

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 323**

51 Int. Cl.:

C07D 498/18 (2006.01)

C07D 498/22 (2006.01)

A61K 31/424 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2006 E 06764120 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1904505**

54 Título: **Compuestos biológicamente activos obtenibles a partir de Sorangium cellulosum**

30 Prioridad:

15.07.2005 EP 05106539

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

26.11.2013

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR
INFEKTIONSFORSCHUNG GMBH (100.0%)
INHOFFENSTRASSE 7
38124 BRAUNSCHWEIG, DE**

72 Inventor/es:

**IRSCHIK, HERBERT;
JANSEN, ROLF y
SASSE, FLORENZ**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 431 323 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

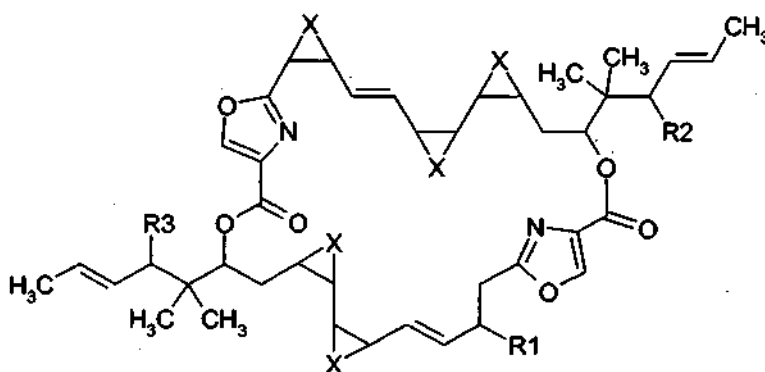
Compuestos biológicamente activos obtenibles a partir de *Sorangium cellulosum*

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo grupo de compuestos que tienen propiedades antibióticas, antifúngicas y/o citostáticas, que son obtenibles a partir de mixobacterias, especialmente del género *Sorangium*, preferiblemente de *Sorangium cellulosum*. Los compuestos se denominan actualmente Disorazol Z y Disorazol Z-epóxido, respectivamente, con una configuración específica de enlaces insaturados con su estructura de núcleo cíclico.
- 10 Se sabe que las mixobacterias producen una gran variedad de compuestos biológicamente activos, que también se denominan metabolitos secundarios. De entre estos metabolitos secundarios, el grupo de los Disorazoles ha atraído la atención como inhibidores de la polimerización de la tubulina, para la inducción de la apoptosis y para la detención del ciclo celular o la inhibición de la proliferación celular, incluso a bajas concentraciones.
- 15 Aunque los compuestos de la presente invención pueden aislarse a partir de cepas productoras del género *Sorangium*, tienen una estructura de esqueleto sustancialmente diferente de los Disorazoles o los Chivosazoles conocidos.

Estado de la técnica

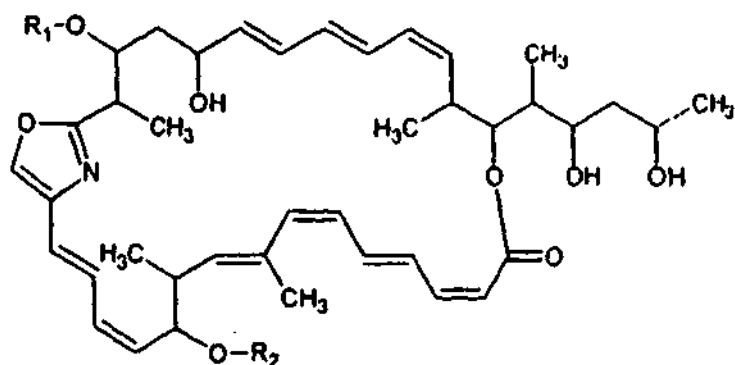
- 20 Los metabolitos secundarios aislados a partir de mixobacterias del género *Sorangium*, que se han denominado Disorazoles, pueden encontrarse en Jansen y col., Liebigs Ann. Chem. 1994, 759 - 773. Una fórmula estructural representativa de los Disorazoles, denominada Disorazol A1 hasta A7, dependiendo de sus sustituyentes, se proporciona a continuación:

25



- Los Disorazoles comprenden un grupo heterogéneo que incluye dos oxazoles en un anillo macrólido. En general, los Disorazoles tienen un esqueleto con una estructura circular simétrica, que puede subdividirse en dos mitades conectadas por grupos éster, formando un anillo macrólido que comprende un total de 34 átomos, parte del cual porta grupos sustituyentes adicionales. Adyacente a uno de estos grupos éster, cada una de estas mitades de moléculas comprende un anillo de oxazol y una cadena de 10 ó 12 átomos de carbono, seguido de un grupo éster que forma la conexión con la otra mitad de la molécula. La cadena de 10 a 12 átomos de carbono muestra un amplio intervalo de variaciones con respecto a la disposición y el número de los dobles enlaces y de los sustituyentes adicionales, por ejemplo, grupos epoxi, grupos hidroxilo y sustituyentes adicionales de grupos alquilo saturados o parcialmente insaturados.

- Otro grupo de metabolitos secundarios obtenibles a partir de las mixobacterias, especialmente de *Sorangium cellulosum*, se denominan Chivosazoles, cuya estructura de esqueleto se proporciona a continuación, según identificaron Jansen y col. (Liebigs Ann./Recueil 1997, 1725 - 1732 (1997)). En general, los Chivosazoles pueden describirse como glucósidos de derivados de 6-desoxiglucopiranososa de un aglicón que incluye un oxazol en su anillo macrólido de 31 miembros. El propio aglicón se denomina Chivosazol F, mostrando actividades antibióticas y citotóxicas:



Arriba: aglicón de Chivosazol (F), en el que R₁ es H o -CH₃. Los sustituyentes de R₂ se denominan derivados de chinovosilo.

5

Objetivos de la invención

En vista de los metabolitos secundarios conocidos obtenibles a partir de mixobacterias del género *Sorangium*, es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevos compuestos que tienen actividades biológicas, por ejemplo, propiedades antifúngicas, antibióticas y/o citotóxicas.

10

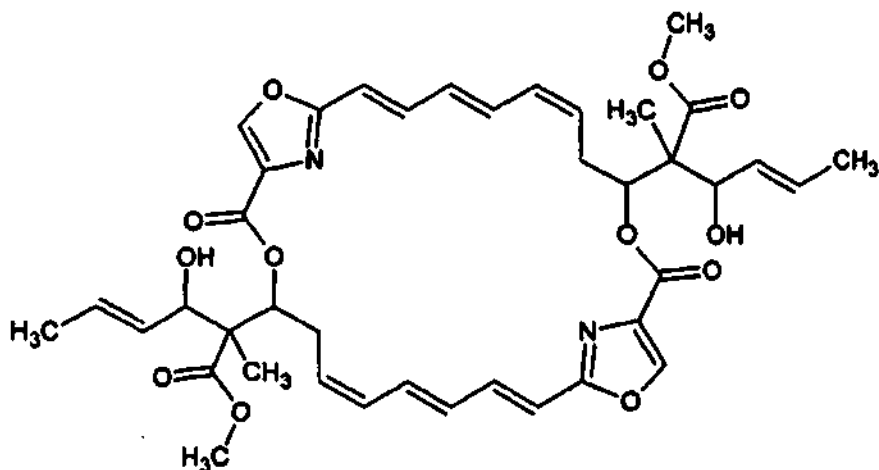
Descripción general de la invención

Con el fin de conseguir los objetivos mencionados anteriormente, la presente invención proporciona los compuestos Disorazol Z y Dizorazola Z. epóxido con actividad biológica, su uso para fines médicos y composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos. Además, la presente invención proporciona un proceso para la producción de los compuestos mediante la fermentación de microorganismos.

