de disolventes más polares que la usada en la etapa de equilibrado, para obtener la epotilona.
45. El procedimiento del apartado 44, en el que el disolvente orgánico de la etapa (b) es diclorometano.
46. El procedimiento del apartado 44, en el que el disolvente orgánico de la etapa (d) es acetato de etilo o n-heptano.
- 40 47. El procedimiento del apartado 44, que comprende además:
 - (e) cristalizar la epotilona para obtener epotilona B purificada.

Ejemplo 1

Preparación de la cepa SC16408 por medio de mutación y selección y preparación de bancos de células

- 45 La cepa SC16408 se obtiene por tratamiento con nitrosoguanidina (NTG) de la cepa So ce90B2 (SC16224), seguido por selección al azar. Así, SC16224 se suspendió en 10 mM de tampón Tris-HCl y se sometió a 1 mg/ml de NTG durante 60 minutos a pH 8,2. Después del tratamiento con NTG, se obtuvieron colonias de líneas celulares por selección de colonias y se analizó la productividad de epotilona B y la proporción B/A. Las colonias aisladas se transfirieron a matraces y se cultivaron durante 8-14 días, seguido de transferencias cada 3-4 días en el medio de crecimiento (medio E): Medio de crecimiento E para matraces agitados:
- 50

Componente	g/l
Leche descremada en polvo	4
Harina tostada Nutrisoy	4
Tastone-154	2
Matrin-M180	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
EDTA, FeIII, sal Na	0,008
HEPES	12
Glicerol	4,3

Los ingredientes anteriores se añaden a agua destilada y el pH se ajusta a pH 7,2 con NaOH (o KOH) 10 % antes de la esterilización durante 30 minutos a 121 °C

Preparación del banco de células en investigación: se transfirió un volumen de 10 ml de un cultivo de 3 días de la cepa SC16408 a un matraz de 250 ml que contenía 90 ml de medio E. El matraz se incubó a 30 °C, 160 rpm durante 2 días. Después de 2 días, se extrajeron alícuotas de 1,8 ml del matraz y se transfirieron a viales criogénicos que después se congelaron a -70 °C.

Preparación del banco de células maestro: se descongelaron 2 viales del banco de células en investigación y se transfirieron a 2 matraces de 125 ml que contenían 10 ml de medio E y a continuación se incubaron a 30 °C, 160 rpm durante 4-5 días. A continuación, se transfirieron 2 x 10 ml a 2 matraces de 250 ml que contenían 90 ml de medio E y se incubaron a 30 °C, 160 rpm durante 2-4 días. Finalmente, estos 2 matraces se combinaron y se transfirieron alícuotas de 1,8 ml a viales criogénicos y se almacenaron en congelador a -70 °C.

Preparación del banco de células maestro: se descongelaron 5 viales del banco de células maestro y se transfirieron a 5 matraces de 125 ml que contenían 10 ml de medio E y a continuación se incubaron a 30 °C, 160 rpm durante 3-6 días. A continuación, se transfirieron 5 x 10 ml a 5 matraces de 250 ml que contenían 90 ml de medio E y se incubaron a 30 °C, 160 rpm durante 2-4 días. Las células de estos 5 matraces se usaron para inocular 12 matraces de 250 ml que contenían 90 ml de medio E, los cuales se incubaron de nuevo a 30 °C, 160 rpm durante 2-4 días. Finalmente, estos matraces se combinaron y se transfirieron alícuotas de 1,8 ml a viales criogénicos y se almacenaron en congelador a -70 °C. Para este banco de células de trabajo se generaron aproximadamente 500-600 viales.

Ejemplo 2

Cultivo para producir las epotilonas mediante fermentación en frascos agitados

Las células de un vial congelado (1,5 ml) se inocularon en 45 ml de medio E en un matraz de 125 ml y se cultivaron durante 4-8 días a 30 °C y 160 rpm (etapa F1). A continuación, se transfirieron 5 ml de la etapa F1 a un nuevo matraz de 125 ml que contenía 45 ml de medio E y se cultivaron durante días 3-4 (etapa F2). Las células de la etapa F2 se usaron a continuación como un inóculo para las fermentaciones de la epotilona B. El diez por ciento de inóculo (5,0 ml) se transfiere a un matraz de 125 ml que contiene 45 ml de medio de producción. Los matraces se incuban a continuación en un agitador (160 rpm) a 30 °C durante 2 semanas. El medio de producción es medio E modificado, que contiene el 1,6 % (0,8 g) de resina XAD-16. Se muestra la composición del medio de producción para matraces agitados:

Medio de producción de epotilona B para matraces agitados:

Componente	g/l
Leche descremada en polvo	4
Harina tostada Nutrisoy	4
Tastone-154	2
Maltrin-M040	10

(continuación)

Componente	g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
EDTA, FeIII, sal Na	0,008
HEPES	12
Glicerol	10
resina XAD-16	16

Los ingredientes anteriores se disolvieron en agua destilada y el pH se ajustó a 7,2 con NaOH (o KOH) 10 % antes de la esterilización durante 30 minutos a 121 °C

- 5 La composición de la solución de alimentación para la fermentación de epotilona B en matraz agitado es: propionato sódico 4 %, Maltrin M040-3 % 10 % y Tastone-154. La alimentación (100 ml en un matraz de 250) se ajustó a pH 6,8-7,0 con NaOH y se esterilizó durante 30 minutos a 121 °C. Desde el día 3 al día 14 después de la inoculación, se añadieron diariamente 0,5 ml de la solución de alimentación a cada matraz de fermentación. Alternativamente, se ha encontrado que se pueden conseguir resultados comparables duplicando los niveles de alimentación y realizando las
- 10 adiciones los días 3, 5, 7 y 10. También se pueden lograr resultados mejorados suplementado además la solución de alimentación anterior con fosfato, en forma de fosfato sódico dibásico 1,5 % y fosfato sódico monobásico 0,5 %, de tal manera que cuando se diluía 100 veces en el medio de cultivo, los niveles finales son del 0,015 % y el 0,005 %, respectivamente, con exclusión de los niveles residuales de las adiciones anteriores. Una ventaja adicional de la adición de fosfato es que no es necesario ajustar el pH. Se pueden lograr unas mejoras adicionales de rendimiento
- 15 (en epotilona B) de hasta un 10-20 % a través de la suplementación de fosfato.

Para el ensayo de epotilonas, se recogieron muestras de resina (0,8 g) y se analizaron por HPLC. La producción de epotilona en matraces agitados debe producir los siguientes títulos a los 14 días:

- 20 Epotilona A : 5,0-7,0 mg/g de resina
 Epotilona B : 8,0-12,0 mg/g de resina
 Proporción B/A: 1,1-2,0

En comparación con las cepas anteriores, el cultivo de SC16408 parece producir más epotilona B en matraces agitados.

Ejemplo 3

Cultivo para producir las epotilonas en fermentadores de 14 l

Etapa F1:	Se inoculó una alícuota de 3,0 ml de dos viales congelados en 90 ml de medio E en un matraz de 250 ml y se cultivó durante 4-8 días a 30 °C y 160 rpm.
Etapa F2:	Se transfirieron 20 ml (10 %) de las células etapa F1 a 180 ml de medio E en un matraz de 500 ml y se incubaron durante 2-4 días a 30 °C y 160 rpm.
Etapa F3:	Repetir la etapa F2 para aumentar la cantidad de inóculo. Transferir 20 ml de inóculo de la etapa F2 a 6-8 frascos de 500 ml, conteniendo cada uno 180 ml de medio E y los matraces se incuban durante 2-4 días a 30 °C y 160 rpm.
Etapa F4:	Transferir 120 ml (10 %) de la etapa F3 a 1080 ml de medio E en una botella aspiradora de 4 l y a continuación incubar durante 2-4 días a 30 °C y 160 rpm.

- 25 El medio E se usa para fabricar el inóculo para un fermentador de 14 l. Los tiempos de autoclave para las etapas de matraz agitado y botella aspiradora son 30 y 60 minutos, respectivamente. Para el fermentador, el medio de producción se esteriliza durante 60 minutos a 121 °C. El medio de producción para el fermentador de 14 l es un medio de producción para matraz agitado modificado (como se describe anteriormente), donde se ha suprimido HEPES y se han añadido 2,5 g/l de un agente antiespumante (Antiespumante AF, de Dow Corning). Se introducen
- 30 seis litros de medio de producción (pH ajustado a 7,2-7,4) en un fermentador de 14 l y se esteriliza. La siguiente tabla resume los parámetros de procedimiento a la escala de fermentador de 14 l: Parámetros del procedimiento del fermentador de mesa:

	F1 a F4	14 l
Temperatura	30 °C	32 °C
Presión		10 psi
Flujo de aire		0,25 vvm
pH		7,2-7,4
DO		20-40 %
Diámetro del impulsor (pulgadas)		3,3-4,2
Velocidad apical (m/s)		1,3-2,2
Tiempo de esterilización de la alimentación		60 min
Esterilización de los medios	30 min	60 min
Tiempo		
Resina		15-30 g/l

Composición de nutrientes de la alimentación:	Se preparó una solución compuesta de Maltrin M040- 4,1 % y Tastone-154 1,3 % en una botella de 5 l. La alimentación se esteriliza durante 60 minutos a 121 °C.
Velocidad de alimentación de nutrientes:	La velocidad de alimentación es de 6 ml/hora,
Alimentación con propionato sódico:	Propionato sódico 5,0 % (1,5 l en una botella de 2 l) se esteriliza durante 60 minutos a 121 °C.
Velocidad de alimentación de propionato sódico:	Desde 24-48 horas hasta el final, 2 ml/hora. La velocidad de alimentación se ajusta para mantener la concentración de propionato sódico entre 0,05-0,2 mg/ml basado en un ensayo de HPLC.

A continuación se resume el intervalo del título de epotilona B en fermentadores de 14 l:

Título de epotilona B, mg/g de resina	Proporción B/A
5 - 12	1,0 – 3,0

Ejemplo 4

5 Procedimiento de producción de epotilonas

Etapas de sembrado en fermentador de 50 l:

Para la etapa F1, se prepararon y se dispensaron el medio E (2 L), 90 ml cada una en 17 matraces separados de 250 ml. Los matraces se esterilizaron a continuación en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Las células de un vial congelado se inocularon en cada matraz y se cultivaron durante 4-8 días a aproximadamente 30° C y 160 rpm.

- 10 Para la etapa F2, se prepararon y se dispensaron 27 l de medio E, 1,5 l cada uno en 17 matraces separados de 4 l, a continuación, se esterilizaron, como antes. Cada matraz de 4 l, se inoculó con todo el contenido de un matraz de la etapa F1, a continuación se cultivó durante 2-4 días a aproximadamente 30 °C y 160 rpm.

- 15 Para la etapa F3, se prepararon 80 l de medio E * y se dividió en dos fermentadores de siembra de acero inoxidable de 50 l y cada fermentador de 50 l se inoculó con el contenido de tres matraces de 4 l de la etapa F2. Los fermentadores de 50 l se cultivaron durante 2-4 días a 30-33 °C, después se combinaron y se usaron para inocular un fermentador de 800 l.

El medio E* es:

Componente	g/l
Leche descremada en polvo (o concentrado de proteína de soja)	5
Harina tostada Nutrisoy	5
Tastone-154	2,5
Maltrin-M040	12,3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2
EDTA, FeIII, sal Na	0,012
Glicerol	5,4
Antiespumante	2,5

Etapas de sembrado en fermentador de 800 l:

El medio E* para el lote se compone de agua desionizada (400 l) y la mezcla, pH 8,7-8,9, se esteriliza a 117 kPa, 124 °C durante 60 minutos. El medio se transfiere desde el esterilizador al fermentador de 800 l, y el pH se ajustó a pH 7,1-7,3.

- 5 El fermentador se inoculó a continuación con 80 l de la etapa F3. El lote se procesa con los siguientes puntos de ajuste de control:

Presión:	55-82 kPa	Flujo de aire: 0,5-0,7 vvm
Temperatura:	30-33 °C	pH: 7,1 – 7,3
Velocidad del árbol agitador:	50-60 rpm	

- 10 Según sea necesario, se añade sosa cáustica (solución de hidróxido sódico o potásico) de una fuente estéril para mantener el pH en el intervalo de 7,1-7,3. El lote se muestreó a intervalos y se analizó en cuanto a esterilidad, pH, sedimentos y concentración de glucosa. También se monitorizan el CO₂ y el O₂ de los gases de escape. A aproximadamente 48-60 horas, cuando la concentración de glucosa comienza a caer, el contenido del fermentador de 800 l (aproximadamente 440-480 l) se transfiere a un fermentador de 5.000 l.

Etapas de sembrado en fermentador de 5.000 l:

- 15 Se usa un fermentador de 5.000 L de acero inoxidable en el procedimiento de inóculo en esta etapa. El inóculo se cultiva en el fermentador hasta que la masa celular es suficiente para inocular el fermentador de producción de 40.000 l.

- 20 El medio E*, preparado como antes (en agua desionizada, 2.600 l), se transfiere al fermentador de 5.000 l y después se inocula con aproximadamente 440-480 l de inóculo del fermentador de 800 l. El lote se procesa con los puntos de control establecidos y seguimiento descritos anteriormente. Una vez más, se mantiene el pH en el intervalo de 7,1 a 7,3. A aproximadamente 48-72 horas, cuando la concentración de glucosa comienza a caer, el contenido del fermentador de 5.000 l se transfiere al fermentador 40.000 l.

