(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 436 148**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2008** **E 08871155 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013** **EP 2229401**

(54) Título: **Preparación y uso de ciclodepsipéptidos antitumorales**

(30) Prioridad:

18.01.2008 DE 102008005097

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2013

(73) Titular/es:

HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR OZEANFORSCHUNG KIEL (GEOMAR) (100.0%)
Wischhofstrasse 1-3
24148 Kiel, DE

(72) Inventor/es:

IMHOFF, JOHANNES;
YU, ZHIGUO;
LANG, GERHARD;
WIESE, JUTTA;
KALTHOFF, HOLGER y
KLOSE, STEPHANIE

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 436 148 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

Preparación y uso de ciclodepsipéptidos antitumorales

La invención se refiere a péptidos cíclicos que son adecuados para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades cancerosas. Además, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de estos compuestos así como a su uso como fármaco.

Hasta ahora, muchas enfermedades cancerosas no se pueden tratar mediante principios activos biológicos de acción selectiva. Según indicaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2000 se diagnosticó cáncer en aproximadamente 10 millones de personas a nivel mundial, aproximadamente 6 millones murieron (World Cancer Report 2003. http://www.iarc.fr/IARCPress/pdfs/wcr/WorldCancerReport.pdf). Según la estimación de la OMS, el número de muertes causadas por enfermedades cancerosas aumentará hasta el 2030 a aproximadamente 11,5 millones por año (Worlds Health Statistics - 2007. http://www.who.int/whosis/whostat2007_10highlights.pdf). Aproximadamente a partir del año 2010, las enfermedades cancerosas representarán, después de las enfermedades infecciosas, la causa principal de muerte seguidas de cardiopatías isquémicas, apoplejía (infarto cerebral) y VIH/SIDA.

Los péptidos que son producidos por microorganismos están entre los candidatos prometedores para el tratamiento de enfermedades cancerosas. Por ejemplo, la actinomicina D que se produce por *Streptomyces parvulus* ya se emplea como medicamento para el tratamiento de cáncer (BC Cancer Agency Cancer Drug Manual - 1994. http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/852A1FC3-5BD2-481B-BFAA-45ACBFA77FAC/22684/Dactinomycinmonograph_5APR07.pdf). La tiocoralina, un producto de *Micromonspora marina*, inhibe el crecimiento de células tumorales (Romero, F. y col. "Thiocoraline, a New Depsipeptide with Antitumor Activity Produced by a Marine Micromonospora. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Biological Activities." J. Antibiot. 1997; 50 (9): 734-7). El aislado de hongo marino *Exserohilum rostratum* produce los dipéptidos cíclicos rostratina A-D que presentan un efecto citotóxico (Tan, R. X. "Isolation and Structure Assignments of Rostratins A-D, Cytotoxic Disulfides Produced by the Marine-Derived Fungus Exserohilum rostratum." J. Nat. Prod. 2004 ago; 67(8): 1374-82).

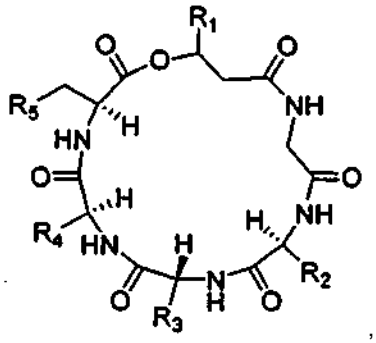
A pesar de la amplia distribución del género *Scopulariopsis*, también en el hábitat marino, existen solo conocimientos limitados acerca de productos naturales de estos organismos. Según el conocimiento de los presentes inventores, el único producto natural conocido hasta ahora de este género es un derivado de piranol, patentado por su actividad antimicótica (documento US 5.270.334).

En vista de la gran cantidad de personas enfermas de cáncer, el pronóstico desfavorable para la curación de determinados tipos de cáncer (por ejemplo, páncreas) a causa de la mala eficacia de los medicamentos actuales, efectos secundarios y desarrollo de resistencias frente a los fármacos empleados, existe una necesidad urgente de nuevos medicamentos contra el cáncer.

Por tanto, la presente invención se basa en el objetivo de facilitar otros péptidos de acción antitumoral así como indicar una vía para su producción.