15

Este compuesto se denomina actualmente Disorazol Z:

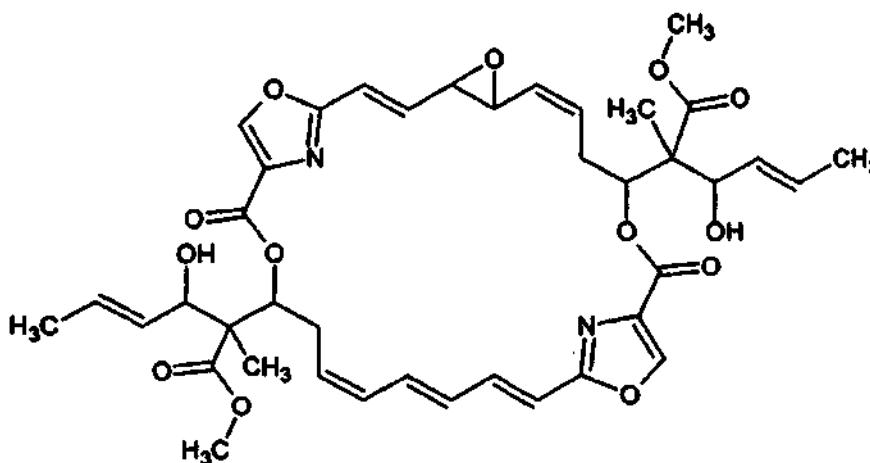
20



IX

Para el Disorazol Z-epóxido, se determinó una fórmula molecular de C₄₀H₄₆N₂O₁₃ dando un peso de fórmula de 762,79884 y una masa monoisotópica de 762,29999 Da, a partir de lo cual se dedujo la estructura según la fórmula X:

25



X.

En los nuevos compuestos según las anteriores fórmulas XI y X, los átomos de carbono asimétricos pueden estar presentes cada uno en la configuración R o S, en la configuración sintetizada por una cepa productora del género *Sorangium*. Sin embargo, una persona experta en la técnica es capaz de determinar la configuración que está presente en el producto biosintético de *Sorangium*, y determinar adicionalmente las actividades biológicas de cada estereoisómero.

Para la producción del nuevo compuesto puede emplearse una síntesis química según procedimientos estándar conocidos por la persona experta en la técnica y, preferiblemente, se lleva a cabo una fermentación de una cepa de mixobacteria, preferiblemente del género *Sorangium*, que es una cepa productora del compuesto, seguida de unos procedimientos de aislamiento y purificación.

Los compuestos según la presente invención son adecuados para su uso médico, es decir, como componentes de preparaciones farmacéuticas, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, por ejemplo, artritis, o como fármacos o pro-fármacos eficaces frente a células tumorales.

Aparte de proporcionar una nueva estructura cíclica de núcleo como base para los compuestos biológicamente activos, una de las ventajas de los compuestos según la presente invención, por ejemplo, sobre los Disorazoles conocidos, es su estabilidad mejorada a largo plazo, por ejemplo, en preparaciones sólidas o en formulaciones líquidas.

Con respecto al grupo epoxi asimétrico contenido en el Disorazol Z-epóxido, el grupo epoxi reactivo puede usarse ventajosamente tanto para derivatizaciones adicionales del compuesto como para proporcionar una actividad biológica diferente y/o mejorada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe ahora con mayor detalle mediante referencia a las figuras, en las que

- la Figura 1 muestra el transcurso de la saturación de oxígeno, el pH y la velocidad de agitación de una fermentación típica de *Sorangium cellulosum*, y
- las Figuras 2A hasta H muestran los resultados del análisis para el Disorazol Z obtenidos mediante cromatografía HPLC-EM HPLC, espectrometría de UV y espectrometría de masas, respectivamente, para un extracto procedente de una fermentación de *Sorangium cellulosum*, a saber, en detalle