Etapas de producción en fermentador de 40.000 l:

- 25 Se usa un fermentador de 40.000 l de acero inoxidable en la producción de las epotilonas. Una vez que el fermentador se ha esterilizado y llenado con medio estéril, se inoculó con la siembra preparada en el fermentador de 5.000 l. Una vez que los parámetros de producción específicos se consiguen, se cosecha el contenido del fermentador de producción.

El medio para el fermentador de producción se esteriliza en dos partes. La resina se añade a 2.800 l de agua y la mezcla se esteriliza a 117 kPa, 124 °C durante 75 minutos

Componente	Cantidad
Resina XAD-16 lavada	15-40 g/l

Para preparar 18.000 l de medio, se añaden los siguientes componentes en agua desionizada (15.000 l) y se ajusta el pH a 7,1-7,3. El medio se esterilizó a 50 °C en un esterilizador continuo (tiempo de residencia 100 segundos, temperatura de salida 60 °C):

Componente	Peso (kg)
Leche descremada en polvo	130
Harina tostada Nutrisoy	130
Tastone-154	65
Maltrin-M040	238
CaCl ₂ ·2H ₂ O	21,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	21,6
EDTA, FeIII, sal Na	0,22
Glicerol	216
Antiespumante	54

- 5 El medio y la resina se transfieren al fermentador de producción que a continuación se inocula con aproximadamente 3, 100 l de inóculo del fermentador de 5.000 l. El lote se procesa con los puntos de control de ajuste descritos anteriormente, excepto el flujo de aire es 0,2-0,4 wm. Según sea necesario, el pH (entre 0 y 80 horas) se puede aumentar con sosa cáustica. Después de 80 horas, se baja el pH con ácido sulfúrico. Según sea necesario, la formación de espuma se controla con antiespumante, el fermentador se muestrea al menos una vez al día para
- 10 determinar la esterilidad, pH, sedimento, glucosa, propionato y concentración de epotilona B. El CO₂ en el gas de escape se monitoriza y se registra. La alimentación comenzó a aproximadamente 30-60 horas, siempre y cuando el CO₂ sea de al menos el 0,3 %.

- El fermentador se alimenta con propionato sódico (102 g/l) con un tamaño de inyección de 1,9 l/inyección (intervalo 1,5 a 3,0). El intervalo de inyecciones comienza a los 60 minutos y disminuye cada 12 horas hasta un mínimo de 12
- 15 minutos. El propionato se añade a 2.800 l de agua desionizada y la solución se esteriliza a 117 kPa, 124 °C durante 75 minutos. En una realización preferida, la alimentación de propionato sódico es independiente de la alimentación que contiene otros componentes del medio.

- El fermentador se alimenta con Maltrin-M040 y Tastone- 154 con un tamaño de inyección de 14,5 l. El intervalo entre inyecciones se inicia a los 60 minutos y se cambia a las 104 horas a 40 minutos. Los componentes se añadieron a
- 20 agua desionizada (3.000 l) y se esterilizó a 117 kPa, 124 °C durante 75 minutos. La alimentación comprende:

Componente	g/l
Tastone-154	20
Maltrin-M040	66
Antiespumante	1,0

- Durante el procesamiento, algunos de los componentes del medio, como la leche descremada en polvo, Maltrin-M040 y glicerol, se agotan. A partir de aproximadamente 115 horas, la alimentación previa se interrumpe y se inyecta la siguiente mezcla con un tamaño de inyección de 14,5 l al fermentador de producción a intervalos de 40 minutos. Los componentes se añaden en agua desionizada (3.000 l) y la mezcla, pH 8,7-8,9, se esteriliza a 117 kPa,
- 25 124 °C durante 75 minutos:

Componente	g/l
Leche descremada en polvo	49
Maltrin-M040	154
Tastone-154	20
Glicerol	78
Antiespumante	1,6

Cuando se consigue una concentración deseada de epotilona B (normalmente después de 9-21 días), se cosecha el contenido del vaso. Los títulos de la epotilona B varían desde aproximadamente 5-24 mg/g de resina, siendo las proporciones B/A de aproximadamente 1,5-4.

5 Ejemplo 5 (Ejemplo de referencia)

Extracción de epotilona B de la resina XAD-16 con MTBE y cristalización para dar epotilona B sólida; purificación por cromatografía de fase inversa y aislamiento final de epotilona B de alta calidad

La resina XAD-16 cosechada y lavada con agua (aproximadamente 550 kg) que contiene las epotilonas (aproximadamente 5,03 kg de epotilona B) se mezcla con metanol acuoso y se carga en una columna de extracción en forma de suspensión. La resina de relleno se lava con metanol acuoso (1 volumen de lecho cada uno del 30 % después MeOH 50 %) para eliminar los materiales altamente polares no deseados. Las epotilonas se eliminan con lavados de MTBE (aproximadamente 4 volúmenes de lecho). El eluido rico se recoge y se filtra por pulido. Después de sedimentación por gravedad para eliminar cualquier fase acuosa, el MTBE rico se concentra. El concentrado sedimenta por gravedad, la fase acuosa se elimina y se añade MTBE adicional (2 volúmenes de lecho) al lote. El lote se vuelve a concentrar hasta una concentración de aproximadamente 5 a 15 g de epotilona B por l. El lote se cristaliza por enfriamiento gradual durante 5-6 horas a aproximadamente 0 °C. El sólido cristalino se filtra, se lava y se seca. La torta de producto resultante se disuelve en acetato de etilo caliente y se filtra por pulido. El filtrado rico se concentra a vacío hasta una concentración de aproximadamente 20 a 45 g de epotilona B por L. Después de calentar a 70 °C, el lote se enfría lentamente hasta aproximadamente 0 °C para dar una suspensión cristalina que se filtra, se lava con EtOAc frío y se seca hasta menos de 40 °C para dar epotilona B recristalizada aislada (84 % de rendimiento a partir de la resina). Este producto se purifica a continuación por cromatografía de fase inversa.

Una columna cromatográfica (11 cm de diámetro x 40 cm de longitud de lecho) rellena con soporte estacionario de fase inversa RP/C-18 se equilibra con acetonitrilo acuoso (30-50 % v/v). El producto recristalizado se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO, 1-1.5 l por kg), la mezcla se filtra para eliminar materiales insolubles y luego se carga en la columna precedido por una alícuota de DMSO 100 % y seguido por un volumen igual de DMSO para reducir la precipitación de la muestra después de la introducción de la fase móvil acuosa. La muestra se eluye de la columna usando acetonitrilo acuoso (30-50 % v/v) y el efuyente se monitoriza a 290 nm mediante un detector UV. El pico del producto epotilona B se recoge en varias fracciones. Las fracciones se analizan por HPLC para la epotilona A y B y otras impurezas relacionadas.

Las fracciones combinadas deseadas de la columna se cargan en un paquete de destilación y el lote se concentra al vacío para eliminar el acetonitrilo a una temperatura por debajo de 40 °C. La fase acuosa resultante se extrae hasta tres veces con acetato de etilo y la solución orgánica se concentra al vacío a una temperatura inferior a 40 °C para dar una concentración de 0,1 a 0,2 g/ml de epotilona B. Se añade al lote n-heptano (o heptanos) a 40 °C, a continuación, el lote se enfría lentamente hasta 2 a -0 °C y se mantiene durante al menos 2 horas. La suspensión de cristales se filtra y se lava con una solución de acetato de etilo/n-heptano, a continuación, la torta final de epotilona B se seca al vacío a 35-40 °C para dar 3,367 kg con una potencia del 91,7 %, equivalente a 3,09 kg de actividad de la epotilona B. El rendimiento de la resina fue del 61,4 %. La HPLC indicaba 99,6 % de área epotilona B, 0,4 % de área de epotilona A, sin presencia otra impureza >0,1 % de área.

Ejemplo 6 (Ejemplo de referencia)

Extracción de epotilona B de la resina XAD-16 con acetato de etilo y cristalización con tolueno como antidisolvente para dar epotilona B sólida; purificación por cromatografía de fase inversa y aislamiento final de epotilona B de alta calidad

La resina XAD-16 que contiene epotilona B se lava con agua sobre un tamiz vibratorio (SWECO TM) para limpiar la resina. Una porción de esto (aproximadamente 6,6 l, que contiene 15,6 g de epotilona B, valoración 2,36 mg de epotilona B por gramo de resina) se transfiere a un recipiente de 20 l con aproximadamente 5 l de agua para enjuagar la resina con agua. A continuación se añade al recipiente acetato de etilo (aproximadamente 2 volúmenes de lecho (VL) de resina de entrada). La suspensión se agita durante aproximadamente una hora y se centrifuga a

3.500 rpm durante 5 minutos usando frascos de centrífuga con tapón de rosca de 600 ml para separar las capas. Los primeros sobrenadantes ricos en acetato de etilo se decantan y se miden sus volúmenes. A continuación, las capas inferiores que contienen la resina acuosa se combinaron en el recipiente y se añade acetato de etilo (2 VL) al recipiente. La suspensión se agita durante aproximadamente 1 hora y después se centrifuga para obtener capas separadas. El segundo sobrenadante rico en acetato de etilo se decanta y se miden sus volúmenes.

A continuación se añade agua (~ 0,3 VL de resina de entrada) a las primera y segunda corrientes ricas en acetato de etilo combinadas y se agita durante aproximadamente 5 minutos. Se deja que las capas se asienten durante 30 minutos aproximadamente. A continuación, la capa acuosa inferior se separa de la capa superior rica en acetato de etilo. La capa rica en acetato de etilo lavada se concentra a una temperatura inferior a 45 °C, hasta una concentración de aproximadamente 10 g de actividad de epotilona B por litro. La solución concentrada rica en acetato de etilo se filtra por pulido a continuación y se concentra hasta a 20-25 g/l de epotilona B.

Después de la concentración, se añade tolueno y el lote se vuelve a concentrar usando vacío a menos de 50 °C, hasta el volumen del lote antes de la adición de tolueno. El lote se deja enfriar a aproximadamente 18 °C durante aproximadamente 1 hora, después se agita durante aproximadamente 16 horas a esta temperatura para producir cristales de producto. A continuación, el lote de cristalización se filtra y se lava con tolueno (~ 0,2 VL) y los sólidos se secan para dar aproximadamente 30,4 g de sólido que contiene 13,5 g de actividad de epotilona B. El rendimiento de actividad respecto a la resina de partida es del 87 %.

La purificación por cromatografía de fase inversa se lleva a cabo sobre la epotilona B sólida extraída de la resina mediante el procedimiento anterior. La columna (Phenomenex Luna, 15, C18(2), 5,0 cm x 25 cm, columna VL 400 ml) se pre-equilibró con 3 VL de acetonitrilo-agua 40 % (v/v). Se disuelven aproximadamente 4-6 g de la epotilona B sólida en aproximadamente 6 ml de DMSO a aproximadamente 40 °C, a continuación, la mezcla se filtra a través de papel de filtro para eliminar las partículas. Aproximadamente 1,5 ml de DMSO se inyectan en el bucle de muestra para evitar la precipitación de las epotilonas en la tubería. El filtrado rico en epotilona se inyecta a continuación en el bucle de muestra. Después de la inyección, el recipiente con el filtrado de epotilona se lava con alrededor de 0,5 ml de DMSO y se inyecta junto con aproximadamente 1 ml de DMSO en el bucle de muestra. La inyección de DMSO después de la inyección de la muestra epotilona evita la precipitación en la tubería. Los contenidos del bucle de muestra se cargan en la columna a un caudal de aproximadamente 5 ml/min.

Después de cargar la epotilona en la columna, la solución de acetonitrilo-agua al 40 % se bombea a través de la columna. Después de 3-4 minutos, la velocidad de flujo se incrementa hasta aproximadamente 60 ml/min. Los picos de epotilona A y B se recogen en fracciones. Las fracciones ricas en epotilona B se obtienen generalmente en los cortes entre aproximadamente 2,5 l y 3,25 l de volumen eluido (el pico de epotilona B eluye normalmente entre aproximadamente 6 y 8 volúmenes de lecho). El volumen de las fracciones combinadas es de aproximadamente 0,75 L. Después de que el pico de epotilona B haya alcanzado casi la línea base (< 10 % de la altura de pico), se bombea acetonitrilo 100 % a través de la columna. Cuando el cromatograma indica que la absorbancia a 290 nm ha regresado esencialmente a la línea base, se inicia el re-equilibrado de la columna para la próxima tanda bombeando una solución de acetonitrilo 40 %-agua en la columna. Generalmente se usan 2 VL de acetonitrilo 100 % y 3 VL de acetonitrilo 40 % para lavar y volver a equilibrar la columna.

Las fracciones se valoran para determinar la pureza usando el análisis de HPLC y las fracciones deseadas se combinan. Los rendimientos típicos son del 90-98 %.