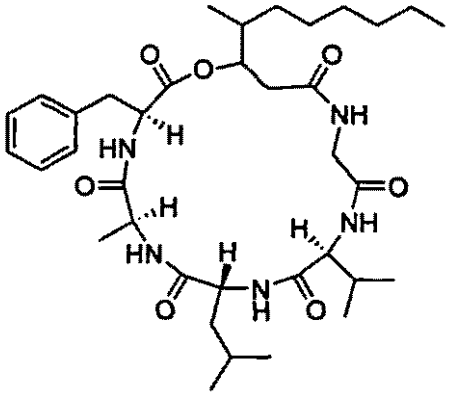
De acuerdo con la invención, este objetivo se resuelve mediante el compuesto con las características de la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes reproducen realizaciones ventajosas de la invención.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la estructura general



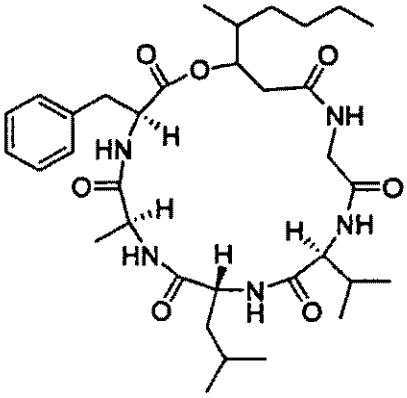
estando seleccionados R_1, R_2, R_3 y R_4 del grupo compuesto por un átomo de hidrógeno (H) y un alquilo C_1-C_{20} no sustituido o que presenta un sustituyente y siendo R_5 un resto fenilo no sustituido o que presenta un sustituyente, presentando el alquilo y/o el resto fenilo un sustituyente seleccionado del grupo compuesto por un resto acilo, un grupo formilo, acetilo, tricloroacetilo, fumarilo, maleilo, succinilo o benzoilo, un resto halógeno, un grupo aminoalquilo, un grupo hidroxilo, un grupo éter o un grupo carboxilo.

En una forma de realización preferente, el compuesto es un compuesto de fórmula



(escopularida A)

incluyendo sus diastereómeros. En otra forma de realización preferente, el compuesto es un compuesto de fórmula



(escopularida B)

incluyendo sus diastereómeros.

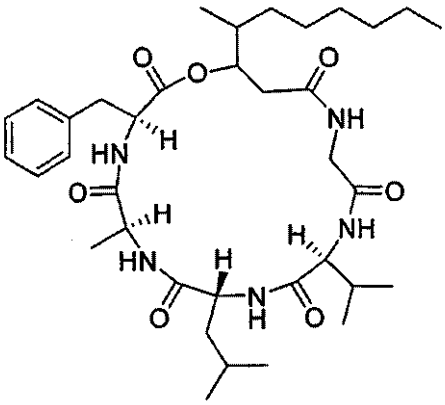
En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto tal como se ha descrito anteriormente que está caracterizado por las siguientes etapas:

- cultivo de un hongo del género *Scopulariopsis* de forma en sí conocida y
- aislamiento del compuesto del medio de cultivo y/o del hongo. El hongo es, preferentemente, *Scopulariopsis brevicaulis*.

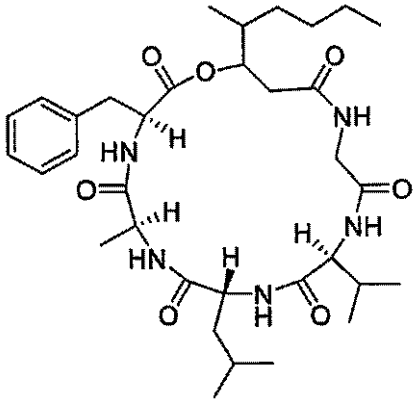
En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un compuesto tal como se ha descrito anteriormente para el uso como agente antitumoral. La invención se refiere, finalmente, también a un compuesto tal como se ha descrito anteriormente para el uso en un procedimiento para el tratamiento y para la prevención de cáncer de páncreas.

En el transcurso de un programa científico para el aislamiento de productos naturales biológicamente activos a partir de microorganismos marinos, los inventores han examinado el hongo *Scopulariopsis brevicaulis*, aislado de la esponja marina *Tethya aurantium*.