- en la Figura 2 A, el cromatograma de la corriente iónica total (TIC) 200 - 1000 Da,
- en la Figura 2 B, el cromatograma DAD-UV en el intervalo de 200 - 400 nm,
- en la Figura 2 C, el cromatograma de la corriente iónica positiva extraída (XIC) ajustado al ión M+H del Disorazol Z y los isómeros Z (746,9 - 747,4 Da),
- en la Figura 2, el cromatograma de la corriente iónica negativa extraída (XIC) ajustado al ión M-H+AcOH del Disorazol Z y los isómeros Z (804,8 - 805,3 Da),
- en la Figura 2 E, el cromatograma de la corriente iónica negativa extraída (XIC) ajustado al ión del fragmento m/z = 675 del Disorazol Z y los isómeros Z (674,7 - 675,2 Da),
- en las Figuras 2 F y G, los espectros de UV de un isómero Z y del Disorazol Z,
- en las Figuras 2 H e I, los espectros de EM (ES1, modo positivo) de un isómero Z y del Disorazol Z, con m/z 747 como el ión molecular $[M + H]^+$, m/z 764 = 746 + 18 como el ión $[M + NH_4]^+$, y m/z 769 = 746 + 23 como el ión $[M + Na]^+$,
- en las Figuras 2 J y K, los espectros de EM (ESI, modo negativo) de un isómero Z y del Disorazol Z, con m/z 805 = 746 + 59 como el agregado de iones moleculares $[M^+AcO]^-$, y un fragmento a m/z 675 = 746 - H - 70

ES 2 431 323 T3

(= C₄H₆O) = C₃₆H₃₉N₂O₁₁ como el ión [M-H-cadena lateral].

En los ejemplos, los porcentajes son de peso por volumen, salvo que se especifique de otro modo.

5 Ejemplo 1: Disorazol Z

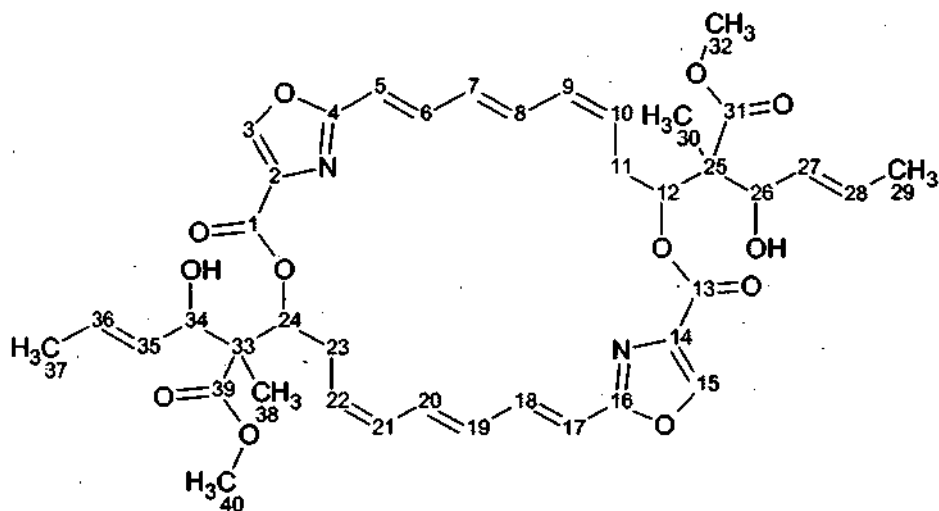
10 Como ejemplo de los nuevos compuestos que comprenden la estructura cíclica de núcleo de 25 miembros se analiza el Disorazol Z, portando sustituyentes idénticos en los átomos de carbono C13 y C13', átomos de carbono que se numeran como 25 y 33 en la siguiente fórmula IX', respectivamente. A partir de la RMN en acetona-D6 (600/150 MHz, acetona a 2,05/29,80 ppm), se obtuvieron los datos de la tabla 1.