Las fracciones de epotilona B combinadas se concentran al vacío a menos de 40 °C, a aproximadamente el 50 % del volumen inicial. Las fracciones concentradas se extraen con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se concentran a aproximadamente 0,1 g/ml de epotilona B a una temperatura de baño de aproximadamente 40 °C. Mientras se agita, se añade n-heptano (o heptanos) (usando un volumen del 50 % de la solución de acetato de etilo) durante un período de aproximadamente 15 minutos. Los extractos se enfrían hasta 5 °C y se mantienen a esa temperatura durante al menos 2 horas. Los cristales de producto se filtran y se lavan con una solución de n-heptano:acetato de etilo 1:2 (v:v). Finalmente, los cristales se secan al vacío a aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 12 horas. La HPLC indicó para diversos lotes el 99,5-99,7 % de área de epotilona B y el 0,3-0,5 % de área de epotilona A.

Ejemplo 7 (Ejemplo de referencia)

Extracción de epotilona B de la resina XAD-16 con acetato de etilo y cristalización con tolueno como antidisolvente, seguido de recrystalización para dar epotilona B de grado primario; purificación por cromatografía de fase inversa y aislamiento final de epotilona B de alta calidad

Paso A. Preparación de epotilona B de grado primario usando extracción en EtOAc-cristalización con tolueno:

La resina rica en epotilona B lavada con agua (1350 g) se carga en una columna. Se usa agua (2700 ml) para cargar y lavar la columna. La actividad epotilona se eluye haciendo pasar 9450 ml (7 volúmenes de lecho) de acetato de etilo a través de la columna. El eluato de acetato de etilo se deja reposar durante al menos una hora. Se eliminan una capa acuosa de color marrón oscuro y una capa de emulsión. La solución rica en acetato de etilo se concentra al vacío hasta una concentración objetivo de aproximadamente 20 g de epotilona B por l. El concentrado se deja

5 reposar 2 horas y se enfría a 20 °C. El concentrado enfriado se filtra por pulido y el filtro se lava con acetato de etilo (36 ml). El filtrado y lavado combinados se concentraron hasta aproximadamente 80 g de epotilona B por l y se calienta a 65 °C. Un volumen igual de tolueno se añade con agitación durante 10-15 minutos, manteniendo la temperatura por encima de 60 °C. La temperatura se mantiene a 65 °C durante 30 minutos, seguido por reducción de la temperatura a 40 °C durante 1,5 horas y luego disminución de la temperatura a 1 °C durante 2 horas. La suspensión cristalina resultante se agita a 1 °C durante al menos 60 minutos. Los sólidos se separan por filtración y se lavan con tolueno (20 % del volumen de suspensión). (Después de varias repeticiones de este procedimiento, las aguas madre normalmente contienen el 2-6 % de la actividad de epotilona B de entrada). Los sólidos se secan al vacío en un horno a 40-45 °C durante al menos 4 horas. Alternativamente, los sólidos se secan al vacío en un horno a una temperatura entre aproximadamente 40 °C y la temperatura ambiente durante al menos 4 horas.

El peso de la torta de epotilona B primaria desecada variaba desde 8,4 hasta 20 g, variando la potencia de epotilona B desde 650 hasta 713 mg/mg. La torta también contenía del 12 % al 26 % de epotilona A (porcentaje de área) Los niveles de disolventes residuales fueron del 0,7 % (p/p) de EtOAc y del 13 % (p/p) de tolueno.

Se evaluaron cinco lotes:

Peso de entrada (g)	Valoración (g de epo B/Kg)	epo B de entrada (g)	Epo B en torta primaria (g)	% recuperación
1327-1391	4,4-12,2	6,0-16,5	5,5-13,6	87-98

15 Las pérdidas totales para el procedimiento de aislamiento fueron del 9,4 % como promedio. El porcentaje del pico de epotilona A respecto al pico de epotilona B para la torta primaria se redujeron un promedio del 49 % al 19 %. El patrón de PXRD y el análisis térmico del solvato cristalino obtenido siguiendo el procedimiento descrito en esta etapa se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. El patrón de PXRD de la Figura 9 se caracteriza además por los datos presentados en la Tabla 6 anterior.

20 Paso B, Recristalización de epotilona B:

Se añade EtOAc (0,14 l) a 15 g de epotilona B de grado primario (710 mg/mg) y se calentó a 65-68 °C con agitación. (La concentración objetivo de epotilona B era 75-80 actividad g por litro). Se añade tolueno (0,14 l) durante 20 minutos mientras se mantiene una temperatura por encima de 60 °C. La suspensión resultante se mantiene a 65 °C durante 0,25 horas a 1 hora. El lote se enfría a continuación a 40 °C durante 3 horas. El enfriamiento del lote continúa hasta 0-2 °C durante 2 horas. El lote se mantiene a continuación a 0-2 °C durante 12 horas. La suspensión cristalina resultante se filtra y la torta se lava con tolueno (2 x 0,028 l). Generalmente, en las aguas madre y en el lavado combinados se pierde menos del 3 % de la actividad de entrada de epotilona B. La torta se seca en una estufa de vacío a 42 °C y 73,66 cm de Hg durante 2 horas. Alternativamente, la torta se seca en una estufa de vacío a una temperatura entre aproximadamente 40 °C y la temperatura ambiente y 73,66 cm de Hg durante 2 horas. El peso de la torta seca es de 13,6 g con una potencia de 764 µg/mg. Los disolventes residuales incluyen EtOAc (0,9 % en peso) y tolueno (13,2 %). Generalmente, el EtOAc y el tolueno están presentes en niveles combinados del 13-14 % en peso. El porcentaje del área del pico de la epotilona A con relación al pico de la epotilona B para la torta recristalizada cayó a un promedio del 6,9 %.

35 El patrón de PXRD y el análisis térmico para el solvato cristalino obtenido siguiendo el procedimiento descrito en esta etapa se presentan en las figuras 11 y 12, respectivamente. El patrón de PXRD de la figura 11 se caracteriza además por los datos descritos en la Tabla 7 anterior.

Cromatografía en fase normal:

Se preparan las siguientes fase móviles:

40 Solución 20 % (v/v) de acetato de etilo/n-heptano (~ 10 l),
40 % de acetato de etilo/n-heptano (~ 10 l) y
100 % de acetato de etilo (~ 10 l).

Parámetros establecidos del equipo:

Waters Delta Prep 4000; Detector: UV fijado a 290 nm; Columna: Phenomenex Luna, 10 micras, sílice (2), 5,0 cm X 25 cm (volumen de la columna - 490 ml).

45 La columna se equilibra con 3 volúmenes de lecho de solución de acetato de etilo/n-heptano 20 % (v/v) antes de la inyección de la solución de epotilona.

La torta de epotilona B (5,5 g) se disuelve en 55 ml de cloruro de metileno. El lote se filtra a través de un filtro de PTFE de 1 micra para eliminar cualquier partícula que pudiera estar presente. Se usa cloruro de metileno (2-5 ml) para enjuagar el filtro. El filtrado rico en cloruro de metileno se inyecta en la columna a un caudal inicial de 5 ml/min durante los primeros 30 segundos, seguido por el aumento del flujo de 20 ml/min hasta que la muestra esté

completamente cargada. El recipiente que contiene el filtrado de epotilona se enjuaga con cloruro de metileno (2-5 ml) y el enjuague también se carga en la columna.

La elución se inicia con el 20 % de EtOAc/heptano al tiempo que aumenta el caudal de 118 ml/min. Después de que la velocidad de flujo alcanza 118 ml/min, el controlador del programa de la bomba se usa para ejecutar el programa de la bomba deseado. Se usa el siguiente programa de la bomba:

5

		% acetato de etilo/heptano			volumen	volúmenes de lecho
Tiempo	flujo (ml/min)	A	B	C	ml	VL
0	118	20				
7,5	118	20			897	1,83
7,6	118		40			
45,6	118		40		4496	9,18
45,7	150			100		
69,3	150			100	3555	7,26
69,4	150	20				
85,7	150	20			2460	5,02
85,8	0	20				

Se recogen las fracciones y se valoran para determinar la pureza mediante HPLC.

En cinco lotes, el porcentaje del área de la epotilona B en las fracciones recogidas fue del 99,59-99,93 %, con un rendimiento promedio del 91 %.

- 10 Opcionalmente, la cromatografía se realiza de manera similar usando un paso de elución isocrático 40 % acetato de etilo/n-heptano, siendo el paso de lavado de la columna con acetato de etilo al 100 % similar, seguido por re-equilibrado con el 40 % de acetato de etilo. Se usa el mismo equipo de cromatografía con un diámetro menor de la columna 1,0 cm X 25 cm. El rendimiento de cromatografía para la epotilona B (164 mg) en las fracciones transferidas era del 86 % y el porcentaje del área de la epotilona B en las fracciones recogidas fue del 99,4 %. El procedimiento isocrático anterior también se realizó sobre una columna comprimida axial de 11 cm con 31-35 g de epo B eluida en
- 15 las fracciones de transferencia con rendimientos cromatográficos del 90-94 %. El porcentaje de área de la epotilona B en las fracciones transferidas recogidas fue del 99,6-99,9 %. La columna se puede volver a usar varias veces.

Paso C, cristalización final:

- 20 Las fracciones transferidas deseadas se combinan para dar un volumen de lote de 1,62-1,73 l. El disolvente se elimina al vacío a 40-45 °C. El volumen de destilación objetivo es 25-28 ml (concentración de epotilona B de aproximadamente 200-210 g/l). Al concentrado se añade heptano caliente (aproximadamente 40 °C) (50 ml). Alternativamente, se puede añadir EtOAc (50 ml) caliente (aproximadamente 40 °C) al concentrado en este paso. La suspensión resultante se agita a aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 2 horas, a continuación se

enfria hasta aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 5 horas y se agita adicionalmente a aproximadamente 0 °C durante un mínimo de 5 horas. Se usa agitación mecánica a velocidad moderada a lo largo de la cristalización. La suspensión cristalina se filtra y la torta se lava con EtOAc/heptano 1:1 (25 ml). Los sólidos se secan en una estufa al vacío a 40-45 °C durante 5-6 horas. Alternativamente, los sólidos se secan en un horno de vacío a una temperatura entre aproximadamente 40 °C y temperatura ambiente durante 5-6 horas. El peso de la epotilona B aislada (para cinco lotes) es aproximadamente 4,2-5,0 g (rendimiento de actividad 83,5-85,6 %) respecto a la actividad de la epotilona B recristalizada (una vez) y la pureza por HPLC es del 99,78 al 99,93 por ciento de área % (promedio del 99,80 %). La pérdida de epotilona B en las aguas madres es de aproximadamente el 4 % con respecto a la actividad de epotilona B de entrada en la cromatografía. Los disolventes residuales en la torta son EtOAc (5,8-6,0 % p/p) y heptano (0,6-0,7 % p/p). La potencia de la torta final de epotilona B varía desde 91,5 hasta el 92,7 % p/p. La pureza por HPLC es superior a 99,7 por ciento de área. El patrón de PXRD y el análisis térmico, para un cristal solvato obtenido siguiendo el procedimiento descrito en esta etapa se presenta en las Figuras 13 y 14, respectivamente. Como puede verse en la Figura 14, el punto de fusión para el solvato acetato de etilo preparado y secado de acuerdo con el procedimiento anterior es de aproximadamente 102 °C. El patrón de PXRD de la Figura 13 se caracteriza además por los datos indicados en la Tabla 8 anterior.

Alternativamente, las fracciones transferidas combinadas que contenían 4,83 Kg de Epo B (1790 l) se concentraron al vacío a < 30 °C hasta una concentración objetivo de 200-210 g/l y después se añadió n-heptano (60 kg). Esta concentración se repitió y luego se añadieron 60 kg adicionales de heptano. La suspensión se enfrió hasta 20 °C durante tres horas, se recogió y se lavó con 30 Kg de heptano. Los sólidos se secaron a 20-36 °C durante 16 horas al vacío. Se obtuvieron un total de 5,141 kg de sólido con una pureza HPLC del >99,6 % de área. Los disolventes residuales en la torta fueron 10,6 % de acetato de etilo y 1,4 % de heptano.

Ejemplo 7A (Ejemplo de referencia)

Extracción de epotilona B de la resina, seguido de recristalización repetida

La resina rica en epotilona lavada con agua (549,8 kg) que contiene aproximadamente 4,10 Kg de actividad de epotilona B (% de área para la epotilona B = 58,0 %; epotilona A = 29,2 %) se suspendió en agua y se cargó a una columna (700 l). La columna se drenó y se burbujeó nitrógeno. A continuación se eluyó acetato de etilo (2969 Kg) a través de la columna a una velocidad de volumen de ~ 1 volumen de lecho por hora para un total de ~ 6 volúmenes de lecho. El eluato combinado rico en acetato de etilo se sedimentó por la gravedad ~ 1 hora antes de extraer la fase acuosa inferior. La fracción rica en acetato de etilo se concentró a continuación hasta ~ 574 kg. La fracción rica en acetato de etilo concentrada se dejó reposar a continuación a ~ 20 °C durante ~ 2 días antes de la filtración por pulido. El filtro y las líneas se lavaron con acetato de etilo (~ 115 total de kg). El filtrado por pulido y el lavado se concentraron a continuación hasta un volumen de ~ 64 l, a continuación se calentó a ~ 68 °C. Seguidamente se añadió un volumen igual de tolueno caliente con agitación y el material se mantuvo a ~ 65 °C durante ~30 minutos. El lote se enfrió a continuación lentamente hasta ~40 °C durante ~ 4 horas, seguido por enfriamiento a 0 °C durante ~ 2,5 horas. La suspensión fría se mantuvo a ~ 0 °C durante ~ 1 hora. La suspensión cristalina resultante se filtró a continuación y la torta se lavó con tolueno (~ 64 l). La torta resultante se secó brevemente al vacío y después se volvió a disolver en el secador de filtro usando acetato de etilo caliente (~ 200 kg).