Los péptidos antitumorales preferentes de acuerdo con la invención escopularida A y escopularida B se aislaron de cultivos del hongo *Scopulariopsis brevicaulis* mediante HPLC preparativa.



escopularida A



escopularida B

Los datos físicos de escopularida A y B están representados en las Tablas 1 y 2 adjuntas, mostrando la Tabla 1 los datos de RMN (600 MHz, MeOD) de escopularida A y la Tabla 2, los datos de RMN (600 MHz, MeOD) de escopularida B.

Al examinar el efecto antiproliferativo frente a células tumorales se comprobó que la escopularida B muestra efectos inhibidores significativos frente a líneas de células tumorales, en particular frente a la línea celular de tumor de páncreas Colo357 (véase el Ejemplo 4).

La propagación y la identificación del hongo *Scopulariopsis brevicaulis*, al igual que la purificación de escopularida A y escopularida B de cultivos del hongo y la determinación del efecto antiproliferativo frente a células tumores, se describen en los siguientes ejemplos.

1) Propagación de un cultivo del hongo *Scopulariopsis brevicaulis*

La propagación de los cultivos de hongo para la obtención de escopularidas se realizó en matraces de Erlenmeyer de 2 litros que se cargaron, respectivamente, con 700 ml de solución nutritiva con la siguiente composición (modificada según Wickerham, L. J. "Taxonomy of yeasts." US Dept. Technol. Bull. 1951; 1029: 1-56): 3,0 g de extracto de levadura; 3,0 g de extracto de malta; 5,0 g de peptona; 10,0 g de glucosa; 30,0 g de NaCl; pH 6,8. La esterilización de la solución nutritiva se realizó mediante autoclavado a 121 ºC/0,1 MPa (1 bar), 20 minutos. Como inóculo para el cultivo experimental de hongo se transfirió de un cultivo previo de 14 días de edad, que se propagó en medio WM, con un asa de platino material celular a la preparación del cultivo principal. La incubación de la solución nutritiva inoculada se realizó a lo largo de un periodo de tiempo de 14 días con 28 ºC constantes en cultivo estático en oscuridad.

2) Identificación del hongo como *Scopulariopsis brevicaulis*

Se establecen las características morfológicas del hongo mediante los exámenes de microscopía electrónica de barrido. El hongo muestra conidióforos individuales que sobresalen de hifas. Las hifas no están ramificadas o están divididas verticalmente una o dos veces. Las células conidiógenas son cilíndricas, a veces con una base hinchada y con una zona de unión de anchura uniforme de longitud variable. Los conidios son desde esféricos hasta ovales (4-6 x 6-7 μm) y presentan una base aplanada así como elevaciones rugosas. La identificación genética se realiza mediante el análisis de ADNr 18S. Las características morfológicas y la secuencia de ADNr 18S da lugar a una identificación inequívoca del hongo como *Scopulariopsis brevicaulis*.

3) Purificación de escopularida A y escopularida B a partir de cultivos del hongo *Scopulariopsis brevicaulis*

El micelio del hongo se separa del sobrenadante del cultivo, se tritura y se extrae con acetona. El extracto de acetona se evapora hasta la sequedad y el residuo se lava sucesivamente con una mezcla de metanol-agua (2:8) y con *n*-hexano. El residuo remanente se somete a una separación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa:

columna de separación:	Phenomenex Luna C18, 21,2 x 250 mm, 5 μm
disolvente:	agua + ácido fórmico al 0,1% y acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1% (30:70)
caudal:	18 ml/min

Las sustancias escopularida A y escopularida B se eluyen después de 13 u 8 minutos. Después de la retirada del disolvente mediante secado al vacío se obtienen las sustancias puras deseadas en forma de sólidos blancos.

4) Determinación del efecto antiproliferativo frente a células tumorales

Las sustancias escopularida A y escopularida B muestran efectos inhibidores significativos frente a líneas de células tumorales, en particular las líneas celulares de tumor de páncreas Colo357 y Panc89 así como la línea celular de tumor intestinal HT29 (como promedio entre el 25-50% de inhibición a 10 μg/ml). Esta actividad se determinó con el ensayo de violeta cristal (Siegmund, D. y col. "Death receptor induced signalling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing." Mol. Cell. Biol. 2005; 25: 6363-6379).