Tabla 1: datos de la RMN del Disorazol Z en acetona-D6:

	M	J	C	δ_c	m
-	-	-	1,13	162,35	s
-	-	-	2,14	135,72	s
8,53	S	-	3,15	145,05	d
-	-	-	4,16	159,65	s
6,19	D	15,5	5,17	116,49	d
6,81	M	*)	6,18	137,66	d
6,16	Dd	11,1,14,9	7,19	131,81	d
6,78	Dd	11,5,14,9	8,20	134,99	d
6,11	T	11,1	9,21	132,78	d
5,69	M	-	10,22	131,08	d
2,69 (H _a) 2,66 (H _b)	m m	--	11,23	30,24	t
5,45	Dd	2,1,9,2	12,24	76,16	d
-	-	-	25,33	56,13	s
4,44	T	6,2	26,34	75,53	d
5,65	M	-	27,35	131,57	d
5,74	Dq	15,4,6,2	28,36	128,72	d
1,70	Dd	1,1,6,4	29,37	17,93	q
1,36	S	-	30,38	13,53	q
-	-	-	31,39	173,81	s
3,61	S	-	32,40	51,85	q
4,16	D	4,9	26/34-OH	-	-

*) señal ancha, solapante con 8-H; en CDCl₃: 7-H: 6,74 (dd (a), 11,6, 15,2 Hz), 8-H: 6,59 (dd, 11,8, 14,4 Hz)

A partir de los datos analíticos se deduce la siguiente fórmula estructural para el Disorazol Z, en la que las cifras denotan los átomos de carbono, salvo que se especifique de otro modo:



IX'

5 Para el Disorazol Z se ha determinado una fórmula de $C_{40}H_{46}N_2O_{12}$ a una $M = 746,80$, calculada como 746,30507 Da, determinada en 746,3037 Da en FAB-EM (usando una matriz de 3-NBA).

10 Ejemplo 2: actividades biológicas del Disorazol Z

Como ejemplo de los compuestos según la invención, se ha analizado el Disorazol Z para comprobar su actividad biológica siguiendo los procedimientos desvelados en Irschik y col. (The Sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial ARN polimerase isolated from myxobacteria, J. Antibiotics 40: 7 - 13 (1987)). Se encontraron las siguientes concentraciones inhibitoras mínimas frente a microorganismos:

15 Tabla 2: concentraciones inhibitoras mínimas (MIC) frente a microorganismos

Microorganismo ensayado	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Mucor hiemalis</i>	> 6
<i>Botrytis cinerea</i>	6
<i>Pythium debaryanum</i>	3
<i>Rhodotorula glutinis</i>	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	> 6
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 25
<i>Escherichia coli</i> (DMSZ 5347)	> 25

20 La toxicidad ensayada frente a la línea celular de fibroblastos de ratón L929 (ATCC CCL 1) según Sasse y col. (J. Antibiotics 56: 827 - 831 (2003)), se determinó una concentración inhibitora CI_{50} de 30 $\mu\text{g/ml}$.

25 Ejemplo 3: producción del compuesto mediante fermentación

Como ejemplo para la producción de los compuestos según la presente invención, se produjo Disorazol Z mediante la fermentación de *Sorangium cellulosum*.

25 Con la presente desvelación del nuevo compuesto a mano, las cepas productoras, por ejemplo, mixobacterias, pueden ser identificadas por las personas expertas en la técnica. Como ejemplo, se cultivó la cepa de *Sorangium cellulosum* Soce 1875 (disponible en DSMZ con el número de acceso DSM53600), que es una cepa productora del Disorazol Z, y al mismo tiempo del Disorazol Z-epóxido, en matraces con agitación.