La primera recristalización se realiza de manera similar concentrando la fracción rica en acetato de etilo hasta ~ 65 l. Después de calentar a 65 °C se añadió un volumen igual de tolueno con agitación y el material se mantuvo a ~ 65 °C durante ~ 30 minutos. El lote se enfrió de forma similar a como se hizo anteriormente y la suspensión cristalina resultante se filtró y se lavó usando el mismo procedimiento y equipo que antes.

Se hicieron dos recristalizaciones adicionales similares a las descritas anteriormente para producir una torta de epotilona B cristalina con (4,384 Kg) (81,5 % p/p) (3,573 kg de epotilona B) (% área de HPLC para: epotilona B = 97,18; epotilona A = 1,40; epotilona F = 0,30; análogo de oxazol = 0,30 y análogo de etil tiazol = 0,56). No se detectaron otras impurezas por HPLC en el porcentaje de área de 0,1. El producto contenía un 13,8 % p/p de tolueno y un 0,8 % p/p de acetato de etilo. El rendimiento de actividad global de la resina en cuanto a la epotilona B purificada aislada fue del 87 %.

Ejemplo 7B (Ejemplo de referencia)

Recuperación de la Epo B de las aguas madre

Las aguas madres de la cristalización de Epo B de los extractos de MTBE o EtOAc se combinaron y contenían 2,2 g de Epo B y 4,8 g de Epo por litro de solución. Se concentraron diez litros de esta solución al vacío a ≤ 50 °C hasta una concentración de 11-15 g de Epo B por litro. Se añadió un volumen de tolueno y se comenzó a formar sólidos; la destilación se continuó hasta lograr de nuevo una concentración de 11-15 g de Epo B/L. Se añadió un volumen de tolueno de nuevo y la destilación se repitió una vez más hasta alcanzar 11-15 g de Epo B/L. La suspensión se enfrió hasta temperatura ambiente durante 1 hora, después se agitó durante 90 minutos. La mezcla se volvió a calentar a ~ 50 °C, se agitó durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de agitar durante un mínimo de 3 horas, los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con tolueno y después se secaron al vacío a ~ 40 °C para dar una recuperación del ~ 92 % de la actividad de Epo B. La valoración de los sólidos fue del 42,9 %

p/p de Epo B con un 16 % p/p de tolueno. Las aguas madres contenían el 66 % de la epotilona A de entrada y sólo el 5 % de la epotilona B de entrada.

Ejemplo 7C (Ejemplo de referencia)

5 Las fracciones transferidas combinadas (200 ml), del procedimiento de cromatografía de fase normal descrito en el Ejemplo 7, que contenían 646 mg de Epo B se añadieron lentamente a 43 ml de tolueno mientras se concentraba al vacío con una temperatura de la camisa de ~ 65 °C hasta ~ 43 ml. Se añadió tolueno (43 ml) al vacío mientras continuaba la destilación con una temperatura de la camisa de ~ 65 °C. La suspensión se concentró hasta ~ 43 ml y a continuación se dejó enfriar ~ 20 °C durante ~ 3 horas. Los cristales se recogieron, se lavaron con 2 x 5 ml de tolueno y se secaron al vacío (73,66 cm Hg) a ~ 40 °C durante 30 minutos para dar 729 mg de torta cristalina aislada
10 (85,3 % p/p de Epo B). La pureza por HPLC era del 99,77 % en área (% de área excluyendo tolueno). Los disolventes residuales de la torta eran el 15,3 % p/p de tolueno y el 0,3 % p/p de EtOAc. Las aguas madre y el lavado contenían sólo el 0,5 % de la actividad de epotilona B de entrada.

En la Figura 15 (patrón superior) se muestra un patrón de PXRD observado para el solvato cristalino obtenido siguiendo los procedimientos descritos en esta etapa, junto con un patrón de PXRD simulado para un solvato de tolueno a temperatura ambiente (patrón inferior). El análisis térmico para este solvato cristalino se muestra en la
15 Figura 16.

Ejemplo 8 (Ejemplo de referencia)

Preparación de formas cristalinas específicas

Ejemplo 8A: Preparación de epoB-TOB (Ejemplo de referencia)

20 Preparación de epotilona B, solvato tolueno

Se disolvió Epo B en ~ 13 ml de acetato de etilo a ~ 40 °C. Se añadió un volumen de tolueno seguido por concentración a una temperatura del baño de <40 °C a 9 m. Este se volvió a calentar a -55 °C, seguido por la adición de otro volumen de tolueno. Esta se concentró a continuación hasta ~ 10 ml y se dejó enfriar hasta 18 °C. La suspensión se usó para la determinación de la estructura de rayos x.

25 La estructura molecular de la forma de unidad de celda monoclinica de epoB-TOB y los patrones de PXRD de epoB-ToB, obtenidos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se muestran en las Figuras 4 y 6, respectivamente.

Ejemplo 8B: Preparación de epoB-ANB (Ejemplo de referencia)

Preparación de epotilona B, solvato acetonitrilo

30 Se dejó evaporar lentamente a temperatura ambiente una solución de epotilona B esencialmente pura en acetonitrilo acuoso (procedente de las fracciones combinadas de la columna resultantes de la cromatografía de fase inversa del ejemplo 5) para dar una suspensión de cristales a partir de acetonitrilo-agua. La suspensión de cristales se examinó directamente por difracción de rayos x.

35 La estructura molecular de la forma de unidad de celda monoclinica de epoB-ANB y los patrones de PXRD de epoB-ANB, obtenidos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se muestran en las figuras 2 y 7, respectivamente.

Ejemplo 8C: Preparación de epoB-EAB (Ejemplo de referencia)

Preparación de epotilona B, solvato EtOAc

40 Una solución de epotilona B en EtOAc/heptano 1:1 se concentra a una concentración objetivo de ~ 190-195 g/l. A esta suspensión espesa de la epotilona B, se añaden con agitación 10 volúmenes de EtOAc a ~ 40 °C. La suspensión resultante se agita a 40 °C durante 2 horas, se enfría a 0 °C durante 5 horas y se agita adicionalmente a 0 °C durante un mínimo de 5 horas. La suspensión se filtra y la torta se lava con EtOAc/heptano 1:1. La torta se secó en la estufa de vacío durante 5-6 horas para dar la torta de epotilona B final con ~ 5-14 % de EtOAc.

45 La estructura molecular de la forma de unidad de celda monoclinica de epoB-EAB y los patrones de PXRD de epoB-EAB, obtenidos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se muestran en las figuras 1 y 5, respectivamente.

Ejemplo 8D: Preparación de epoB-IP63 (Ejemplo de referencia)

Preparación de epotilona B, solvato AIP

50 La epotilona B (70 mg) se disolvió en 4 ml de AIP calentando la solución hasta que se formó una solución clara. Esta solución se enfrió a temperatura ambiente. Los sólidos formados se eliminaron inmediatamente por filtración. El

filtrado transparente se colocó en un vial pequeño y se cubrió con papel de aluminio con algunos orificios. El disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente muy lentamente durante un período de varios días hasta que se observó un crecimiento considerable de cristales. Los cristales en forma de suspensión húmeda se sometieron a análisis de rayos X.

- 5 La estructura molecular de la forma de unidad de celda monoclinica de epoB-IPB y los patrones de PXRD de epoB-IPB, obtenidos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se muestran en las figuras 3 y 8, respectivamente.

Ejemplo 9 (Ejemplo de referencia)

Formación del Derivado 2 (una lactama) a partir de la epotilona B (una lactosa)

- 10 Se prepara una solución de una azida de tetrabutylamonio (azida TBA) mezclando cloruro de tetrabutylamonio y azida sódica en THF/DMF. La solución de azida TBA resultante se recuperó por eliminación de cristales de NaCl por filtración. Se carga en un matraz con agitación una catalítica de un agente tal como tris (dibenciledenacetona)-dipaladio o el aducto de cloroformo de este catalizador seleccionado para estabilizar un catión alílico, cloruro de amonio, epotilona B y la solución de THF/DMF de la azida TBA. La suspensión se desoxigena por burbujeo de nitrógeno durante aproximadamente 25 minutos a 0-5 °C. Se añade trimetilfosfina a 0-5 °C. La mezcla de reacción se calienta a 32-38 °C y la agitación se continúa durante 4-16 horas para producir un aminoácido intermedio resultante de la rotura de la funcionalidad éster. La mezcla de reacción se enfría a 18-24 °C y se filtra para eliminar los sólidos. Los sólidos se lavaron con THF y el filtrado se combina con el filtrado rico. Esta solución se añade gota a gota durante 9-10 horas a la suspensión de THF-DMF de 1-hidroxibenzotriazol hidrato, 1- (3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida y carbonato de potasio a 30-37 °C. La mezcla resultante se enfrió a 0-12 °C, se inactivó con agua mientras se mantenía la temperatura a <10 °C. La mezcla se extrae con acetato de etilo de tres a cuatro veces y las capas combinadas de acetato de etilo se diluyeron con ciclohexano (proporción acetato de etilo-ciclohexano 3:1) y se extrajeron de nuevo con agua. La capa orgánica se diluye adicionalmente hasta una proporción de acetato de etilo-ciclohexano 2:1 con ciclohexano adicional y se pasó a través de un cartucho de carbón activado impregnado, tal como Zeta Pad R51 SP o R53SP para reducir la cantidad de Pd residual. Se añadió trietilamina (1 %) al filtrado orgánico y la solución se purifica mediante una filtración breve en gel de sílice con acetato de etilo-ciclohexano 2:1 que contenía un 1 % de trietilamina. El eluyente rico se recogió y se concentró a <37 °C hasta una concentración final de 11-14 µg. Se añade ciclohexano adicional y la suspensión se calentó a 67-78 °C durante 45-60 minutos. La suspensión se enfría lentamente hasta aproximadamente 21 °C, se filtra y el sólido cristalino se lava con acetato de etilo-ciclohexano 1:1. La torta húmeda se seca a vacío a <45 °C para producir el análogo de lactama cristalina de la epotilona B con un rendimiento de aproximadamente el 56 % M.

Ejemplo 10 (Ejemplo de referencia)

Formación de un derivado de epotilona amino sustituido (Derivado 1) a partir de la epotilona B

- 35 La epotilona B se convierte en epotilona F por hidroxilación enzimática del grupo 2-metilo en el anillo de tiazol de la epotilona B. La conversión se consigue por la acción de una cepa de actinomicetos en la epotilona B. Las cepas de actinomicetos para uso en esta etapa se divulgan en la solicitud de patente US-10/321.188, presentada el 17 de diciembre de 2002 y el documento WO 00/39276.

- 40 Se añade la epotilona B en etanol (5 % v/v) al microorganismo, el cual se cultiva en un medio adecuado a 16-18 °C y el pH se mantiene entre 6,9 y 7,1, ya sea con hidróxido sódico 50 % p/v o ácido sulfúrico 30 % p/v. La bioconversión se continúa hasta que la concentración de la epotilona B se reduce al 3-5 % de su valor inicial. Una resina, tal como XAD-16 capaz de adsorber a epotilona F SP207 se añade al tanque de fermentación (5 % v/v) y se agita durante 16-72 horas a 10-18 °C. El caldo de fermentación se decanta y la resina se lava con agua (relación agua-resina 2:1). El lavado se repitió dos veces más. La mayor parte del agua residual se elimina por filtración en un embudo Buchner.

- 45 La resina XAD-16 resina, con epotilona F pre-adsorbida, se pone en suspensión con agua y se carga en una columna. Las columnas de resina se extraen con acetato de etilo y el material eluido rico se recoge. La capa acuosa se extrae y la fracción rica en acetato de etilo se lava a continuación con una solución de bicarbonato sódico al 5 % y agua para eliminar el color. La fracción orgánica rica se concentra a presión reducida, a continuación, se pasa a través de un filtro pre-revestido con sílice, seguido por una filtración por pulido 10 mM. El producto se destiló a continuación a vacío y la epotilona F primaria se cristalizó por adición de tolueno con agitación como un anti-disolvente. La mezcla rica en tolueno se concentra adicionalmente para reducir el contenido de acetato de etilo y se añade más tolueno. La suspensión cristalina se filtra y se lava con tolueno

- 50 La epotilona F se disuelve en cloruro de metileno o en una mezcla de cloruro de metileno/acetato de etilo, a continuación se carga en una columna cromatográfica rellena de sílice de grado HPLC equilibrada con una mezcla de acetato de etilo:n-heptano 60-80:40-20 (v/v).