Tabla 1: escopularida A

Sólido cristalino fino incoloro.
Punto de fusión: 229-230 ºC
Actividad óptica: [α]25D -38º (c 0,5, MeOH)
IENEMAR: m/z 672,4331 [M+H]+ (calculado para $C_{36}H_{58}N_5O_7$ 672,4336)
Datos de RMN (600 MHz; en MeOH-d4)

Posición		δ_C, **mult.**	δ_H (***J*** **en Hz)**	**ESCO**	**CHME**
Phe	1	173,6, qC			
	2	55,3, CH	4,79, m	3a, 3b	1, 3
	3	39,4, CH_2	3,18, dd (13,5, 7,5)	2, 3b	1, 2, 4, 5/9
			3,03, dd (13,5, 8,2)	2, 3a	1, 2, 4, 5/9
	4	137,8, qC			
	5/9	130,3, CH	7,24, m	6/8	3, 7, 5/9
	6/8	129,6, CH	7,28, m	5/9	4, 6/8
	7	128,0, CH	7,21, m		5/9
Ala	1	174,1, qC			
	2	50,3, CH	4,29, c (7,3)	3	1, 3, *Leu*-1
	3	17,6, CH_3	1,27, d (7,3)	2	1, 2
Leu	1	175,1, qC			
	2	54,7, CH	4,19, m	3	1, 3, 4
	3	40,3, CH_2	1,58, m	2, 4	1, 2, 4
	4	26,0, CH	1,68, m	3, 5, 6	2, 3, 5, 6
	5	23,1, CH_3	1,00, d (6,6)	4	3, 4, 6
	6	22,3, CH_3	0,95, d (6,6)	4	3, 4, 5
Val	1	173,4, qC			
	2	59,9, CH	4,20, m	3	1, 3, 4, *Gly*-1
	3	31,0, CH	2,19, m	2, 4, 5	1, 2, 4, 5
	4	19,0, CH_3	0,98, d (6,7)	3	2, 3, 5
	5	19,7, CH_3	0,97, d (6,7)	3	2, 3, 4
Gly	1	171,9, qC			
	2	44,0, CH_2	4,24, d (16,8)		1, *HMDA*-1
			3,53, d (16,8)		1, *HMDA*-1
HMDA[a]	1	174,5, qC			
	2	40,9, CH_2	2,42, m	3	1, 3, 4
	3	78,6, CH	4,77, m	2, 4	2, 4, 4-Me
	4	39,0, CH	1,54, m	3, 4-Me	
	5	33,6, CH_2	1,22, m		
			0,95, m		
	6	30,6, CH_2	1,30, m		
	7	28,2, CH_2	1,29, m		
	8	33,0, CH_2	1,26, m		

(continuación)

Posición		δ_C, mult.	δ_H (J en Hz)	ESCO	CHME
	9	23,7, CH_2	1,31, m	10	
	10	14,42, CH_3	0,91, t (7,2)	9	9, 8
	4-Me	14,41, CH_3	0,83, d (6,9)	4	3 ,4, 5

[a] HMDA: ácido 3-hidroxi-4-metildecanoico

Tabla 2: escopularida B

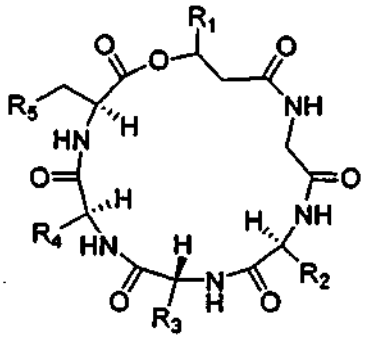
Sólido amorfo blanco
Actividad óptica: [α]25D -43º (c 0,5, MeOH)
IENEMAR: m/z 644,4007 [M+H]+ (calculado para $C_{34}H_{54}N_5O_7$ 644,4023)
Datos de RMN (600 MHz; en MeOH-d4)