30 El análisis del Disorazol Z y del Disorazol Z-epóxido se realizó mediante HPLC-MS usando un sistema HP 1100 equipado con un sistema de gradiente de disolvente [inyector automático, horno de columna (40 °C), detector de

DAD-UV; columna Nucleodur 100-5 C18 EC, 125/2 mm (Macherey-Nagel); disolvente A = agua con un 5 % de acetonitrilo, B = acetonitrilo con un 5 % de agua, cada uno con tampón de acetato amónico (0,5 mM) ajustado a pH 5,5 con 30 ml/l de ácido acético; gradiente: 10 % de B aumentando hasta B al 100 % en 30 min, 10 min al 100 % de B; caudal 0,3 ml/min]. Los espectros de masas se registraron en el modo alternante positivo - negativo con un sistema PE SCIEX API 2000 CL/EM/EM con una interfase de ionización por nebulización iónica.

Ejemplo 4: fermentación de *Sorangium cellulosum* para la producción de Disorazol Z y/o Diorazol Z-epóxido

Para la producción fermentativa del Disorazol Z y/o del Disorazol Z-epóxido, dependiendo de la cepa productora específica de *Sorangium*, se prefiere cultivar un cultivo de partida en matraces con agitación para su inoculación en un fermentador. El proceso de fermentación se realiza, por ejemplo, por lotes o semicontinuo.

Para el cultivo de partida se usó un medio que comprende un 0,8 % de almidón soluble (Merck 1.01252), un 0,2 % de extracto de levadura, un 0,2 % de harina de soja desgrasada, un 0,1 % de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, un 0,1 % de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 8 mg/l de Na-Fe-EDTA, un 1 % de tampón HEPES, un 0,2 % de glucosa, un 1 % de resina XAD a un pH de 7,4 al comenzar el cultivo. Para el cultivo de partida se incubaron a los matraces en agitación a 30 °C con una agitación de 160 rpm. Para la fermentación se usó un lote de fermentación de 70 litros de medio idéntico al del cultivo de partida pero sin tampón HEPES a un pH de 7,9 antes de introducirlo en el autoclave.

Para la adsorción del Disorazol Z y/o del Disorazol Z-epóxido, se añadió un 1 % (vol/vol) de XAD (Amberlite XAD 16, Rohm y Haas).

El fermentador se inoculó con un litro del cultivo de partida, el cultivo estaba a una temperatura de 30 °C, la aireación a 5,5 l/min a una velocidad del agitador de 80 rpm. Si fuera necesario, el pH se mantuvo constante o por encima de 6,8 mediante la adición de una disolución de KOH al 5 % durante el transcurso de la fermentación. El almidón residual fue controlado mediante la reacción con yodo, y se monitorizó la concentración de glucosa, por ejemplo, usando tiras reactivas (Roche). El transcurso de la fermentación se muestra en la Figura 1, que representa el uso de la tensión del oxígeno disuelto (pO_2), del pH y de la velocidad del agitador.

Las concentraciones de sustrato y de producto fueron como sigue:

Día de fermentación	glucosa	almidón (reacción con yodo)	conc. de Disorazol Z ($\mu\text{g/ml}$)
10	trazas	azul	55
11	0	azul	92
12	0	azul claro	96

El cultivo de producción está listo para ser recogido cuando la glucosa y el almidón están esencialmente metabolizados y cuando la concentración de Disorazol Z alcanza una meseta. Después de un total de doce días, se detuvo la fermentación y se recogió la resina de XAD mediante tamizado. Las células que están unidas a la XAD son incluidas en las subsiguientes etapas de extracción y purificación.

Con fines analíticos se usó una alícuota del cultivo de fermentación para la recolección de la resina XAD y de la masa celular, seguido de extracciones usando metanol, metanol:etanol:isopropanol (80:15:5), y una etapa final usando acetona. Los extractos se combinaron, se concentraron y se analizaron mediante HPLC-EM.