- 55 El producto se eluyó de la columna, ya sea con un gradiente isocrático o gradual de una mezcla 60-80:40-20 de acetato de etilo: n-heptano (v/v), seguido de una mezcla 60-80:40-20 acetato de etilo:n-heptano (v/v). La muestra y el procedimiento se controla mediante detección UV a 290 nm. El pico del producto epotilona F se fracciona para reducir al mínimo las impurezas eluyentes. Las fracciones reunidas ricas se destilan al vacío hasta una

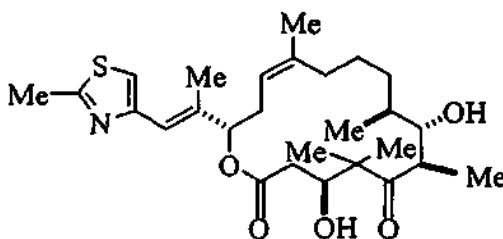
concentración objetivo de aproximadamente 100 g/l. A la suspensión de epotilona F, se añade con agitación un volumen igual de n-heptano. El lote se redestila al vacío hasta una concentración objetivo de aproximadamente 100 g/l, se añade acetato de etilo y la suspensión se mantiene a 40 °C. El lote se enfría a 2-10° C y se mantiene durante al menos 5 horas a esa temperatura para cristalizar el producto de la solución. La suspensión resultante se filtra y se lava con una solución fría 1:1 de acetato de etilo/n-heptano. La torta de epotilona F final se seca al vacío a 35-40 °C.

Se añade lentamente 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU, 1,8 eq) a una suspensión de epotilona F y difenilfosforilazida (1,5 eq) en tetrahidrofurano (previamente secado sobre 3A MS) y la reacción se agitó a 15-25 °C durante 12-24 horas. Se añade lentamente a la mezcla de reacción una solución de trimetilfosfina/tetrahidrofurano (1,0 M, 1,1 eq). Se añaden agua e hidróxido de amonio y la mezcla se agita durante 30 minutos adicionales. La mezcla de reacción se diluye con agua y la fase acuosa se extrae con tres porciones de diclorometano. La fase orgánica se lava a continuación con soluciones de hidróxido amónico diluido y cloruro sódico semisaturado y se evaporó a sequedad para dar el derivado de amino crudo (Derivado 1) funcionalizado en el grupo metil tiazol.

El producto bruto se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice pre-tratado con metanol 2,5 %-triethylamina 0,2 %-diclorometano. Las fracciones de calidad adecuada se combinan, se microfiltran y se evaporan hasta sequedad para dar el Derivado 1 cromatografiado 1. Este material se añade al acetato de etilo y la suspensión resultante se calienta a 72-75 °C para obtener una solución. Se añade lentamente antidisolvente n-heptano y la mezcla se deja enfriar lentamente en la presencia de semillas con agitación a 15-25 °C. Después de enfriar y de mantenimiento a ~ 5 °C, el sólido resultante se aisló por filtración seguida de secado al vacío para dar el derivado amino cristalino purificado (derivado 1) con un promedio de rendimiento de aproximadamente el 70 %M de epotilona F.

Ejemplo 11 (Ejemplo de referencia)

Preparación de Epotilona D (Derivado 3) a partir de la epotilona B [0130]



[4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,15R*(E)]]-4,8-Dihidroxi-5,5,7,9,13-pentametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil-1-oxa-1 3(Z)-ciclohexadecen-2,6-diona [Epotilona D, Derivado 3].

A THF anhidro (5 ml) a -78 °C en atmósfera de argón se añadió WCl_6 (198 mg, 0,5 mmol) seguido por nBuLi (0,625 ml de una solución 1,6 M en hexanos, 1,0 mmol). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante un período de 20 minutos. Se extrajo una alícuota (0,50 ml, 0,05 mmol) del reactivo de tungsteno y se añadió a la epotilona B (9,0 mg, 0,018 mmol) en atmósfera de argón y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos, y a continuación se neutralizó mediante la adición de NaHCO_3 (1 ml). La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 x 1 ml), los extractos combinados se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y los compuestos volátiles se eliminaron al vacío. El residuo se cromatografió con EtOAc 35 %/hexanos para dar el compuesto del título (7,0 mg, 0,014 mmol). EM m/z : 492,3 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Sorangium cellulosum* depositada como ATCC N° PTA-3880.
2. Una cepa de *Sorangium cellulosum* depositada como ATCC N° PTA-3881.