Posición		δ_C, mult.	δ_H (*J* en Hz)	ESCO	CHME
Phe	1	173,6, qC			
	2	55,3, CH	4,78, m	3a, 3b	1, 3
	3	39,4, CH_2	3,18, dd (13,5, 7,5)	2, 3b	1, 2, 4, 5/9
			3,03, dd (13,5, 8,2)	2, 3a	1, 2, 4, 5/9
	4	137,8, qC			
	5/9	130,3, CH	7,24, m	6/8	3, 7, 5/9
	6/8	129,6, CH	7,28, m	5/9	4, 6/8
	7	128,0, CH	7,21, m		5/9
Ala	1	174,1, qC			
	2	50,3, CH	4,29, c (7,3)	3	1, 3, *Leu*-1
	3	17,6, CH_3	1,28, d (7,3)	2	1, 2
Leu	1	175,1, qC			
	2	54,7, CH	4,19, m	3	1, 3, 4
	3	40,4, CH_2	1,58, m	2,4	1, 2, 4
	4	26,0, CH	1,69, m	3,5,6	2, 3, 5, 6
	5	23,1, CH_3	0,99, d (6,6)	4	3, 4, 6
	6	22,3, CH_3	0,95, d (6,6)	4	3, 4, 5
Val	1	173,4, qC			
	2	59,9, CH	4,20, m	3	1, 3, 4, *Gly*-1
	3	31,0, CH	2,18, m	2, 4, 5	1, 2, 4, 5
	4	19,0, CH_3	0,98, d (6,7)	3	2, 3, 5
	5	19,7, CH_3	0,97, d (6,7)	3	2, 3, 4
Gly	1	171,9, qC			
	2	44,0, CH_2	4,24, d (16,8)		1, *HMOA*-1
			3,53, d (16,8)		1, *HMOA*-1
HMOA[a]	1	174,5, qC			
	2	40,9, CH_2	2,41, m	3	1, 3 ,4
	3	78,6, CH	4,77, m	2, 4	2, 4, 4-Me
	4	39,0, CH	1,54, m	3, 4-Me	
	5	33,3, CH_2	1,22, m		
			0,96, m		
	6	30,5, CH_2	1,32, m	6b	
			1,32, m	6a	
	7	23,8, CH_2	1,16, m	8	
	8	14,38, CH_3	0,90, t (7,2)	7	6, 7
	4-Me	14,41, CH_3	0,83, d (6,9)	4	3, 4 ,5

[a] HMOA: ácido 3-hidroxi-4-octanoico

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la estructura general

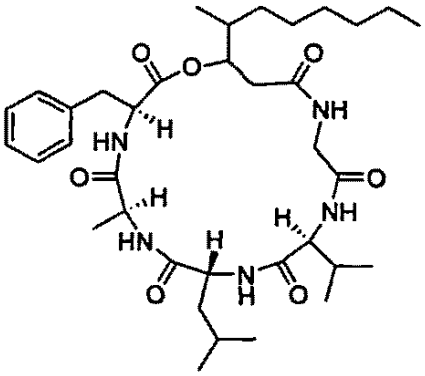


estando seleccionados

R_1, R_2, R_3 y R_4 del grupo compuesto por un átomo de hidrógeno (H) y un alquilo C_1-C_{20} no sustituido o que presenta un sustituyente
y
siendo R_5 un resto fenilo no sustituido o que presenta un sustituyente,

presentando el alquilo y/o el resto fenilo un sustituyente seleccionado del grupo compuesto por un resto acilo, un grupo formilo, acetilo, tricloroacetilo, fumarilo, maleilo, succinilo o benzoilo, un resto halógeno, un grupo aminoalquilo, un grupo hidroxilo, un grupo éter o un grupo carboxilo.

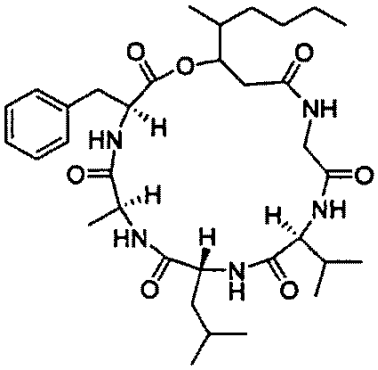
2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 con la fórmula



(escopularida A)

incluyendo sus diastereómeros.

3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 con la fórmula



(escopularida B)

incluyendo sus diastereómeros.

4. Procedimiento para la preparación de un compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por** las etapas:

- cultivo de un hongo del género *Scopulariopsis* de forma en sí conocida y
- aislamiento del compuesto a partir del medio de cultivo y/o el hongo.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** el hongo es *Scopulariopsis brevicaulis*.

6. Compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como agente antitumoral.

7. Compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en un procedimiento para el tratamiento y para la prevención de cáncer de páncreas.