Cuando se usó una cepa alternativa de *Sorangium cellulosum*, preferiblemente Soce 427, catalogada en DSMZ con el número de registro DSM53419, puede usarse el siguiente medio para el cultivo de partida: un 0,3 % de almidón (Cerestar SF 12618, Cerestar Deutschland, Krefeld), un 0,2 % de harina de soja desgrasada (Soyamina 50T, Lucas Meyer, Hamburgo), un 0,1 % de extracto de levadura (Marcor), un 0,1 % de sulfato de magnesio (Roth, P027,2), un 0,05 % de cloruro de calcio (Merck, 1,02382), 8 mg/l de sal de sodio-hierro del ácido etilendiaminotetraacético (Na-Fe-EDTA) (Merck, 108413) y un 0,9 % de tampón HEPES (Roth, 9105.3), a un pH a 7,5. Después de introducirlo en el autoclave, se añadió una disolución de glucosa al 20 % (Riedel-de Haën 16301) hasta un 0,3 % de glucosa final. Para la fermentación se usó el mismo medio excepto por el tampón HEPES, a un pH de 7,9 antes de introducirlo en el autoclave.

Ejemplo 5: aislamiento del Disorazol Z a partir del caldo de fermentación

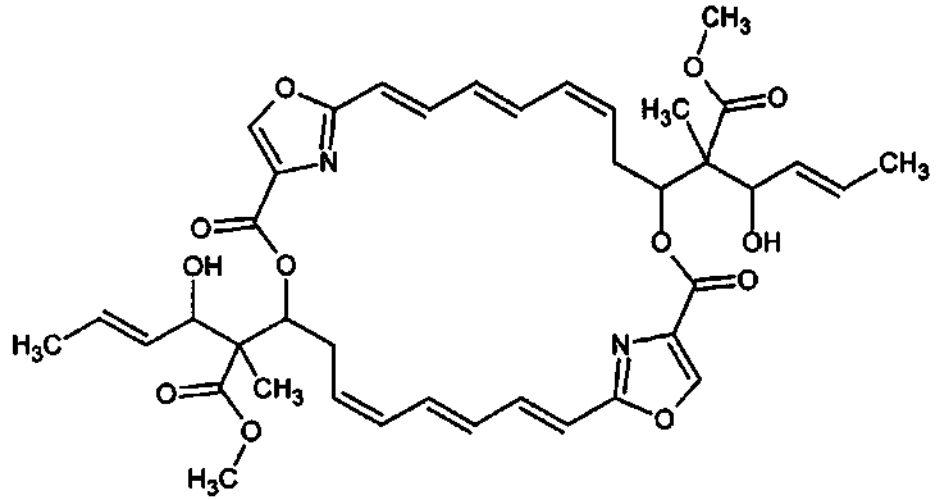
Después de una fermentación según el Ejemplo 4, la masa celular húmeda y la resina XAD recogidas mediante la centrifugación de 70 l del caldo de fermentación de *Sorangium cellulosum*, se extrajo la cepa So ce427, con porciones de 3 l de metanol. El filtrado combinado se evaporó para dar una mezcla acuosa residual. Si fuera necesario, se añadió agua para dar 1,2 -1,5 l, que se extrajeron con tres porciones de 1,2 l de diclorometano. Las disoluciones orgánicas combinadas se secaron con sulfato sódico anhidro y después se evaporaron a sequedad. El residuo se disolvió de nuevo en 1 l de metanol acuoso (97 %) y se dividió en tres porciones de heptano. La capa de

metanol se evaporó, se diluyó con tolueno y se evaporó a sequedad. El residuo de 14 g se separó mediante una cromatografía en gel con metanol en Sephadex LH-20 (Pharmacia) para proporcionar una fracción enriquecida de aproximadamente 9 g, que se purificó mediante RP-MPLC (ODS-AQ, 120 Å, S 16 mm) con metanol-agua (65/35) para dar 4,2 g de Disorazol Z.