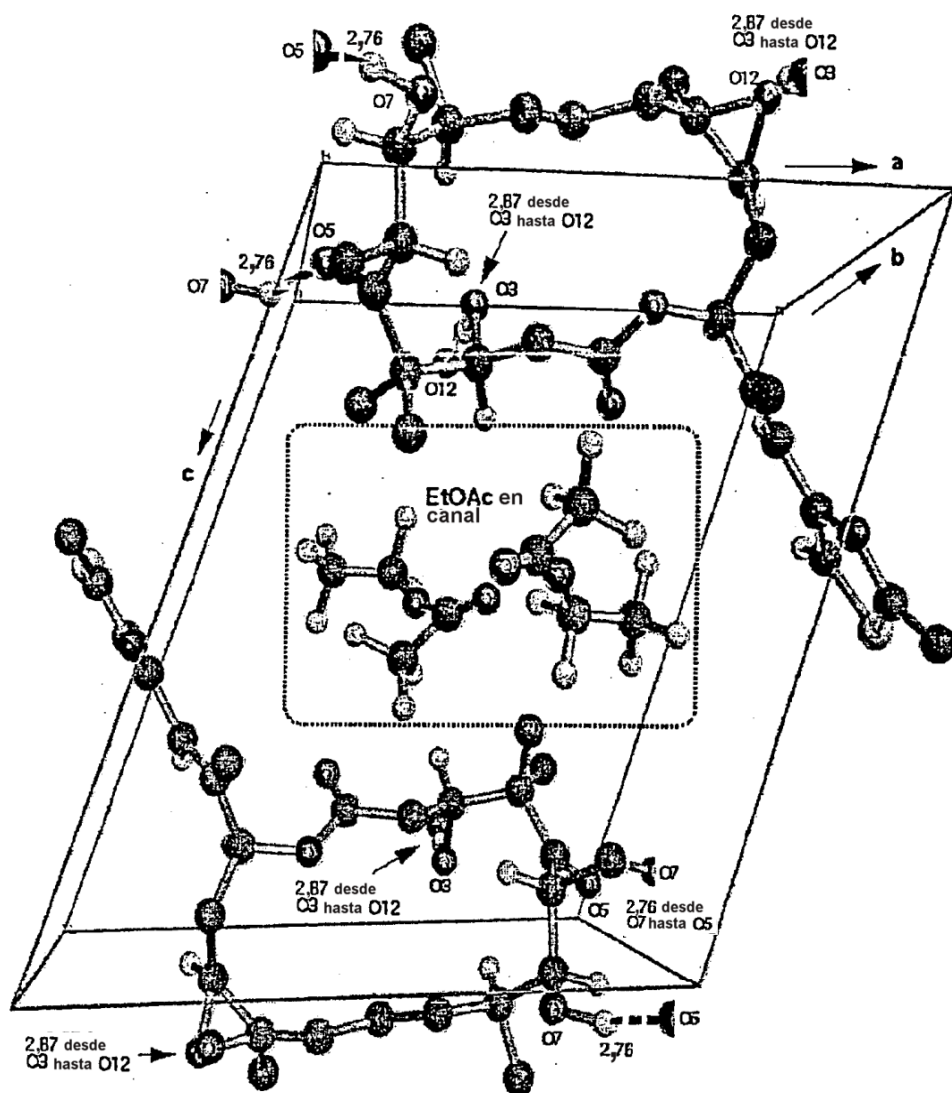


Figura 1

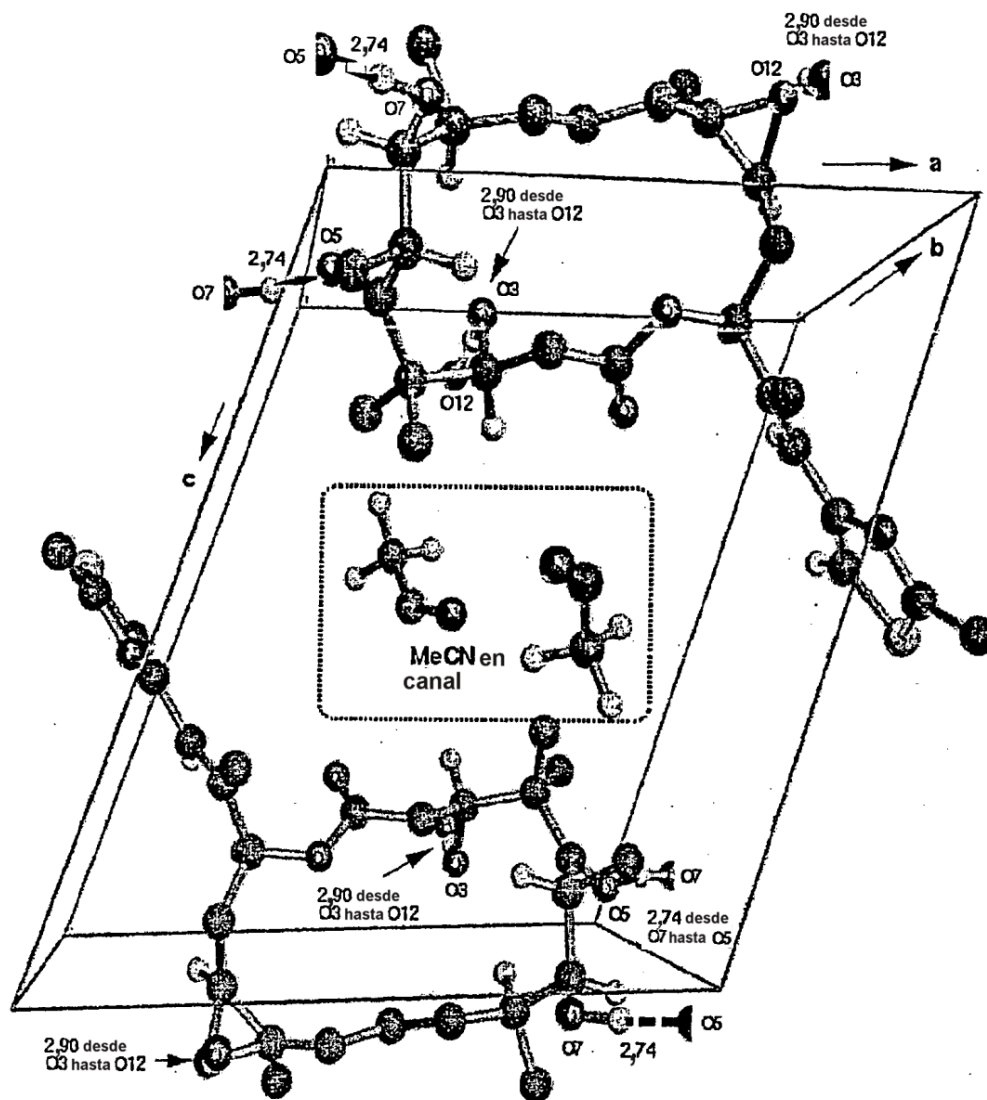


Figura 2

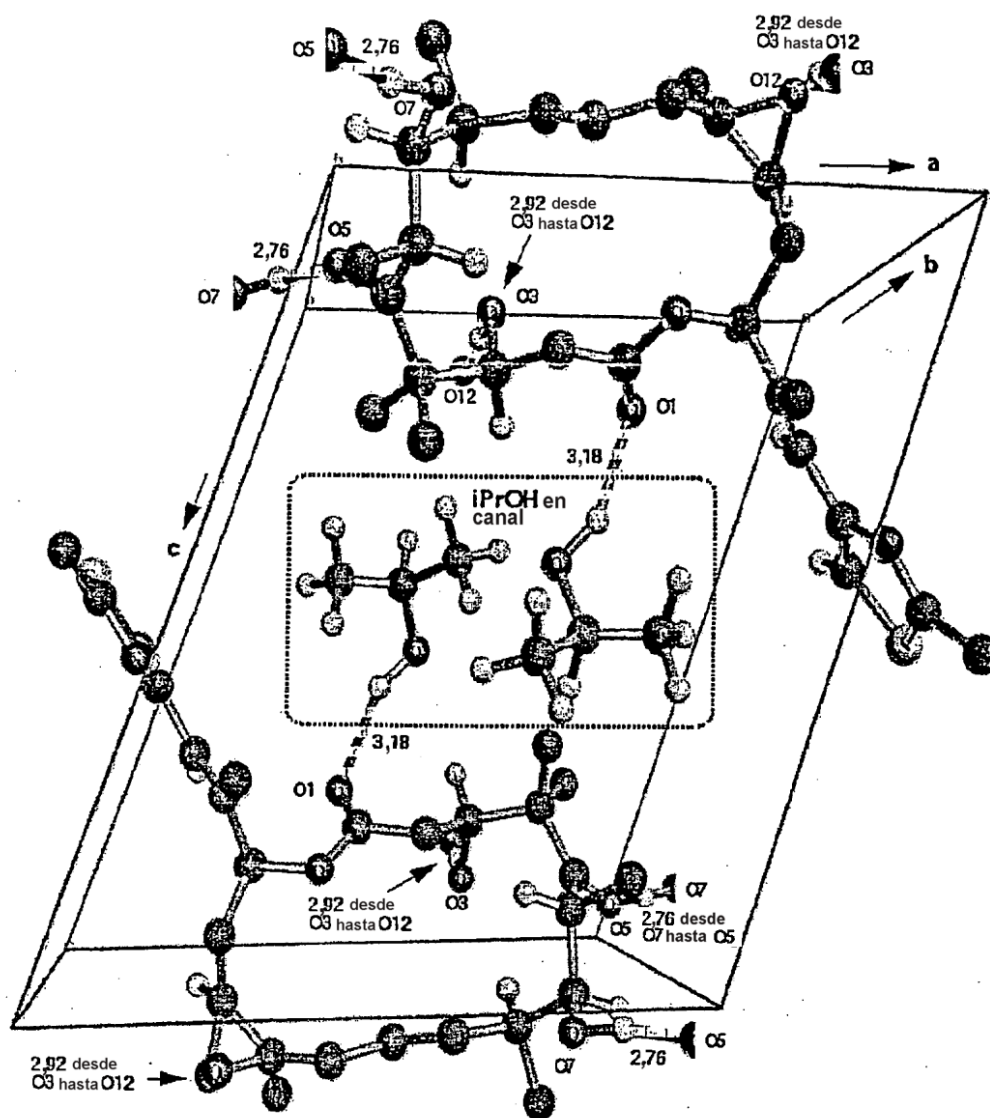


Figura 3

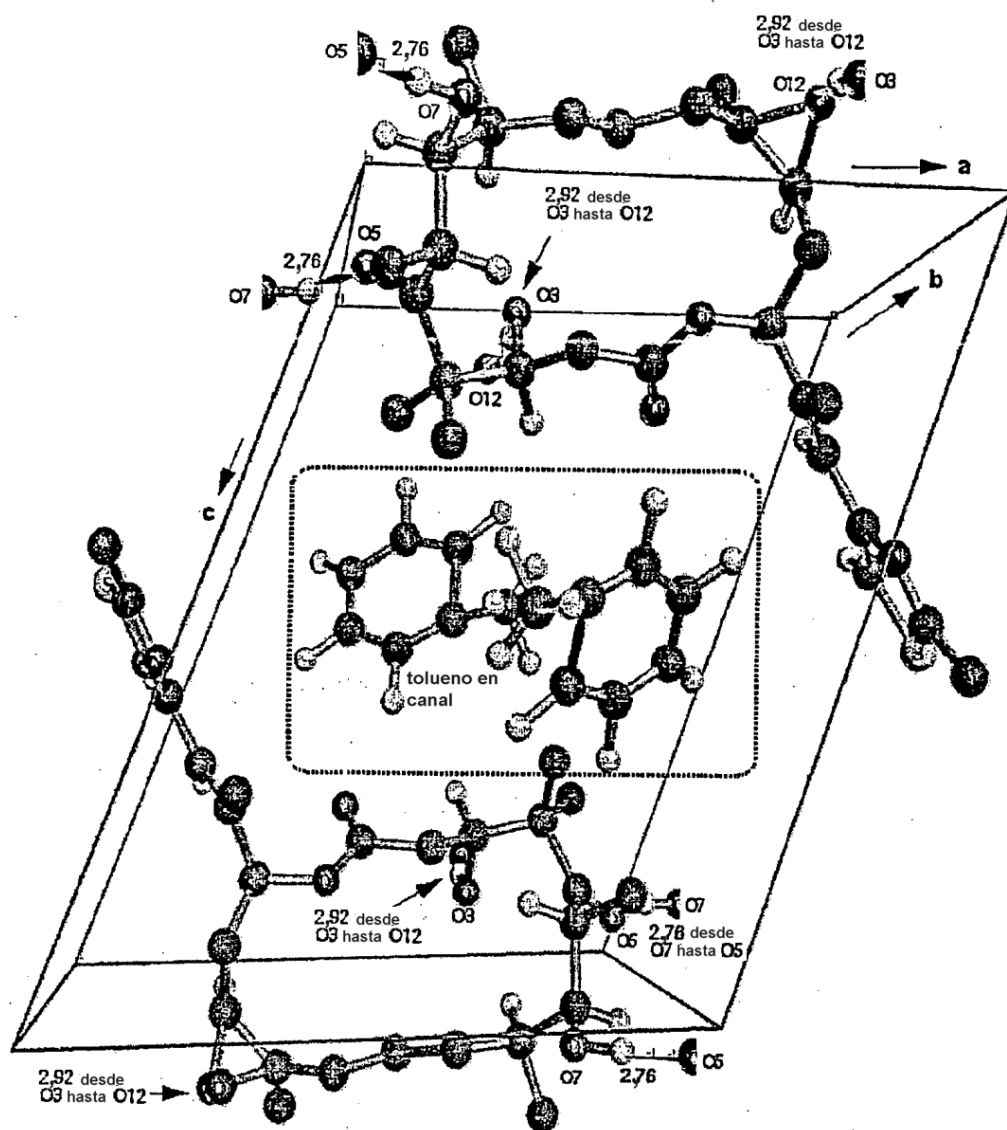


Figura 4

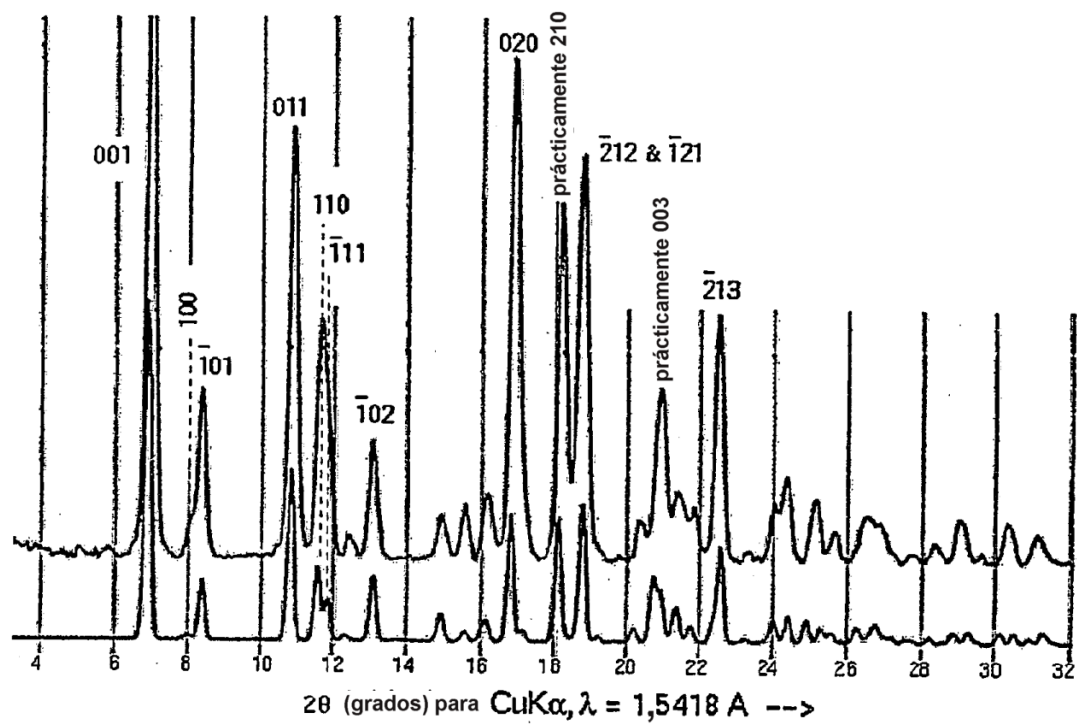


Figura 5

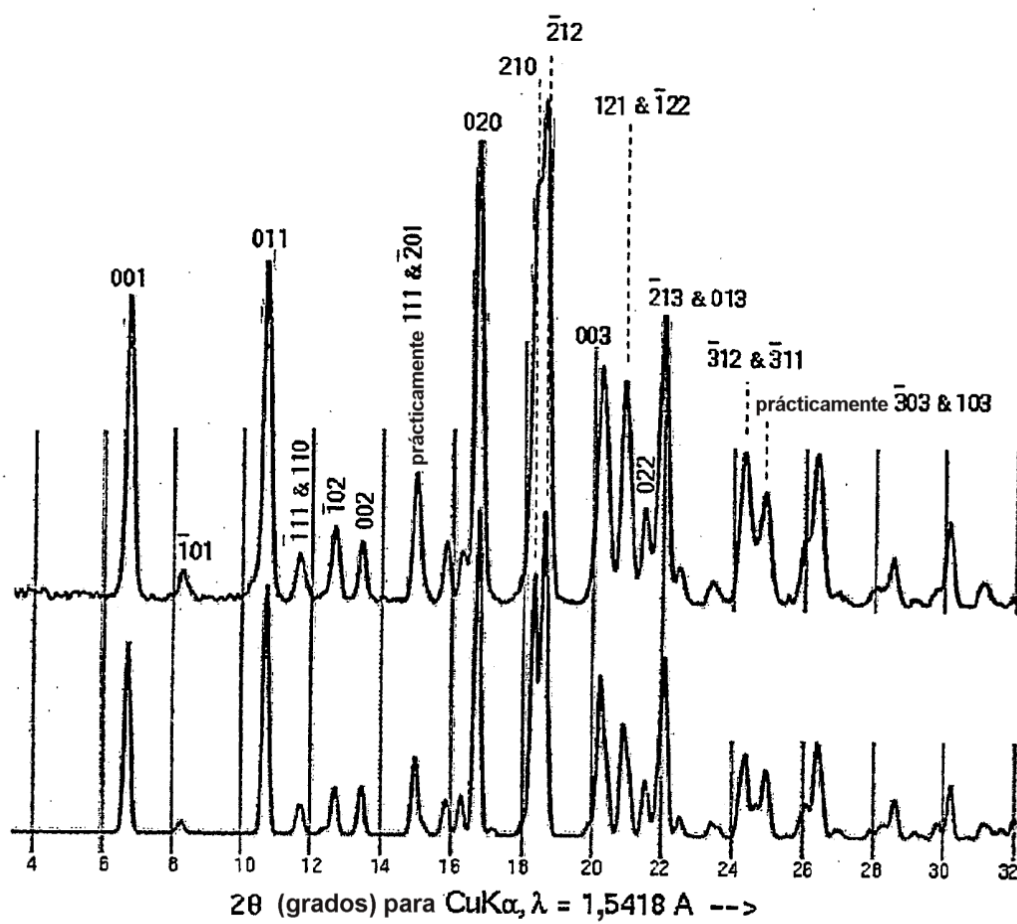


Figura 6

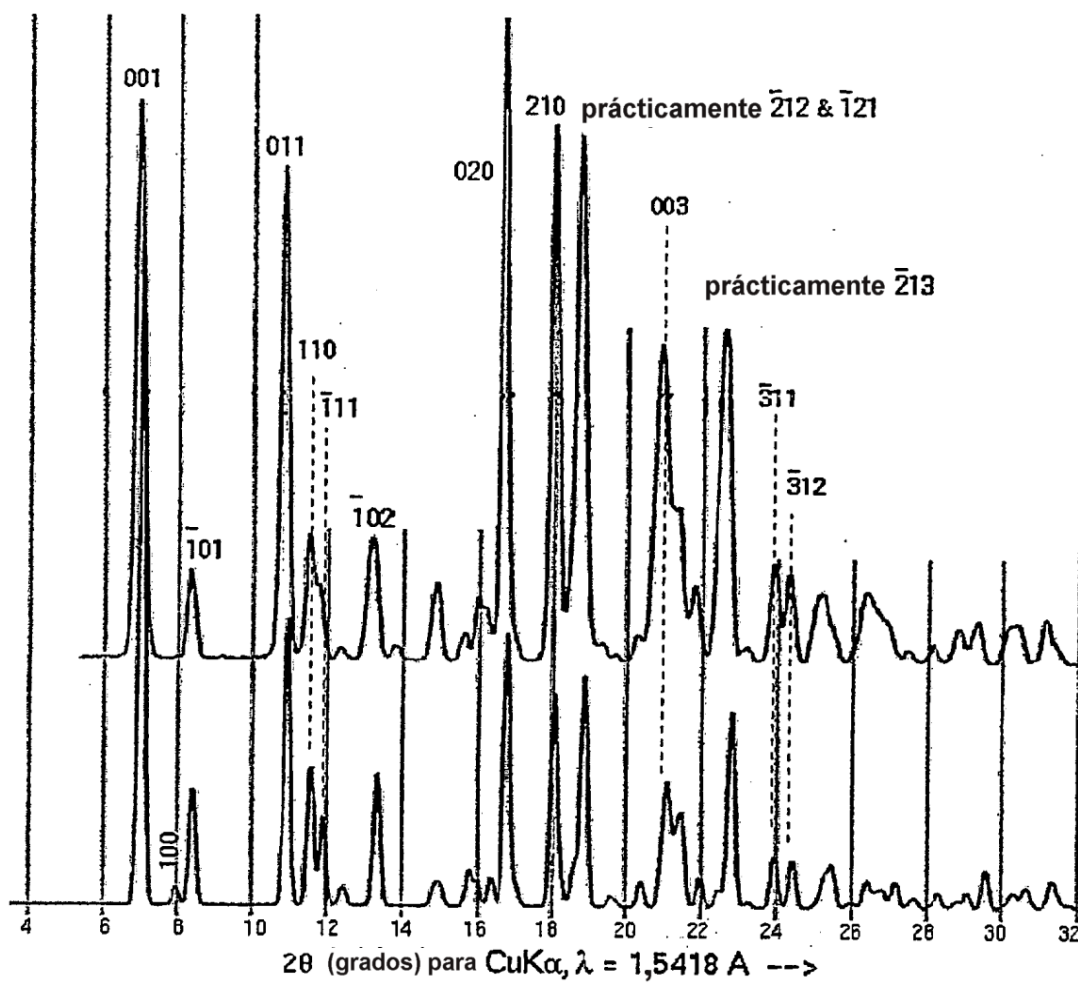


Figura 7

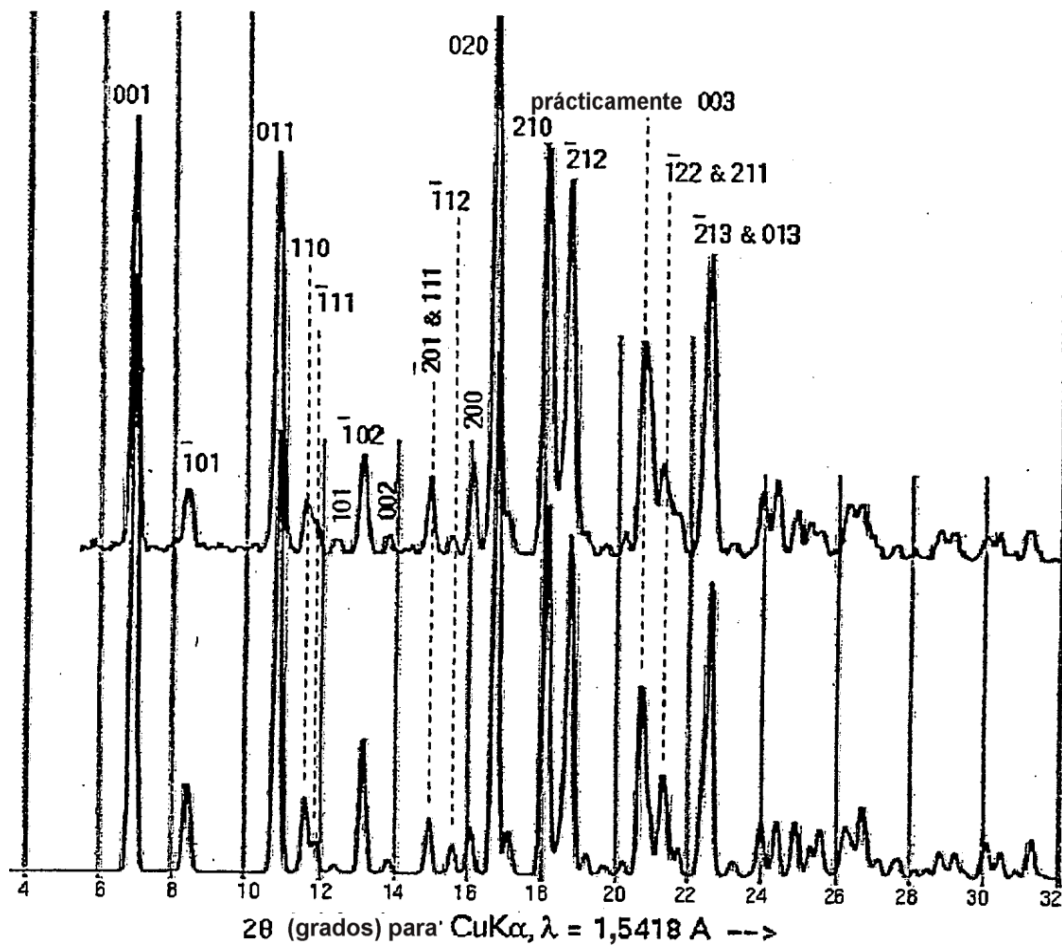


Figura 8

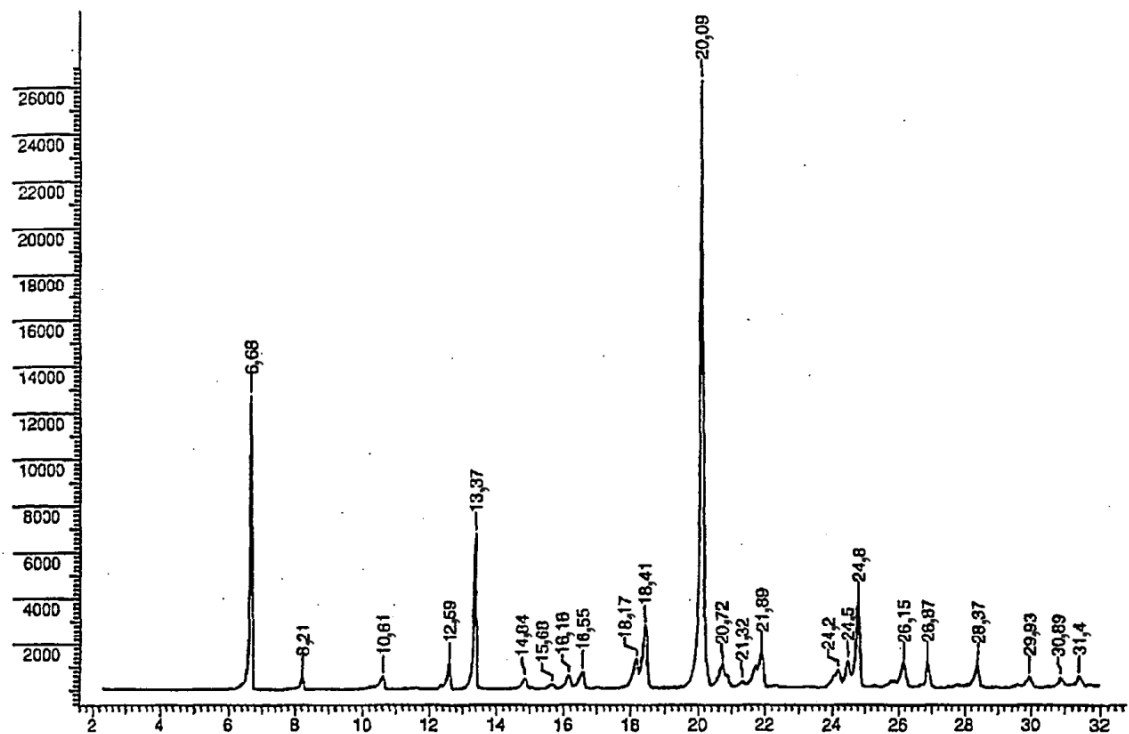


Figura 9

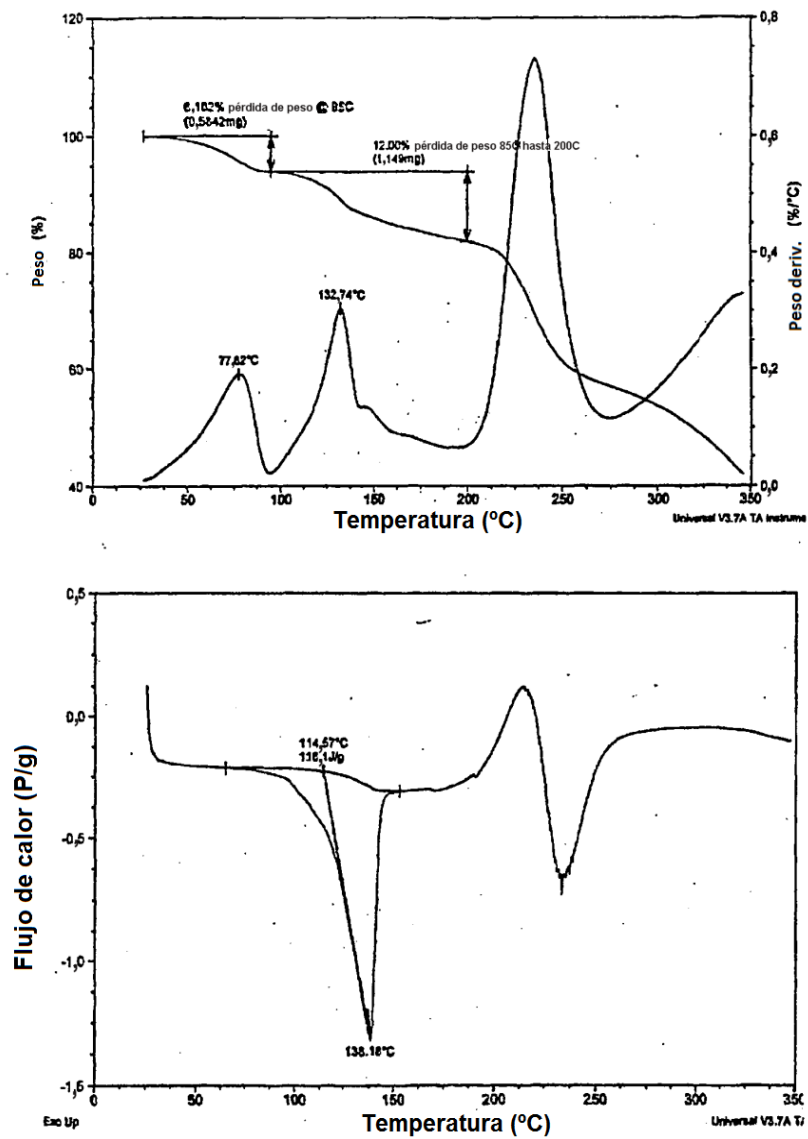


Figura 10

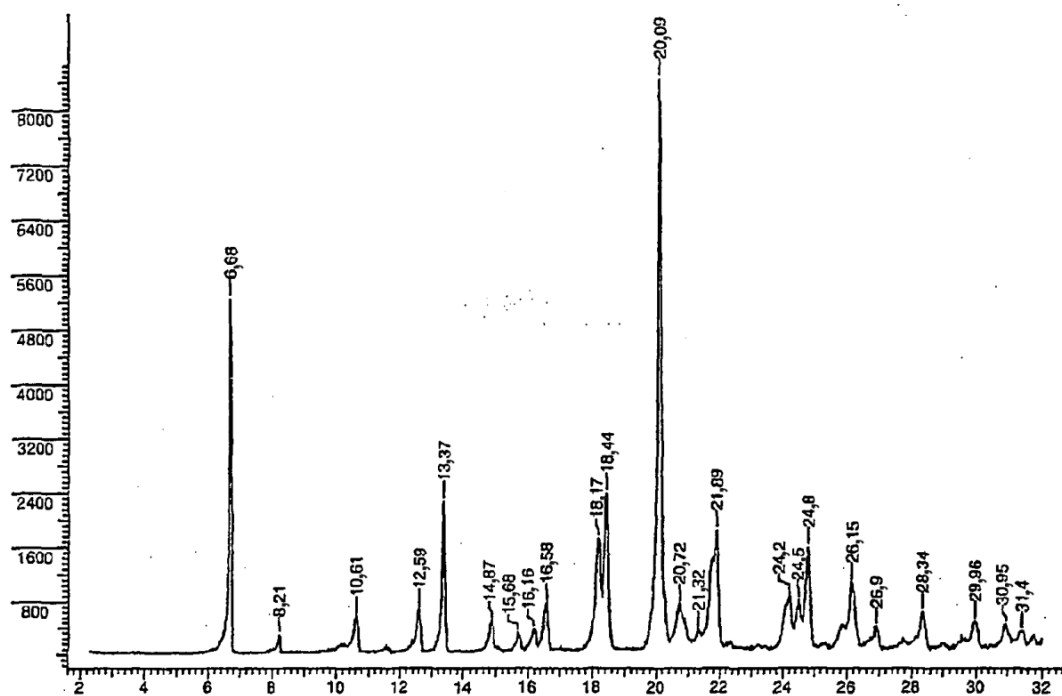


Figura 11

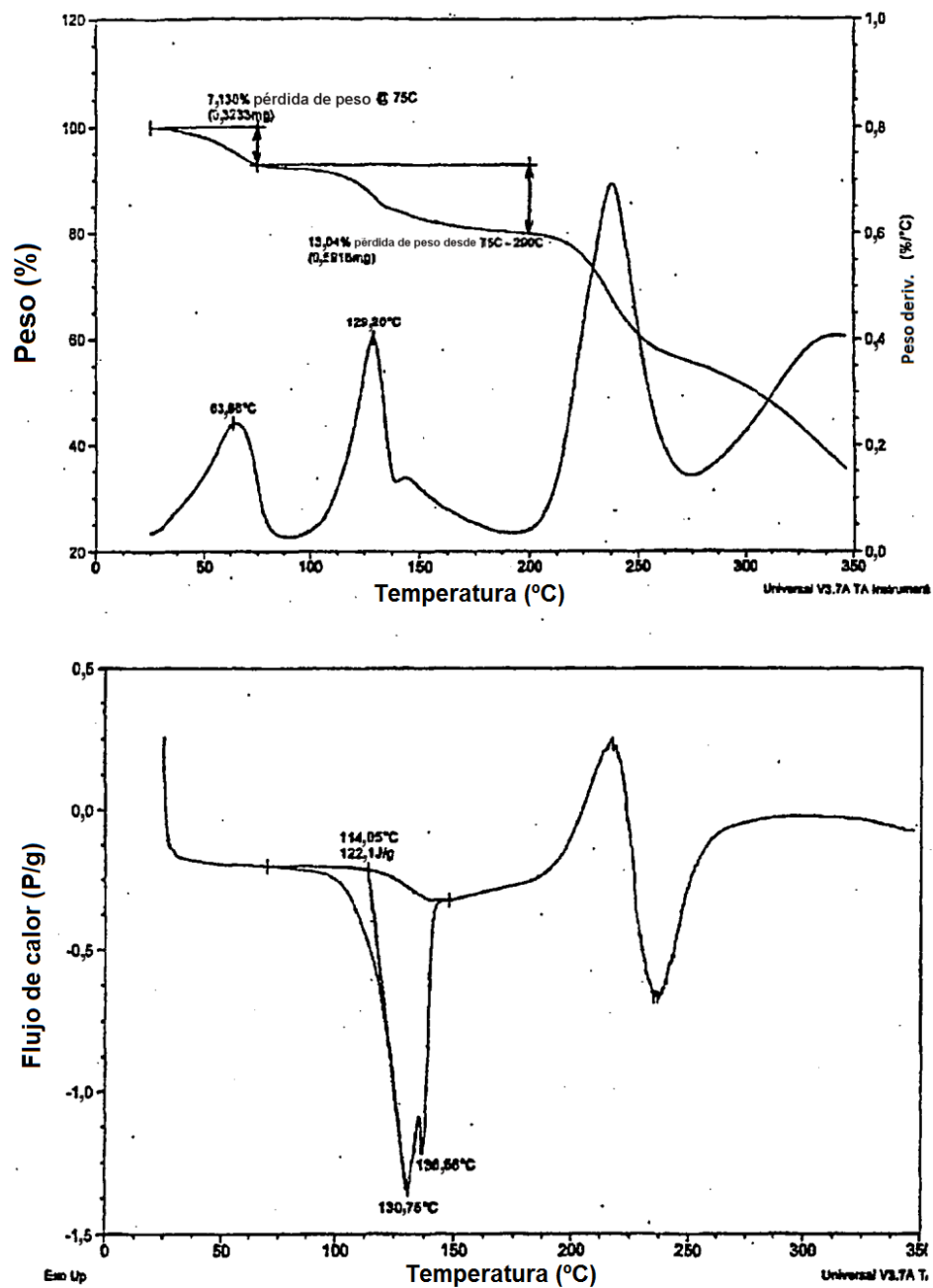


Figura 12

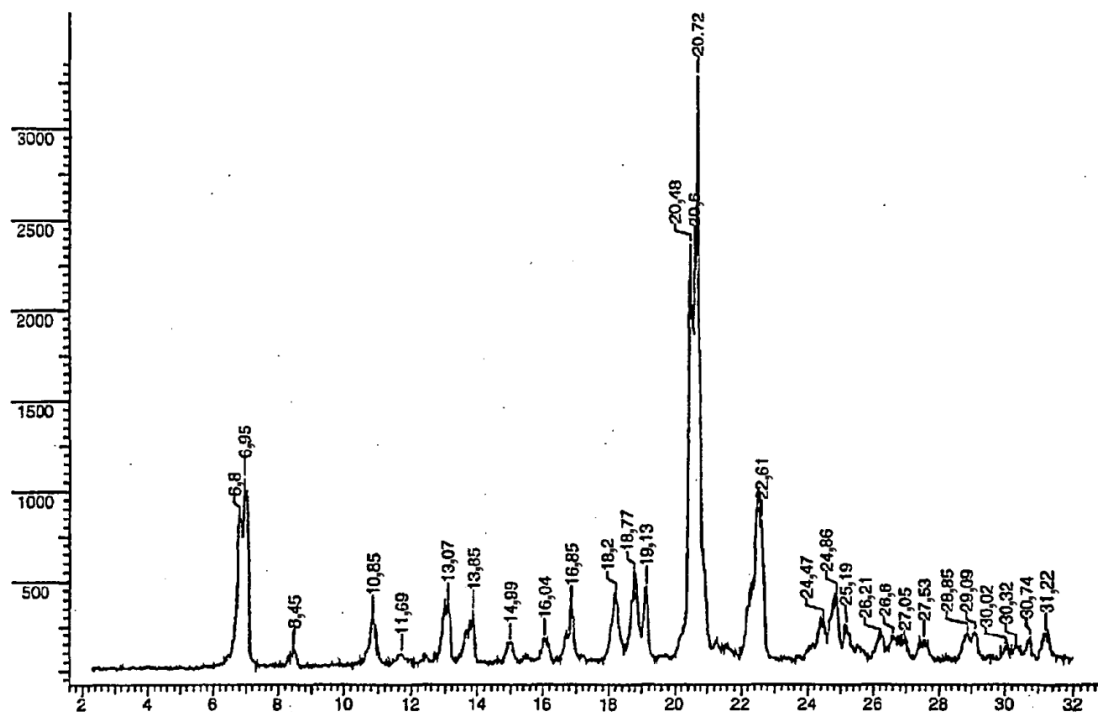


Figura 13

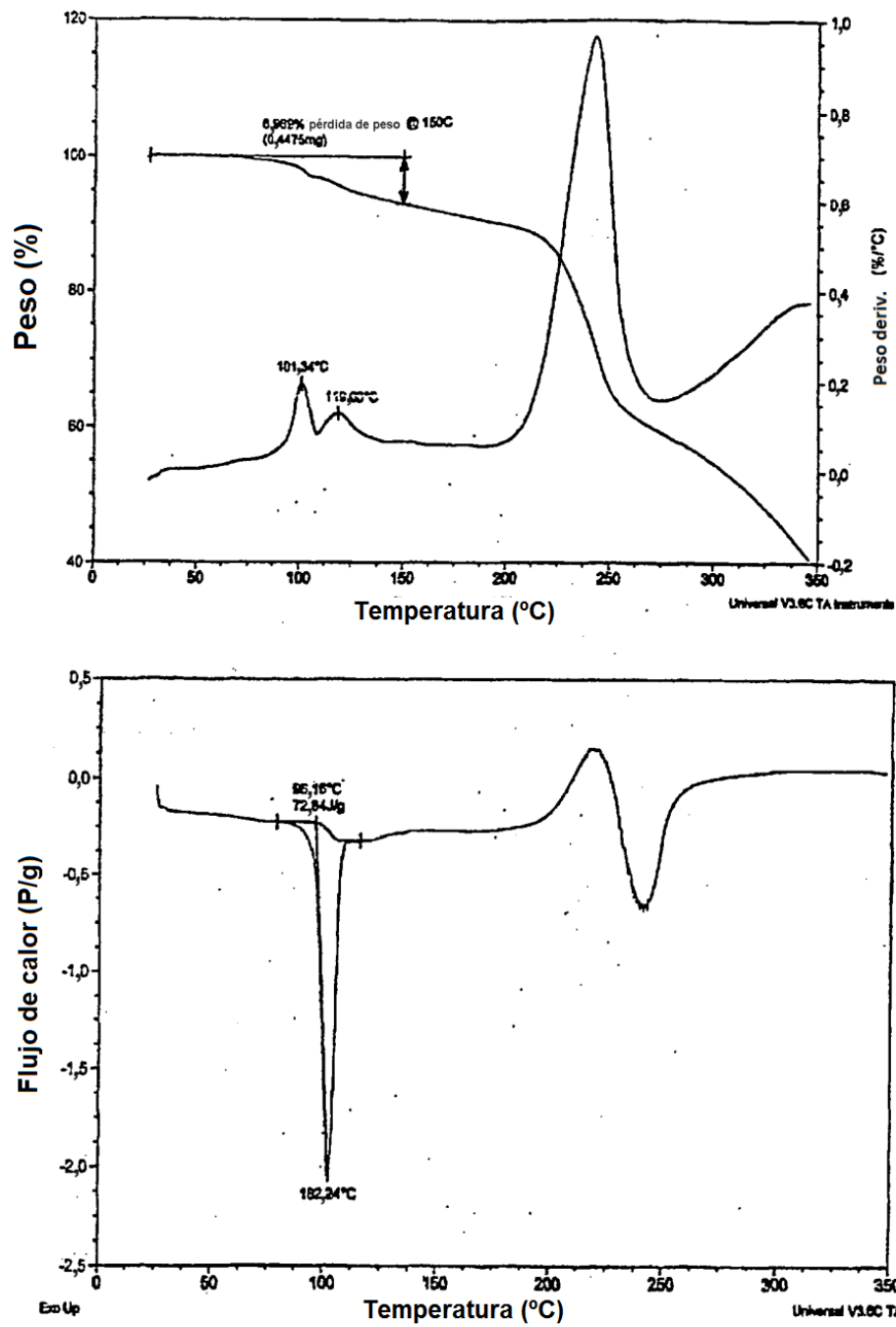


Figura 14

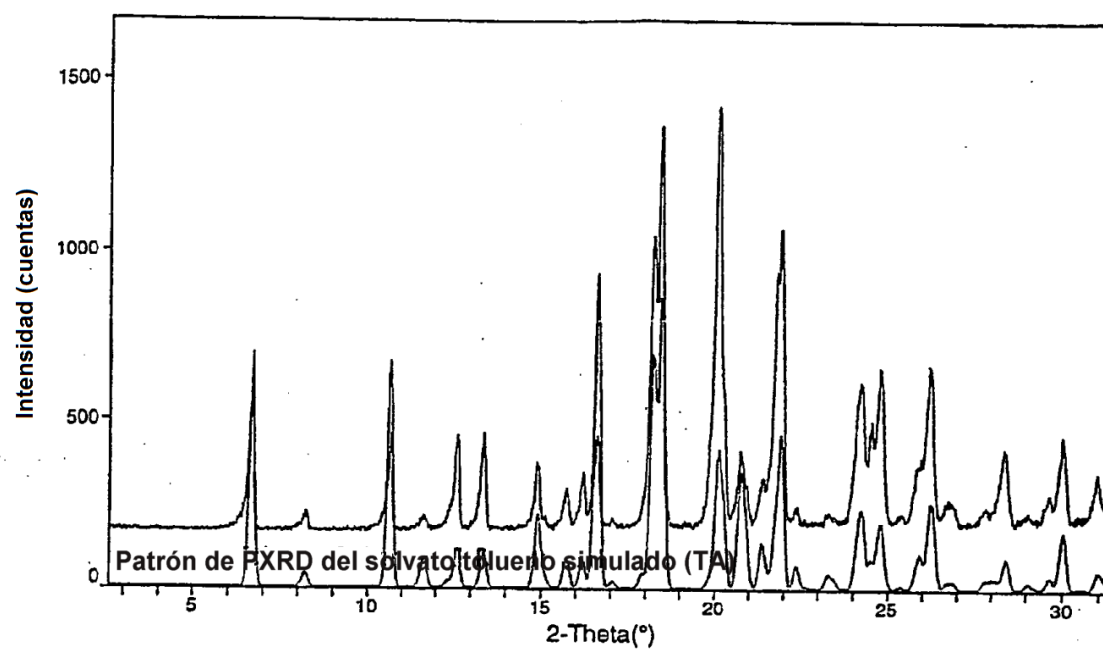


Figura 15

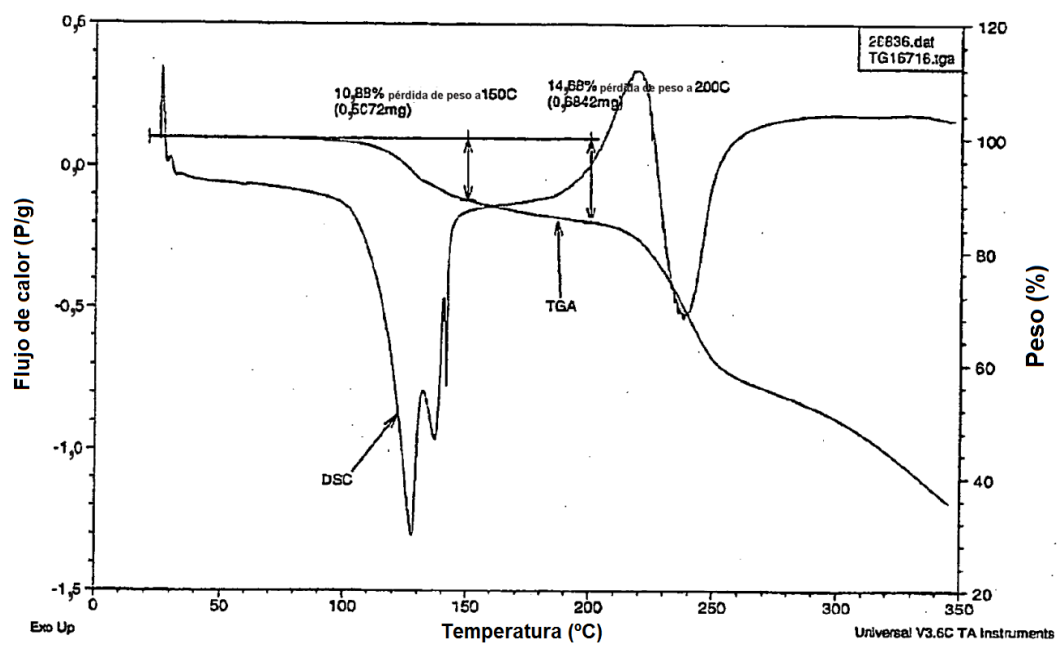


Figura 16