5

REIVINDICACIONES

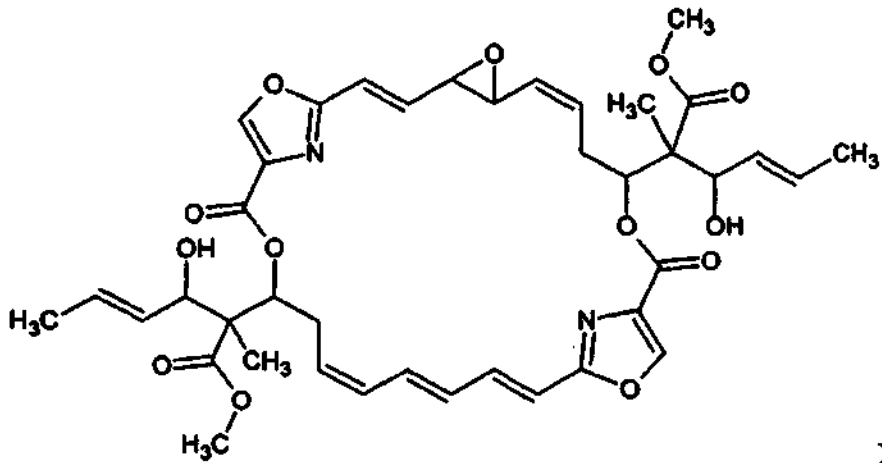
1. Compuesto que comprende una estructura según la fórmula IX:



5

IX.

2. Compuesto según la reivindicación 1, **caracterizado por** una estructura según la fórmula X:



10

X.

3. Composición farmacéutica, **caracterizada por que** comprende al menos un compuesto según una de las reivindicaciones anteriores.

4. Proceso para producir un compuesto según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** implica la fermentación de una mixobacteria del género *Sorangium* a una temperatura de 20 a 32 °C con aireación durante entre 8 y 20 días.

15

Figura 1:

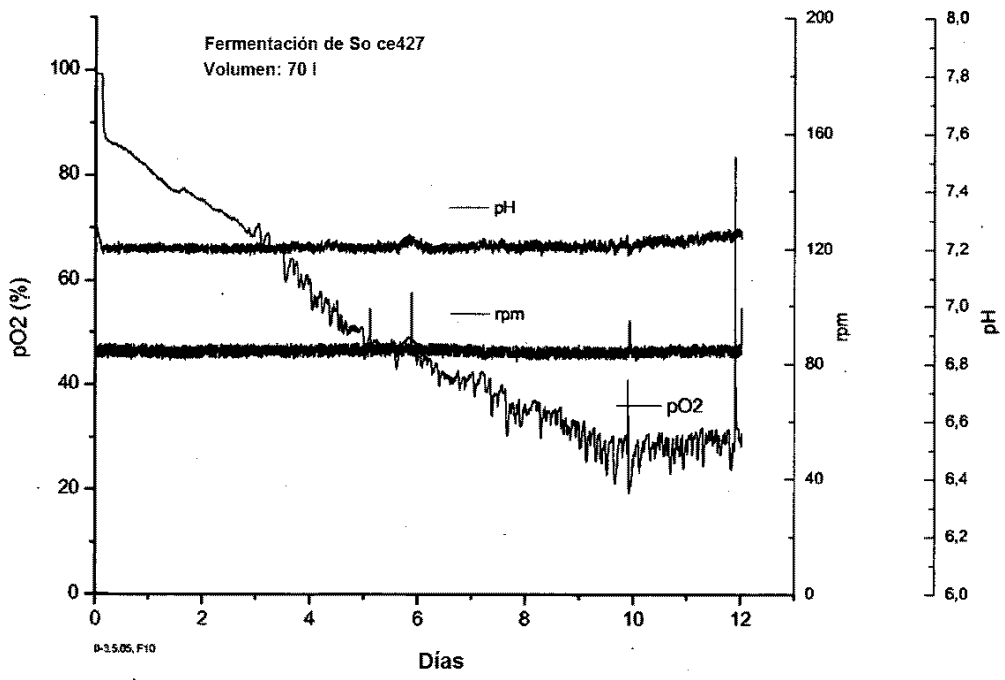


Figura 2:

