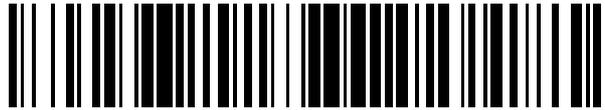


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 995**

51 Int. Cl.:

C07D 493/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2003 E 10181150 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2280014**

54 Título: **Procedimientos de preparación, aislamiento y purificación de epotilona B**

30 Prioridad:

23.09.2002 US 412994

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

27.01.2014

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:

**BENIGNI, DANIEL;
TULLY, THOMAS P. y
DAVIS, BRIAN L.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 439 995 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 de preparación, aislamiento y purificación de epotilona B

Solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio respecto de la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 60/412.994, presentada el 23 de septiembre de 2002.

Campo de la invención

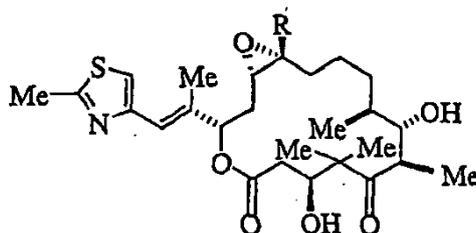
La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para la producción, aislamiento y purificación de epotilona B. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, un procedimiento de fermentación para la producción de epotilona B, aislamiento mediante adsorción sobre una resina y la posterior purificación.

Antecedentes de la invención

15 Las epotilonas son una clase relativamente nueva de compuestos macrólidos que se obtuvieron inicialmente mediante fermentación de mixobacterias (*Sorangium cellulosum*). Estos compuestos se investigaron inicialmente como agentes protectores de plantas debido a sus propiedades antifúngicas, pero después las epotilonas pasaron a tener interés debido a su actividad citotóxica sobre células animales y posteriormente se caracterizaron como
 15 agentes de polimerización de tubulina. Ahora se sabe que las epotilonas ejercen efectos estabilizantes de los microtúbulos similares a los del paclitaxel (TAXOL[®]) y actividad citotóxica contra las células en rápida proliferación tales como células tumorales u otra enfermedad celular hiperproliferativa. El uso de epotilonas como agentes quimioterapéuticos está descrito por Bollag y col., 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

25 Un esquema para obtener las epotilonas lo reveló Höfle y col., en el documento WO 93/10121. Höfle cultivó una cepa de *Sorangium cellulosum* en un medio que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y sales minerales. Durante el cultivo de la cepa se añadió una resina de adsorción. Las epotilonas se eluyeron con disolvente desde la resina adsorbente. Las diversas epotilonas se separaron mediante cromatografía de fase inversa y se cristalizaron. No obstante, Höfle y col., concedieron que este procedimiento solo producía una baja cantidad de
 30 epotilona B y también que la proporción entre la epotilona B y la epotilona A en la fermentación era baja. Esta baja proporción de epotilona B con respecto a la epotilona A dificulta la recuperación de epotilona B pura. Por tanto, en la técnica existe la necesidad de procedimientos de fermentación mejorados para producir epotilona B frente a epotilona A y mejores procedimientos de aislamiento y purificación de epotilona B.

35 Además, el documento WO 02/46196 A divulga un procedimiento para desorber epotilonas a partir de una resina, usando dicho procedimiento un disolvente apolar o débilmente polar.

Sumario de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. En el presente documento se divulga un procedimiento de fermentación para la producción de epotilona B.

40 También se divulgan nuevas cepas de *Sorangium cellulosum* obtenidas mediante mutagénesis para la producción de epotilonas.

También se divulgan procedimientos para mejorar la proporción entre epotilona B y A producidas mediante la nueva

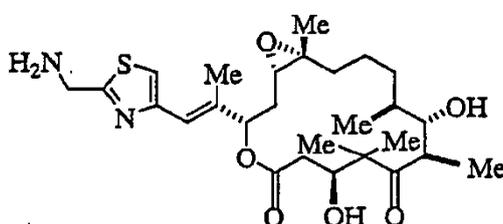
cepa de *Sorangium cellulosum* proporcionando un aditivo a la fermentación. En una realización preferida, el aditivo es propionato, ácido propiónico con un ajuste adecuado del pH u otro precursor del propionato.

5 También se divulga un procedimiento de extracción mejorado para el aislamiento de la epotilona B del medio de fermentación usando una resina. También se divulgan procedimientos para lavado de la resina rica en epotilona para reducir los niveles de impurezas y un mejor procesamiento corriente abajo.

10 También se divulga 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 mediante 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 muestras mediante cromatografía, incluyendo cromatografía de fase normal y de fase inversa. En una realización adicional, el extracto de la resina solo se procesa mediante cristalización.

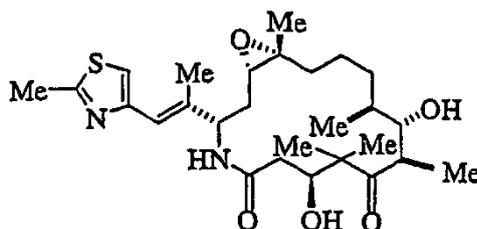
La epotilona B ("epo B") es útil como intermedio en la preparación del derivado 1 ("d1") (como se describe en la patente de EE.UU. 6.262.094, incorporada en el presente documento por referencia, en la que el 2-metilo sobre el anillo tiazol está sustituido por una amina.

15



Derivado 1

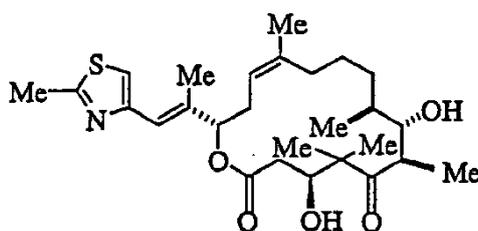
20 La epotilona B también es útil en la preparación del derivado 2 ("D2") (la conversión de la lactona de la epotilona B en la lactama del derivado 2 está descrita por Borzilleri y col., J. Amer. Chem. Soc. 122, 8890, 2000, y en el documento WO 99/02514):



Derivado 2

25

Adicionalmente, la epotilona B ("epo B") es útil para la preparación del derivado 3 (epotilona D, "D3") (como se describe en la patente de EE.UU. 6.320.045):



Derivado 3

5 También se divulgan formas en cristal de la epotilona B producidas usando los procedimientos y materiales descritos en la presente memoria.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son ejemplos.

Breve descripción de las figuras

Las ventajas, naturaleza y varias características de la invención pueden aparecer más completamente tras consideración de las figuras adjuntas. En las figuras:

10 La Figura 1 muestra la estructura molecular en la celda unitaria monoclinica de la forma de epoB-EA β , con dos moléculas de epotilona B y dos moléculas de acetato de etilo en el canal invitado de la celda unitaria monoclinica.

15 La Figura 2 muestra la estructura molecular en la celda unitaria monoclinica de la forma de epoB-AN β , con dos moléculas de epotilona B y dos moléculas de acetonitrilo en el canal invitado de la celda unitaria monoclinica.

La Figura 3 muestra la estructura molecular en la celda unitaria monoclinica de la forma de epoB-IP β , con dos moléculas de epotilona B y dos moléculas de isopropanol en el canal invitado de la celda unitaria monoclinica.

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

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

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

30 La Figura 7 muestra patrones de PXRD observados (superior) y simulados (inferior) para el solvato de acetonitrilo (forma cristalina de epoB-AN β) de la epotilona B. En la Figura 7, el patrón simulado se calculó a partir de los parámetros atómicos refinados en la estructura cristalina monoclinica a -40 °C y el patrón observado se midió a +23 °C.

35 La Figura 8 muestra patrones de PXRD observados (superior) y simulados (inferior) para el solvato de alcohol isopropílico (forma cristalina de 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 monoclinica a -3 °C y el patrón observado se midió a +23 °C.

La Figura 9 muestra un patrón PXRD observado para un solvato de grado primario que contiene tolueno de la epotilona B producido siguiendo 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.

40 La Figura 11 muestra un patrón PXRD observado para un solvato recristalizado que contiene tolueno de la epotilona B producido siguiendo 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 PXRD observado para un solvato que contiene acetato de etilo de la epotilona B producido siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, etapa C.

5 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 PXRD observado (superior) para el solvato que contiene tolueno preparado siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7C, junto con un patrón PXRD simulado (inferior) para el solvato de tolueno de la epotilona B a temperatura ambiente.

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

10 Debe entenderse que estas figuras son para fines ilustrativos de los conceptos de la invención y no son de naturaleza limitante. En cada una de las Figuras 1 a 4, todos los átomos de hidrógeno de metilo y de metileno de la epotilona se han omitido a efectos de claridad. En las figuras 1-4, los enlaces de hidrógeno intermoleculares se muestran en las porciones derecha inferior e izquierda superior de los diagramas son barras discontinuas y las distancias del enlace de H (Angstroms) designan las distancias oxígeno-oxígeno intermoleculares.

15 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención describe procedimientos de procesos específicos. Además, en la presente memoria se divulgan nuevas cepas mutantes de *Sorangium cellulosum* que, junto con el procedimiento de la invención o por separado, producen fermentaciones con mejores concentraciones de epotilona B, principalmente mediante reducción de la cantidad relativa de la epotilona A producida durante la fermentación. Las células de *Sorangium cellulosum* u otros microorganismos adecuados se expanden, por ejemplo, a través de uno o más cultivos en estado de crecimiento inicial y se usan para proporcionar inóculos para fermentaciones productoras de epotilona. Durante las primeras horas de fermentación, por ejemplo cerca de 24-72 horas, el crecimiento celular se produce a medida que las células usan nutrientes en el medio. Después, los nutrientes, tales como vitaminas, minerales, hidratos de carbono y aminoácidos (u otras fuentes de carbono o de nitrógeno tales como precursores de aminoácidos) se añaden al medio en una cantidad que conduce a la producción de epotilonas. En una realización, los nutrientes, tales como vitaminas, minerales, hidratos de carbono 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 de producción máxima de la epotilona A o la epotilona B es una tasa de producción en la cual 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 de lo que se produciría si los aditivos o nutrientes se añadieran en una cantidad inferior a la óptima. Durante la fermentación se añade ácido propiónico, un precursor del mismo o una sal del mismo, en una cantidad eficaz para aumentar la proporción entre la epotilona B y la epotilona A (la "proporción del producto").

35 En la presente memoria también se divulgan nuevas cepas de *Sorangium cellulosum* que son útiles en la fabricación de las epotilonas. Estas nuevas cepas, en particular la cepa SC16408, se han obtenido mediante mutagénesis seguida de selección aleatoria.

40 *Sorangium cellulosum* se aisló por primera vez de una muestra de tierra recogida de los bancos del río Zambesi en Sudáfrica en 1985. El organismo lo describió por primera vez para la producción de epotilonas Höfle y col., (citado en lo que antecede). La cepa usada por Höfle, *et al.* se designó So ce90 y se depositó en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Colección Alemana de Microorganismos, DSM) con el N° de depósito 6773. La cepa So ce90 se sometió a mutagénesis UV seguida de selección aleatoria para generar la cepa So ce90B2. La cepa So ce90B2 (también designada SC16224) dio títulos de epotilona B en matraces de agitación (que contienen, por ejemplo, 1,8 % en peso/volumen de resina por matraz) de aproximadamente 50 mg/l o 2,8 mg/g de la resina (que puede variar a, por ejemplo, 3,5 o 4,5 mg/g), y una proporción de epotilona B/A de aproximadamente 0,6.

45 La cepa So ce90B2 o derivado de la misma se sometió a mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG), seguido de selección aleatoria para producir las cepas SC16408 (depositada en la ATCC con N° PTA-3880) y SC16449 (depositada en la ATCC con N° PTA-3881). Estas últimas dos cepas se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo como depósitos de patente según el Tratado de Budapest. Detalles adicionales del procedimiento se proporcionan en los ejemplos.

50 En la presente memoria se divulgan cepas de *Sorangium cellulosum* que producen (p. ej., en las condiciones de producción que se definen más adelante) al menos aproximadamente 100 mg de epotilona B por litro de volumen de caldo o 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. También se divulgan 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 de epotilona B/A es de al menos 1,5. En otra realización más, la proporción de epotilona B/A es de 1,5 a 4,0.

La presente invención está dirigida a procedimientos para mejorar la proporción entre epotilona B y A producidas mediante la nueva cepa de *Sorangium cellulosum* mediante alimentación de un aditivo a la fermentación. En realizaciones preferidas, el aditivo comprende propionato, añadido después de que las células han crecido durante hasta 96 horas, pero, preferentemente, a aproximadamente 24-48 horas. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivaron durante aproximadamente 34 horas antes de añadir el propionato. Estudios tempranos de GBF investigaron, entre otros factores que influyen sobre la fermentación, el efecto de la adición una vez de propionato al medio a un nivel de 0,1% para la mejora creciente de la proporción entre epotilona B/epotilona A (B/A). Los inventores en la presente memoria han hallado, sorprendentemente, y es una de las características de la presente invención, que los títulos de las epotilonas, de epotilona B en particular, y la proporción de B/A producida en matraces de agitación, fermentadores de 14 l y fermentadores de producción, se mejoraron marcadamente con la introducción de propionato o de propionato sódico. La introducción de propionato o de propionato sódico produce una mejora significativa de los títulos de epotilona B. Por ejemplo, la producción en matraz de epotilona B mejoró mediante la suplementación con propionato sódico dentro de un intervalo preferido, como se monitoriza en el cultivo, de 0,05 a 0,80 mg/ml (0,005-0,08 %) periódicamente (p. ej., al día) se inició una introducción, más preferentemente dentro de un intervalo de 0,005-0,04 %. En una realización, la cantidad de propionato en el cultivo está dirigida a 0,02% o menos. Además, otros compuestos relacionados con propionato que incluyen, entre otros, éster metílico de ácido propiónico y éster etílico de ácido propiónico, también se encontró que mejoraban la producción de epotilona B y consecuentemente la proporción de B/A.

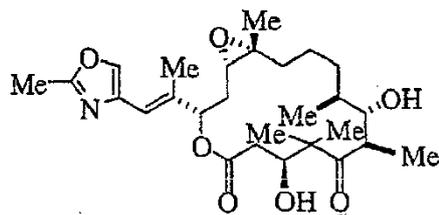
En una realización, particularmente útil para fermentaciones en un matraz, se añade una introducción adicional que contiene una mezcla de fosfato monobásico y dibásico, con la proporción seleccionada para soportar un pH adecuado. Esta introducción se puede incorporar en una introducción de propionato o se añade por separado.

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

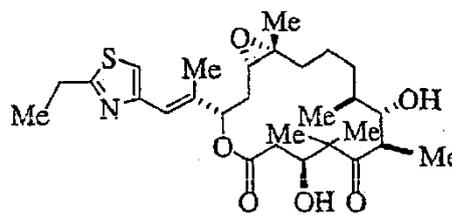
La resina que contiene epotilonas de la fermentación se lava opcionalmente con agua y 2-30% de acetonitrilo acuoso o metanol acuoso para eliminar impurezas polares o con una solución que contiene detergente, preferentemente un detergente iónico tal como un detergente basado en sulfato de alquilo y una cantidad de una amina (añadida a la solución en forma de base). Se seleccionan cantidades para mejorar la calidad del extracto de epotilona obtenido después de la resina. Un lavado acuoso preferido usa dodecilsulfato sódico al 0,5% en peso/volumen y amoníaco al 0,5% en peso/volumen. En esta última realización, antes de la extracción de disolvente la resina se lava, preferentemente, una o más veces con agua.

La resina que contiene epotilonas de la fermentación se extrae, preferentemente, con un disolvente que es inmisible (se separa en fase) con una fase acuosa, tal como acetato de etilo o éter metil-t-butílico (MTBE), para extraer las epotilonas adsorbidas en la resina. Disolventes adicionales que se pueden usar para extraer epotilona B incluyen n-butanol, acetato de isopropilo, acetato de n-propilo, acetato de n-butilo y acetato de t-butilo. Preferentemente, el extracto de disolvente rico se concentra y la epotilona B cristaliza en el concentrado. En una realización, el disolvente rico se lava con agua y el disolvente rico lavado con agua se concentra y, opcionalmente, se filtra mediante pulido. Cuando el disolvente es adecuado, como lo es el acetato de etilo, la epotilona B se cristaliza realizando un barrido por destilación de disolvente en un antidisolvente. En otras palabras, al disolvente rico se añade un segundo disolvente de punto de ebullición relativamente alto en el que la epotilona B sea esencialmente insoluble y el disolvente rico se elimina mediante destilación hasta un grado suficiente para permitir la cristalización. Se puede usar vacío para dirigir o facilitar la destilación. En una realización, el disolvente se concentra y se añade una cantidad adecuada de antidisolvente. Antidisolventes útiles incluyen tolueno, hexanos y heptanos. La pasta resultante se puede calentar y enfriar hasta una temperatura fijada seleccionada para potenciar la calidad de los cristales resultantes. Se pueden usar oscilaciones de temperatura para mejorar la pureza del cristal, minimizar las partículas finas y producir una pasta que se filtre más rápido. Para algunos otros disolventes, tales como MTBE, la concentración por destilación del disolvente rico produce un entorno de cristalización eficaz con refrigeración (sin el uso de un antidisolvente). Preferentemente, los cristales resultantes se filtran, dando una epotilona B de grado primario.

Durante la extracción y la cristalización inicial, la epotilona B se separa de la mayoría de las impurezas presentes en el extracto inicial, especialmente epotilona A. Típicamente, la epotilona B de grado primario contiene epotilona A como impureza mayoritaria. También típicamente hay presentes otras dos impurezas de estructura similar derivadas de la fermentación, es decir el siguiente análogo de oxazol y el análogo de etiltiazol.



Oxazol



Etiltiazol

- 5 Procedimientos de purificación aplicados posteriormente (incluidas las etapas de recristalización y cromatografía) descritos en la presente memoria para la epotilona B implican, entre otras cosas, la eliminación de estos dos compuestos a un nivel en el que ya no se consideran significativos.

La epotilona B de grado primario (es decir, la forma cristalina que contiene tolueno de epo B, de grado primario) obtenida preferentemente como se ha descrito anteriormente, se puede recristalizar después calentando en acetato de etilo seguido de la adición de tolueno con calentamiento continuo. Después, la mezcla se enfría, la pasta cristalina resultante se filtra y la torta se lava con tolueno para dar epotilona B recristalizada una vez (es decir, epo B en forma cristalina que contiene tolueno, recristalizada). Como alternativa, la epotilona B de grado primario se puede procesar mediante una etapa de cromatografía de fase inversa preparativa de alto rendimiento (p. ej., RP/C-18 en 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. Las fracciones que contienen epotilona B de la pureza deseada se combinan, 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 pasta se filtra, se lava con disolvente/antisolvente (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, dando 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, y similares. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de alto rendimiento en fase normal. Las muestras se pueden cargar en la columna en un disolvente de polaridad relativamente baja, 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 pasta se filtra, se lava con disolvente/antisolvente (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 o acetato de etilo/tolueno. Los cristales lavados se secan, dando epotilona B de alta calidad.

En determinados casos, cuando no es necesaria una eliminación intensiva de los análogos de etiltiazol o 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 formularse, por ejemplo, como sigue:

Ingrediente	Preferido (g/l)	Más preferido (g/l)	Todavía más preferido (g/l)
Leche desgrasada 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 de 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 desgrasadas, harinas de soja, extractos de levadura y almidones de Maltrin indistintamente con resultados comparables.

- 5 El medio de producción para el cultivo del microorganismo productor de epitolona y para la producción de epitolonas, especialmente en matraces de agitación, puede formularse, por ejemplo, como en lo que antecede con la siguiente diferencia con respecto al glicerol y la posterior adición de resina.

Ingrediente	Preferido (g/l)	Más preferido (g/l)	Todavía 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 de agitación, comprende:

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

- 10 Dicha solución alimenticia de nutrientes puede contener además una mezcla de fosfato sódico dibásico y fosfato monosódico, del siguiente modo:

Ingrediente	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 con respecto al pH deseado después de la adición de la solución alimenticia.

- 15 Para uso en fermentadores, los componentes nutrientes descritos anteriormente, con la excepción de HEPES, que preferentemente se elimina, se pueden usar preferentemente con antiespumante (por ejemplo, de Dow Corning, AF

20 Emulsión, Calidad alimenticia) añadidos del siguiente modo:

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

Se puede añadir sosa cáustica (solución de hidróxido sódico o potásico) al medio de fermentación según sea necesario para mantener un intervalo de pH útil. La resina se puede añadir del siguiente modo:

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

5

En la fermentación de producción, el propionato y los nutrientes se añaden preferentemente por separado, según sea necesario. El propionato puede, por ejemplo, comprender de 80 a 150 g/l de propionato sódico, añadiéndose la cantidad más preferentemente para mantener (por ejemplo, como se determina mediante 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 alimentador madre estéril de la siguiente manera:

10

Ingrediente	Preferido (g/l)
Tastone-154	15 - 25
Maltrin-M040	55 - 75
Antiespumante	0,5 - 1,5

Para las fermentaciones a más largo plazo, los nutrientes adicionales se añaden preferentemente, por ejemplo, a partir del siguiente alimentador madre estéril, que se añade en un volumen mayor en comparación con el alimentador madre anterior:

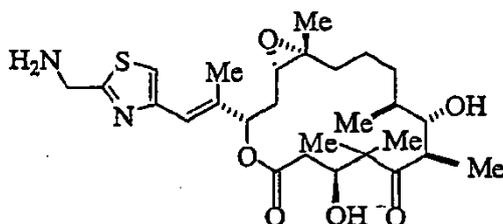
15

Ingrediente	Preferido (g/l)
Leche desgrasada en polvo	40 - 60
Maltrin-M040	140 - 180
Glicerol	60 - 90
Antiespumante	0,5 - 1,5

Estos nutrientes de las dos alimentaciones anteriores se pueden seleccionar de modo que se evite el inicio de una fase de crecimiento.

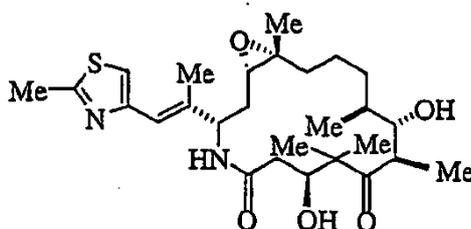
En la presente memoria se divulgan procedimientos para la producción de epotilona B, en los que la epotilona B ("epo B") se convierte en el derivado 1 ("D1") como se describe en la patente de EE.UU. 6.262.094), que tiene la siguiente fórmula:

20

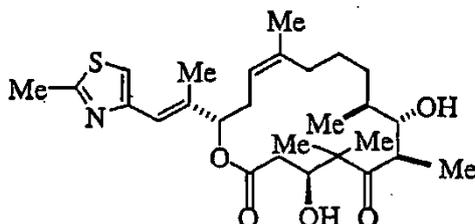


Derivado 1

5 En la presente memoria se divulgan también procedimientos para la producción de epotilona B en los que la epotilona 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 tiene la fórmula:

**Derivado 2**

10 También se divulgan 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 la patente de EE.UU. 6.320.045), que tiene la siguiente fórmula:

**Derivado 3**

15

Formas cristalinas de la epotilona B

Los solicitantes también han elaborado varias formas cristalinas de la epotilona B usando los procedimientos y materiales descritos en la presente memoria. Los cristales de epotilona B se han obtenido usando diferentes disolventes y sistemas de disolventes. Por ejemplo, los solicitantes han descubierto una forma cristalina solvatada de epotilona B que contiene tolueno, denominada en la presente memoria epoB-To β , que tiene los datos de la celda unitaria indicados más adelante en la Tabla 1. La forma cristalina solvatada que contiene tolueno de la epotilona B que se ilustra además con las Figuras 9 a 12 y las Figuras 15 y 16 en el presente memoria. Los solicitantes también han obtenido cristales de epotilona B usando acetonitrilo (es decir, epoB-AN β), acetato de etilo (es decir, epoB-Ea β) y alcohol isopropílico (es decir, epoB-Ip β), así como los sistemas de disolventes que se describen más adelante en los ejemplos. Estas formas cristalográficamente isoestructurales tienen una estructura monoclinica de clatrato con un grupo espacial P2₁ que contiene canales de disolvente lipófilos que se extienden a lo largo del eje b por todos los cristales (1 canal/celda unitaria). 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) tiene como resultado 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 limitar, los disolventes adicionales.

Las formas epoB-TO β , epoB-AN β , epoB-EA β y epoB-IP β exhiben los datos de la celda unitaria 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 cristalinas 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 acetonitrilo 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.

5

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 unitaria												
Forma	T (°)	a(Å)	b(Å)	c(Å)	B	V	Z	V/Z	Sg	d(calc) 1	R	Sitios ideales del disolvente
Epo B - TO β	- 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 - AN β	- 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 - EA β	- 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 - Ip β	- 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.

10

TABLA 2

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
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

ES 2 439 995 T3

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

Átomo	X	Y	Z
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
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

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	
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 - EAB (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

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

Átomo	X	Y	Z	
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	
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

**Coordenadas atómicas fraccionarias para la epotilona B, solvato alcohol
isopropílico, Forma EpoB - IPß (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

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	
C11	0,5261	0,3793	0,6303	
C12	0,4292	0,2892	0,6329	
C13	0,3087	0,2842	0,5528	
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)

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	
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
C1	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
O16	0,3877	0,2964	0,3648
C16	0,7158	0,3123	0,2026
C17	0,8082	0,0907	0,2610
C18	0,9061	0,4961	0,3806
C19	0,9323	0,2951	0,6989
C20	0,4703	0,1447	0,6945
C21	0,1702	0,3170	0,2598
C22	0,1709	0,4486	0,2391
C23	0,0898	0,2230	0,2030
C24	- 0,0145	0,2462	0,1060
C25	- 0,0811	0,1430	0,0546
C26	- 0,1432	0,3561	- 0,0251
C27	- 0,2089	0,4563	- 0,0926
S	- 0,1987	0,1985	- 0,0555
N	- 0,0507	0,3632	0,0580

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	
O1	0,3838	0,1303	0,2676	
O3	0,6742	0,0956	0,3983	
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, Etapa A y mostrado en la Figura 9

Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	Espaciado d (A)	Intensidad relativa (%)	Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	Espaciado d (A)	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	6,6169	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

ES 2 439 995 T3

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

Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	Espaciado d (A)	Intensidad relativa (%)	Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	Espaciado d (A)	Intensidad relativa (%)
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, Etapa B y mostrado en la Figura 11

Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	Espaciado d (A)	Intensidad relativa (%)	Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	Espaciado 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
12,550	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 de acetato de etilo que contiene tolueno, producida usando el procedimiento del Ejemplo 7, Etapa C y mostrado en la Figura 13

Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	Espaciado d (A)	Intensidad relativa (%)	Ángulo de dispersión (grado 2-theta)	Espaciado 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 la presente solicitud, los respectivos significados presentados a continuación:

5 "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 aumentarse de forma adecuada (por ej., a matraces de producción de 125 ml según el Ejemplo 2) , como se describe en los Ejemplos:

1) Etapa F1:

10 Se transfiere un ml desde 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:

15 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:

20 Se inoculan matraces de producción (matraces de 250 ml que contienen 90 ml de medio E, véase más adelante las formulaciones del medio) a un nivel del 10% (10 ml) de la etapa F2. Como alternativa 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 mejorar la proporción entre epotilona B y A. La alimentación comienza 72 horas después de la inoculación, según se indica a continuación:

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

30 La alimentación que contiene propionato contiene 10 % de Maltrin-M040, 4 % de propionato sódico y 3 % de Tastone-154, de tal modo que cuando se añade como una dilución de 100 veces, la concentración final en el caldo de cultivo, al día, se convierte en 0,1 % de Maltrin-M040, 0,04 % de propionato sódico y 0,03 % de Tastone-154 (excluyendo niveles residuales de adiciones previas). Generalmente, los matraces para realizar el ensayo se recogieron 14 días después de la inoculación.

35 "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.

40 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".

45 "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.

"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

50 Los ejemplos siguientes se llevaron a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa lo contrario en detalle.

Ejemplo 1 (Ejemplo de Referencia)**Preparación de la cepa SC16408 por medio de mutación y selección, y preparación de bancos celulares**

5 La cepa SC16408 se obtuvo mediante tratamiento con nitrosoguanidina (NTG) de la cepa So ce90B2 (SC16224) , seguido por selección al azar. Por tanto, la cepa SC16224 se suspendió en tampón Tris-HCl 10 mM 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 de agitación:

Ingrediente	g/l
Leche desgrasada en polvo	4
Harina tostada Nutrisoy	4
Tastone-154	2
Maltrin-M180	10
CaCl ₂ .2H ₂ O	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
EDTA, FeIII, sal de Na	0,008
HEPES	12
Glicerol	4,3

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

15 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. Después, 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.

20 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.

25 Preparación del banco de células de trabajo: 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, 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. Por último, estos 2 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.

30 Ejemplo 2**Cultivo para producir las epotilonas mediante fermentación en matraces de agitación**

35 Las células de un vial congelado (1,5 ml) se inoculan en 45 ml de medio E en un matraz de 125 ml y se cultivan durante 4-8 días a 30 °C y 160 rpm (etapa F1). A continuación, se transfieren 5 ml de la etapa F1 a un nuevo matraz de 125 ml que contenía 45 ml de medio E y se cultivn durante días 3-4 (etapa F2). Las células de la etapa F2 se usan a continuación como un inóculo para las fermentaciones de la epotilona B. El diez por ciento del 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

de agitación:

Medio de producción de epotilona B para matraces de agitación:

Ingrediente	g/l
Leche desgrasada en polvo	4
Harina tostada Nutrisoy	4
Tastone-154	2
Maltrin-M040	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
EDTA, FeIII, sal de Na	0,008
HEPES	12
Glicerol	10
resina XAD-16	16

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

10 La composición de la solución de alimentación para la fermentación de epotilona B en matraz de agitación es: 4% de propionato sódico, 10% de Maltrin M040 y 3 % de Tastone-154. La alimentación (100 ml en un matraz de 250 ml) se ajusta a pH 6,8-7,0 con NaOH y se esteriliza durante 30 minutos a 121 °C. Desde el día 3 al día 14 después de la inoculación, se añade diariamente 0,5 ml de la solución de alimentación a cada matraz de fermentación. Como alternativa, se ha encontrado que se pueden conseguir resultados comparables duplicando los niveles de alimentación y realizando las adiciones los días 3, 5, 7 y 10. También se pueden lograr resultados mejorados suplementando además la solución de alimentación anterior con fosfato, en forma de 1,5% de fosfato sódico dibásico y 0,5% de fosfato sódico monobásico, 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 mejoras adicionales del rendimiento (en cuanto a la epotilona B) de hasta un 10-20 % a través de la suplementación con fosfato.

20 Para el ensayo de epotilonas, se recogen muestras de resina (0,8 g) y se analizan mediante HPLC. La producción de epotilona en matraces de agitación debe producir los siguientes títulos a los 14 días:

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

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

Ejemplo 3

Cultivo para producir las epotilonas en fermentadores de 14 l

Etapa F1:	Se inocula una alícuota de 3, 0 ml de dos viales congelados en 90 ml de medio E en un matraz de 250 ml y se cultiva durante 4-8 días a 30 °C y 160 rpm.
Etapa F2:	Se transfieren 20 ml (10%) de las células de la etapa F1 a 180 ml de medio E en un matraz de 500 ml y se incuban durante 2-4 días a 30 °C y 160 rpm.

ES 2 439 995 T3

Etapa F3:	Repetir la etapa F2 para aumentar la cantidad de inóculo. Transferir 20 ml de inóculo de la etapa F2 a 6-8 matraces de 500 ml, conteniendo cada uno 180 ml de medio E e incubar los matraces 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.

5 El medio E se usa para generar el inóculo para un fermentador de 14 l. Los tiempos de autoclave para las etapas de matraz en agitación 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 modificado para matraz de agitación (como se ha descrito anteriormente), en el que se ha suprimido HEPES y se han añadido 2,5 g/l de un agente antiespumante (Antiespumante AF, de Dow Corning). Se dispensan 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 del procedimiento a escala del fermentador de 14 l:

Parámetros del procedimiento del fermentador de mesa:

10

	F1 a F4	14 l
Temperatura	30 °C	32 °C
Presión		0,07 MPa
Flujo de aire		0,25 w/m
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
Tiempo de esterilización de los medios	30 min	60 min
Resina		15 - 30 g/l

Composición de nutrientes de la alimentación:	Se prepara una solución compuesta de Maltrin M040- 4,1 % y Tastone-154 1,3 % en un frasco 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:	5,0% de propionato sódico (1, 5 l en un frasco 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. 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

Procedimiento de fabricación de epotilonas

Etapa de sembrado en fermentador de 50 l:

5 Para la etapa F1, se prepara y se dispensa el medio E (2 l), 90 ml en cada uno de 17 matraces distintos de 250 ml. Los matraces se esterilizan a continuación en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Las células de un vial congelado se inoculan en cada matraz y se cultivan durante 4-8 días a aproximadamente 30° C y 160 rpm.

10 Para la etapa F2, se preparan y se dispensan 27 l de medio E, 1,5 l en cada uno de 17 matraces distintos de 1,5 l, a continuación, se esterilizan como en lo que antecede. A cada matraz de 4 l se inocula todo el contenido de un matraz de la etapa F1, a continuación se cultiva durante 2-4 días a aproximadamente 30 °C y 160 rpm.

Para la etapa F3, se preparan 80 l de medio E * y se dividen en dos fermentadores de siembra de acero inoxidable de 50 l y a cada fermentador de 50 l se inocula el contenido de tres matraces de 4 l de la etapa F2. Los fermentadores de 50 l se cultivan durante 2-4 días a 30-33 °C, después se combinan y se usan para inocular un fermentador de 800 l.

15 El medio E* es:

Ingrediente	g/l
Leche desgrasada 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 de Na	0,012
Glicerol	5,4
Antiespumante	2,5

Etapa de sembrado en fermentador de 800 l:

20 El inóculo se cultiva en un fermentador de 800 l de acero inoxidable hasta que la masa celular es suficiente para inocular la siguiente etapa de sembrado (un fermentador de 5.000 l).

El medio E* para el lote está formado por agua desionizada (400 l) y la mezcla, a 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 ajusta a pH 7, 1-7, 3. Al fermentador se inocula a continuación 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:	de 0,5-0,7 w m
Temperatura:	30 - 33° C	pH:	7,1 - 7,3
Velocidad del agitador:	eje 50 - 60 rpm		

5 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. Se obtienen muestras del lote a intervalos y se analiza para determinar la esterilidad, el pH, los sedimentos y la 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 disminuir, el contenido del fermentador de 800 l (aproximadamente 440-480 l) se transfiere a un fermentador de 5.000 l.

Etapa de sembrado en fermentador de 5.000 l:

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

15 El medio E*, preparado como en lo que antecede (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 disminuir, el contenido del fermentador de 5.000 l se transfiere al fermentador de 40.000 l.

Etapa de producción en fermentador de 40.000 l:

20 En la producción de las epotilonas Se usa un fermentador de 40.000 l de acero inoxidable. Una vez que el fermentador se ha esterilizado y llenado con medio estéril, se inocula con la siembra preparada en el fermentador de 5.000 l. Una vez que se alcanzan los parámetros de producción específicos, 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:

Ingrediente	Cantidad
resina XAD-16 16 lavada	15 - 40 g/l

25

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

Ingrediente	Peso (kg)
Leche desgrasada 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 de Na	0,22

Ingrediente	Peso (kg)
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 w. Según sea necesario, el pH (entre 0 y 80 horas) se aumenta con sosa cáustica. Después de 80 horas, se disminuye el pH con ácido sulfúrico. Según sea necesario, la formación de espuma se controla con antiespumante. Se obtienen muestras del fermentador al menos una vez al día para determinar la esterilidad, el pH, los sedimentos concentración de glucosa, propionato y de epotilona B. El CO₂ en el gas de escape se monitoriza y se registra. La alimentación se inicia aproximadamente a las 30-60 horas, siempre y cuando el CO₂ sea de al menos el 0,3 %.

10 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 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.

15 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 ingredientes se añaden a agua desionizada (3.000 l) y se esterilizan a 117 kPa, 124 °C durante 75 minutos. La alimentación comprende:

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

20 Durante el procesamiento, algunos de los componentes del medio, como la leche desgrasada en polvo, Maltrin-M040 y el 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 ingredientes se añaden al agua desionizada (3.000 l) y la mezcla, pH 8, 7-8, 9, se esteriliza a 117 kPa, 124 °C durante 75 minutos:

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

25 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.

Ejemplo 5

30 **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 pasta. La resina empaquetada se lava con metanol acuoso (1 volumen de lecho cada uno de 30%, después de 50% de MeOH) 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 al vacío hasta una concentración de aproximadamente 20 a 45 g de epotilona B por l. Después de calentar hasta 70 °C, el lote se enfría lentamente hasta aproximadamente 0 °C para dar una pasta cristalina que se filtra, se lava con EtOAc frío y se seca hasta menos de 40 °C para dar epotilona B recristalizada aislada (rendimiento del 84 % 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) empaquetada 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 al 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 efluente se monitoriza a 290 nm mediante un detector UV. El pico del producto epotilona B se recoge en varias fracciones. Las fracciones se analizan mediante 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 pasta 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 indicó un 99,6 % de área epotilona B, 0,4 % de área de epotilona A, sin presencia otra impureza >0,1 % de área.

Ejemplo 6

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 aclarar la resina con agua. A continuación se añade al recipiente acetato de etilo (aproximadamente 2 volúmenes de lecho (VL) de resina de entrada). La pasta se agita durante aproximadamente una hora y se centrifuga a 3.500 rpm durante 5 minutos usando frascos de centrifuga 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 combinan en el recipiente y se añade acetato de etilo (2 VL) al recipiente. La pasta se agita durante aproximadamente 1 hora y después se centrifuga para obtener capas separadas. Los segundos sobrenadantes ricos en acetato de etilo se decantan 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 aproximadamente 30 minutos. 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 hasta aproximadamente 18°C durante aproximadamente 1 hora, después se agita durante aproximadamente 16 horas a esta temperatura para producir cristales del 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

5 ml) se pre-equilibra 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.

10 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, el caudal 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 el valor basal (< 10 % de la altura de pico), se bombea 100% de acetonitrilo a través de la columna. Cuando el cromatograma indica que la absorbancia a 290 nm ha regresado esencialmente al valor basal, se inicia el re-equilibrado de la columna para la próxima tanda bombeando una solución de 40% de acetonitrilo -agua en la columna. Generalmente se usan 2 VL de 100% de acetonitrilo y 3 VL de 40% de acetonitrilo para lavar y volver a equilibrar la columna.

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

25 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). Por último, 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.

30 Ejemplo 7

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 normal y aislamiento final de epotilona B de alta calidad

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

35 La resina rica en epotilona B lavada con agua (1.350 g) se carga en una columna. Se usa agua (2.700 ml) para cargar y aclarar la columna. La actividad epotilona se eluye haciendo pasar 9.450 ml (7 volúmenes de lecho) de acetato de etilo a través de la columna. El eluido 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 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 concentran 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 pasta 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 la pasta). (En varias repeticiones de este procedimiento, el licor 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. Como alternativa, 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.

50 El peso de la torta de epotilona B primaria desecada variaba desde 8,4 hasta 20 g, y la potencia variaba de epotilona B desde 650 hasta 713 µg/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.

Para cinco lotes evaluados:

Entrada de peso (g)	de Ensayo (g de epo B/KG)	Entrada de epo B(g)	de Epo B en la torta primaria (g)	% de recuperación
1327 - 1391	4,4 - 12,2	6,0 - 16,5	5,5 - 13,6	87 - 98

5 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 desde 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.

Etapa B. Recristalización de epotilona B:

10 Se añade EtOAc (0,14 l) a 15 g de epotilona B de grado primario (710 µg/mg) y se calentó a 65-68 °C con agitación. (La concentración objetivo de la 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 pasta resultante se mantiene a 65 °C durante de 0,25 horas a 1 hora. El lote se enfría a continuación hasta 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. Después, la pasta cristalina resultante se filtra y la torta se lava con tolueno (2 x 0,028 l). Generalmente, en el licor madre y en el lavado combinados se pierde menos del 3 % de la actividad de la epotilona B de entrada. La torta se seca en un horno de vacío a 42 °C y 98 kPa durante 2 horas. Como alternativa, la torta se seca en un horno de vacío a una temperatura entre aproximadamente 40 °C y la temperatura ambiente y 98 kPa 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 %

25 El patrón de PXRD y el análisis térmico del solvato cristalino obtenido siguiendo el procedimiento descrito en esta etapa se muestran en las figuras 11 y 12, respectivamente. El patrón de PXRD de la Figura 11 se caracteriza además por los datos presentados en la Tabla 7 anterior.

Cromatografía en fase normal:

Se preparan las siguientes fase móviles:

Solución al 20 % (v/v) de acetato de etilo/n-heptano (~ 10 l),

Solución al 40 % de acetato de etilo/n-heptano (- 10 l), y

30 100% de acetato de etilo (~10 l).

Se fija el equipo siguiente:

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).

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

40 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 micrómetro para eliminar cualquier partícula que pudiera estar presente. Se usa cloruro de metileno (2-5 ml) para aclarar el filtro. El filtrado rico en cloruro de metileno se inyecta en la columna a un caudal inicial de 5 mU/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 aclarado 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 el caudal 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:

	Tiempo	Flujo (ml/min)	% de acetato de etilo/heptano			volumen ml	volúmenes de lecho VL
			A	B	C		
	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 %.

- 5 Opcionalmente, la cromatografía se realiza de manera similar usando una etapa de elución isocrática de 40% de acetato de etilo/n-heptano, siendo la etapa de lavado de la columna con acetato de etilo al 100 % similar, seguido por reequilibrado 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 gm con 31-35 g de epo B eluida en 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.

Etapa C: cristalización final:

- 15 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 20 aproximadamente 200-210 g/l). Al concentrado se añade heptano caliente (aproximadamente 40 °C) (50 ml). Como alternativa se puede añadir EtOAc (50 ml) caliente (aproximadamente 40 °C) al concentrado en esta etapa. La pasta resultante se agita a aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 2 horas, a continuación se enfría hasta
- 20 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 pasta cristalina se filtra y la torta se lava con EtOAc/heptano 1:1 (25 ml) frío. Los sólidos se secan al vacío en un horno a 40-45 °C durante 5-6 horas. Como alternativa, los sólidos se secan en un horno de vacío a una temperatura entre aproximadamente 40 °C y la temperatura ambiente durante 5-6 horas. El peso de la epotilona B aislada (para
- 25 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 el licor madre 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
- 30 mediante HPLC es superior a 99,7 por ciento del área. El patrón de PXRD y el análisis térmico del solvato cristalino obtenido siguiendo el procedimiento descrito en esta etapa se muestran en las figuras 13 y 14, respectivamente. Como puede verse en la Figura 14, el punto de fusión para el solvato de 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 presentados en la Tabla 8 anterior.
- 35 Como alternativa, las fracciones transferidas combinadas que contenían 4,83 kg de Epo B (1.790 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 pasta 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

5 Extracción de epotilona B de la resina, seguida 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 en una columna (700 l). La columna se drenó y se introdujeron burbujas de nitrógeno. A continuación se eluyó acetato de etilo (2.969 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 eluido combinado rico en acetato de etilo se dejó sedimentar por la gravedad durante ~ 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 (total ~115 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 pasta fría se mantuvo a ~ 0 °C durante ~ 1 hora. Después, la pasta cristalina resultante se filtró 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).

20 La primera recristalización se realizó 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.

25 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 etiltiazol = 0,56). No se detectaron otras impurezas mediante 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 %.

30 Ejemplo 7B (Ejemplo de referencia)

Recuperación de la Epo B de las corrientes del licor madre

Los licores madre 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 A 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 pasta se enfrió hasta temperatura ambiente durante 1 hora, después se agitó durante 90 minutos. Después, la mezcla se volvió a calentar hasta ~ 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. El licor madre contenía un 66 % de la epotilona A de entrada y sólo el 5 % de la epotilona B de entrada.

Ejemplo 7C

45 Las fracciones transferidas combinadas (200 ml), del procedimiento de cromatografía de fase normal expuesto 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 (85,3 % p/p de Epo B). La pureza mediante 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. El licor madre y el lavado contenían sólo el 0,5 % de la actividad de epotilona B de entrada.

55 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 Figura 16.

Ejemplo 8 (Ejemplo de Referencia)**Preparación de formas cristalinas específicas****Ejemplo 8A: Preparación de epoB-TOB****Preparación solvato de tolueno de epotilona B**

5 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 ml. 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 pasta se usó para la determinación de la estructura de rayos x.

10 La estructura molecular de la forma de celda unitaria 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**Preparación solvato de acetonitrilo de epotilona B**

15 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 pasta de cristales a partir de acetonitrilo-agua. La pasta de cristales se examinó directamente por difracción de rayos x.

20 La estructura molecular de la forma de celda unitaria 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**Preparación solvato de EtOAc de epotilona B**

25 Una solución de epotilona B en EtOAc/heptano 1:1 se concentra a una concentración objetivo de ~ 190-195 g/l. A esta pasta espesa de la epotilona B, se añaden con agitación 10 volúmenes de EtOAc a ~ 40 °C. La pasta 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. Después, la pasta se filtra y la torta se lava con EtOAc/heptano 1:1 frío. La torta se secó en el horno de vacío durante 5-6 horas para dar la torta de epotilona B final con ~ 5-14 % de EtOAc.

30 La estructura molecular de la forma de celda unitaria 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-IPB**Preparación solvato de AIP de epotilona B**

35 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 hasta la 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 pasta húmeda se sometieron a análisis de rayos X.

40 La estructura molecular de la forma de celda unitaria 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 lactona)**

45 Se prepara una solución de una azida de tetrabutilamonio (azida TBA) mezclando cloruro de tetrabutilamonio y azida sódica en THF/DMF. La solución de azida TBA resultante se recuperó por eliminación de cristales de NaCl por filtración. En un matraz con agitación se carga una cantidad catalítica de un agente tal como tris (dibencilidenacetona) dipaladio o el aducto de cloroformo de este catalizador seleccionado para estabilizar un catión alílico, cloruro amónico, epotilona B y la solución de THF/DMF de la azida TBA. La pasta se desoxigena mediante 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 hasta 18-24 °C y se filtra para eliminar los sólidos. Los sólidos se lavan 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 enfría a 0-12 °C, se inactivó con agua mientras se mantenía la temperatura <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 pasta se calienta a 67-78 °C durante 45-60 minutos. La pasta 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

La epotilona B se convierte en epotilona F por hidroxilación enzimática del grupo 2-metil 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 de EE.UU.10/321.188, presentada el 17 de diciembre de 2002 y el documento WO 00/39276, ambos incorporados en el presente memoria por referencia.

Se añade la epotilona B en etanol (5 % v/p) 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 50% de hidróxido sódico p/v o 30% de ácido sulfúrico 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 o SP207 capaz de adsorber o epotilona F se añade al tanque de fermentación (5 % v/p) y se agita durante 16-72 horas a 10-18 °C. El caldo de fermentación se decanta y la resina se lava con agua (proporción agua-resina 2:1) . El lavado se repite dos veces más. La mayor parte del agua residual se elimina mediante filtración en un embudo Buchner.

La resina XAD-16, 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 µM. El producto se destila a continuación a vacío y la epotilona F primaria se cristaliza mediante la adición de tolueno con agitación como un antidisolvente. La mezcla rica en tolueno se concentra adicionalmente para reducir el contenido de acetato de etilo y se añade más tolueno. La pasta cristalina se filtra y se lava con tolueno .

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).

El producto se eluye 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 controlan mediante detección UV a 290 nm. El pico del producto epotilona F se fracciona para reducir al mínimo las impurezas eluyentes. Las fracciones combinadas ricas se destilan al vacío hasta una concentración objetivo de aproximadamente 100 g/l. A la pasta de epotilona F se añade con agitación un volumen igual de n-heptano. El lote se vuelve a destilar al vacío hasta una concentración objetivo de aproximadamente 100 g/l, se añade acetato de etilo y la pasta se mantiene a 40 °C. El lote se enfría hasta 2-10° C y se mantiene durante al menos 5 horas a esa temperatura para cristalizar el producto de la solución. La pasta 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.

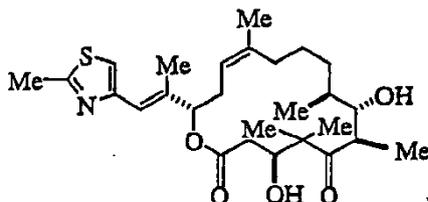
Se añade lentamente 1, 8-diazabicyclo[5.4, 0]undec-7-eno (DBU, 1,8 eq) a una suspensión de epotilona F y difenilfosforilazida (1,5 eq) en tetrahidrofurano (previamente secado sobre 3A MS) y la reacción se agita a 15-25 °C durante 12-24 horas. Se añade lentamente a la mezcla de reacción una solución de trimetilfosfina/tetrahidrofurano (1,0 M, 1,1 eq). Se añaden agua e hidróxido amónico 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 evapora hasta sequedad para dar el derivado de amino crudo (Derivado 1) funcionalizado en el grupo metiltiazol.

El producto bruto se purifica mediante cromatografía en columna usando gel de sílice pre-tratado con 2,5% de metanol, 0,2% de trietilamina-diclorometano. Las fracciones de calidad adecuada se combinan, se microfiltran y se

5 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 aísla mediante filtración seguida de secado al vacío para dar el derivado amino cristalino purificado (derivado 1) con un rendimiento promedio 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



10

[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].

15 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 hasta 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), y las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y los compuestos volátiles se eliminaron al vacío. El residuo se cromatografió con EtOAc al 35%/hexanos para dar el compuesto del título (7,0 mg, 0,014 mmol). EM (m/z): 492,3 ($\text{M}^+\text{+H}$).

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar epotilona B de un microorganismo productor de epotilona, que comprende:
 - (a) fermentar una cepa de un microorganismo productor de epotilona en presencia de una resina que adsorbe epotilona B mediante interacción hidrofóbica;
 - 5 (b) recoger la resina en un medio a base de agua;
 - (c) extraer la resina con un disolvente seleccionado para extraer epotilona B y para separarlo del medio a base de agua; y
 - 10 (d) cristalizar la epotilona B de la fase de extracción antes de una etapa de cromatografía; en el que dicha etapa de fermentación comprende además alimentar con un aditivo capaz de mejorar la cantidad de epotilona B producida en comparación con la cantidad de epotilona A producida y en el que dicho aditivo es una sal o éster de ácido propiónico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la epotilona B de la etapa (d) es sustancialmente puro.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la resina es extraída con un disolvente polar.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de fermentación comprende además fermentar dicho microorganismo productor de epotilona en presencia de leche desgrasada, harina de soja, extracto de levadura, almidón de maltrina y/o glicerol.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de fermentación comprende alimentar de forma continua con el aditivo capaz de mejorar la proporción entre la epotilona B y la epotilona A.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho aditivo es propionato sódico, éster metílico de ácido propiónico o éster etílico de ácido propiónico.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende:
 - (e) al menos una segunda etapa de cristalización eficaz para reducir la cantidad de epotilona A hasta aproximadamente 55% o menos de la cantidad de epotilona A presente después de la etapa de cristalización (d).
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el microorganismo productor de epotilona es *Sorangium cellulosum*.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicho microorganismo es la cepa de *Sorangium cellulosum* en la ACTCC N° PTA 3880.
- 30 10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicho microorganismo es la cepa de *Sorangium cellulosum* en la ACTCC N° PTA 3881.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la resina es un polímero basado en estireno/divinilbenceno.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la resina está presente en un intervalo de aproximadamente 0,2 e/v % a aproximadamente 5,0 p/v %.
13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la resina es XAD-16.
- 35 14. El procedimiento de la reivindicación 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 escasamente soluble.
 - (ii) eliminar al menos una porción del disolvente de extracción; y
 - (iii) pasar el disolvente resultante o mezcla de disolventes hasta una temperatura a la que la epotilona B cristaliza.
- 40 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el disolvente de extracción es acetato de etilo o MTBE, y el segundo disolvente es tolueno.
16. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:
 - (f) antes de la etapa (c) lavar la resina con acetonitrilo acuoso, o metanol acuoso, o un medio acuoso que contiene un detergente y un reactivo amina añadido en forma de base, el medio acuoso seleccionado para que no eluya la epotilona B.
- 45

17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende además filtrar por pulido el disolvente que contiene epotilona B.
18. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que microorganismos productores de epotilona producen al menos 80 mg de epotilona B por litro de caldo o 5 mg de epotilona B por gramo de resina y en el que la epotilona B y la epotilona A se producen en una proporción de epotilona B/A de al menos uno.
19. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la epotilona B y la epotilona A son producidas en una proporción de epotilona B/A de al menos 1,5.
20. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la epotilona B y la epotilona A son producidas en una proporción de epotilona B/A en el intervalo de 1,5 a 4,0.

5

10

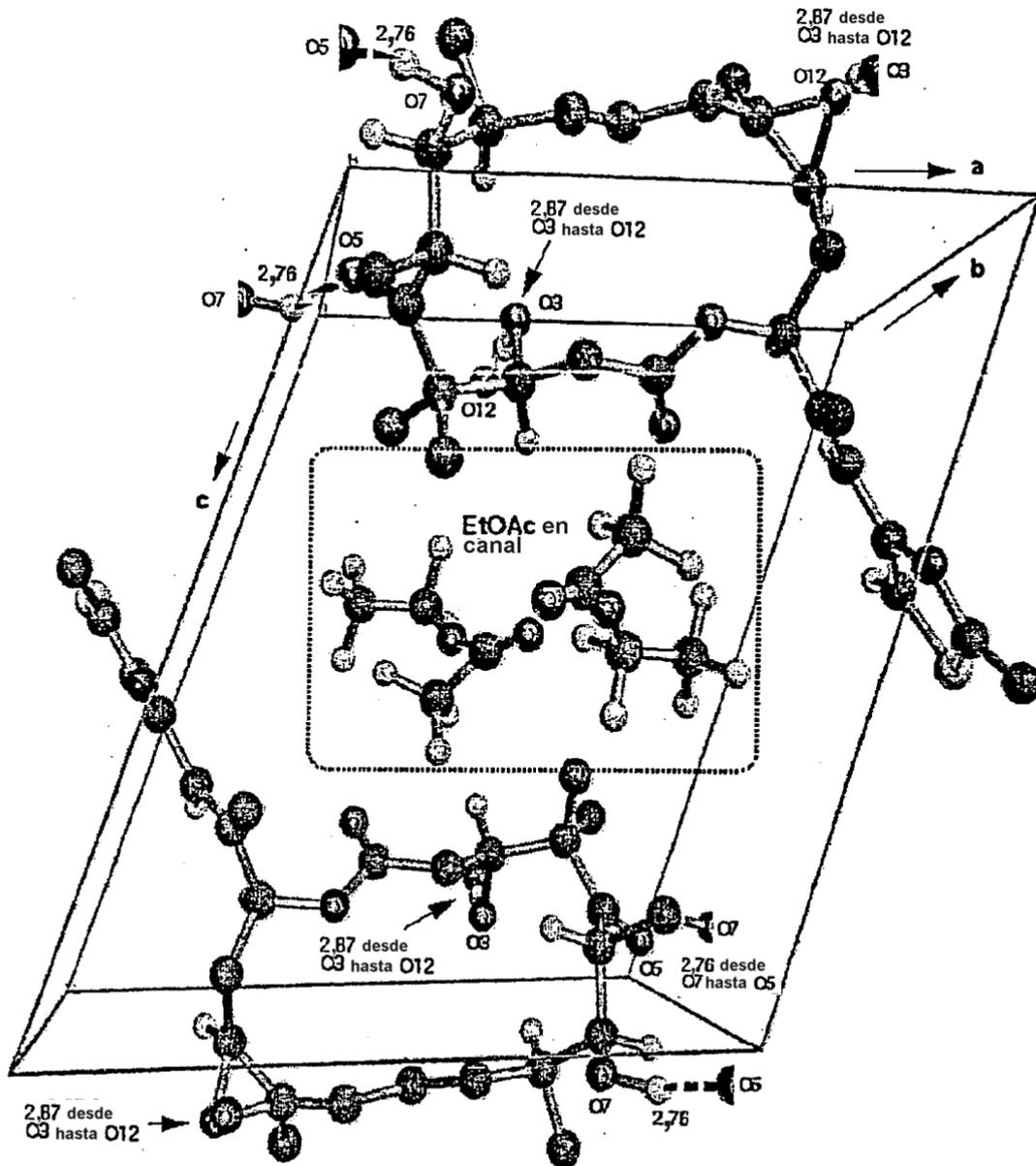


Figura 1

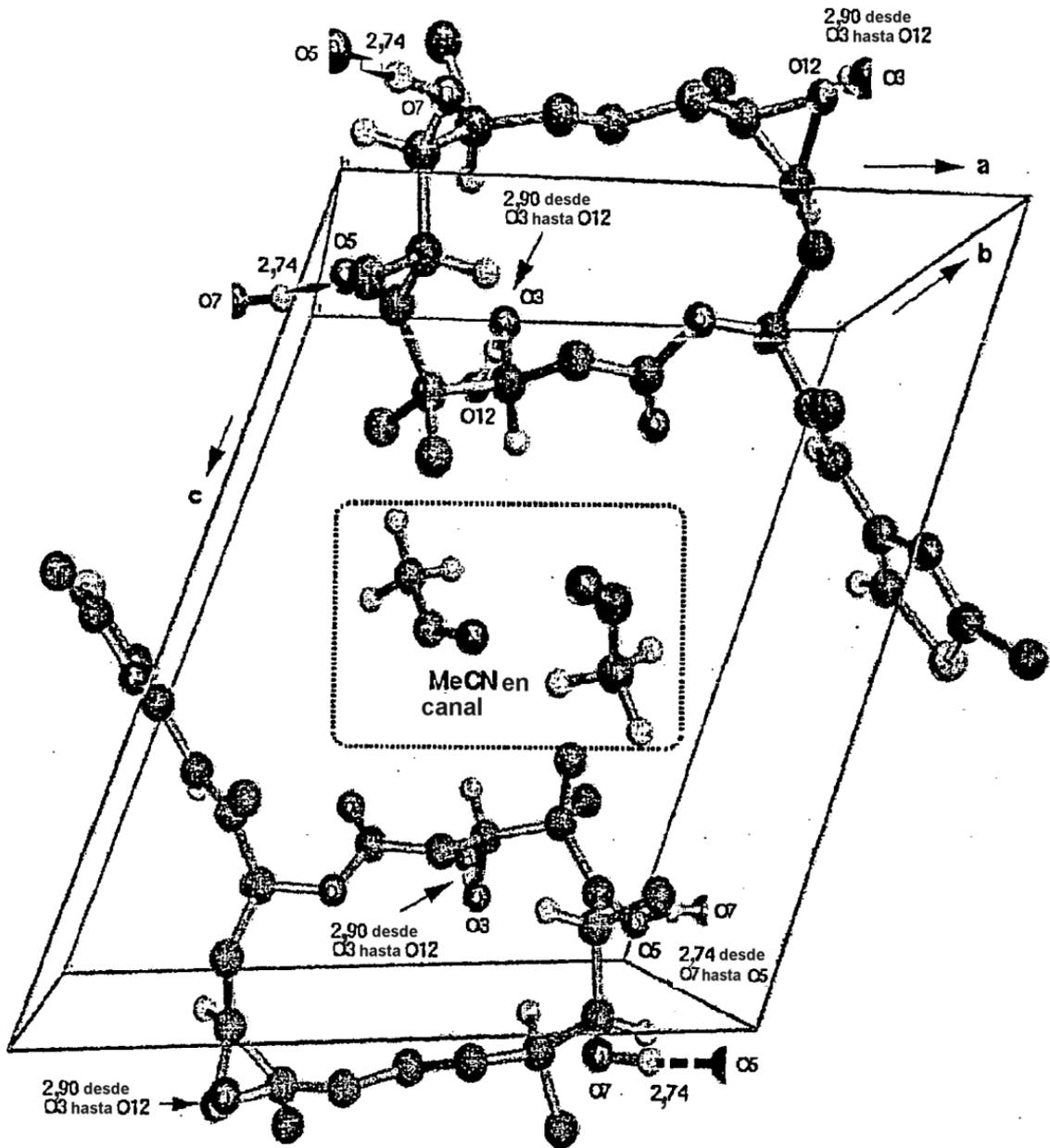


Figura 2

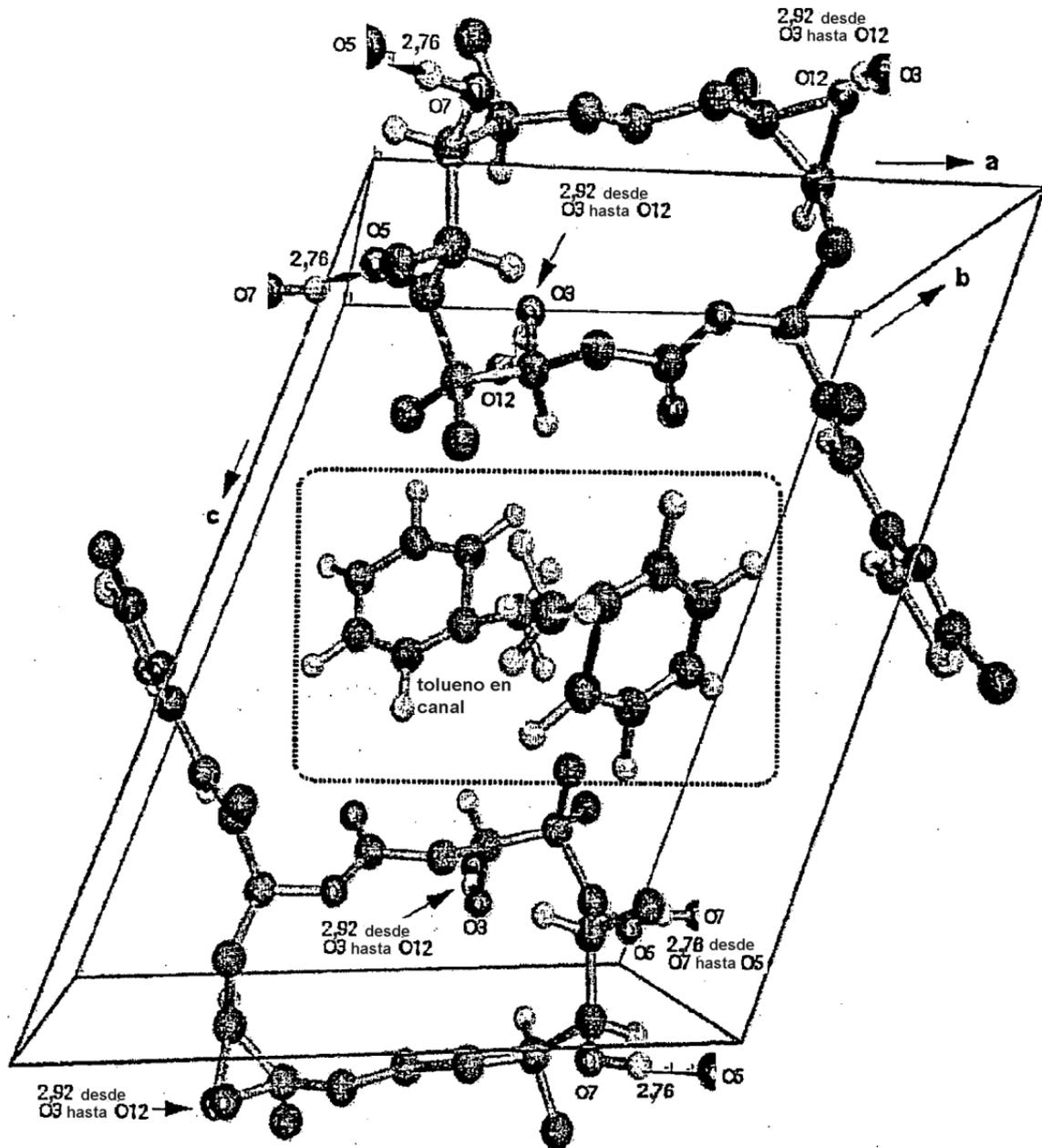


Figura 4

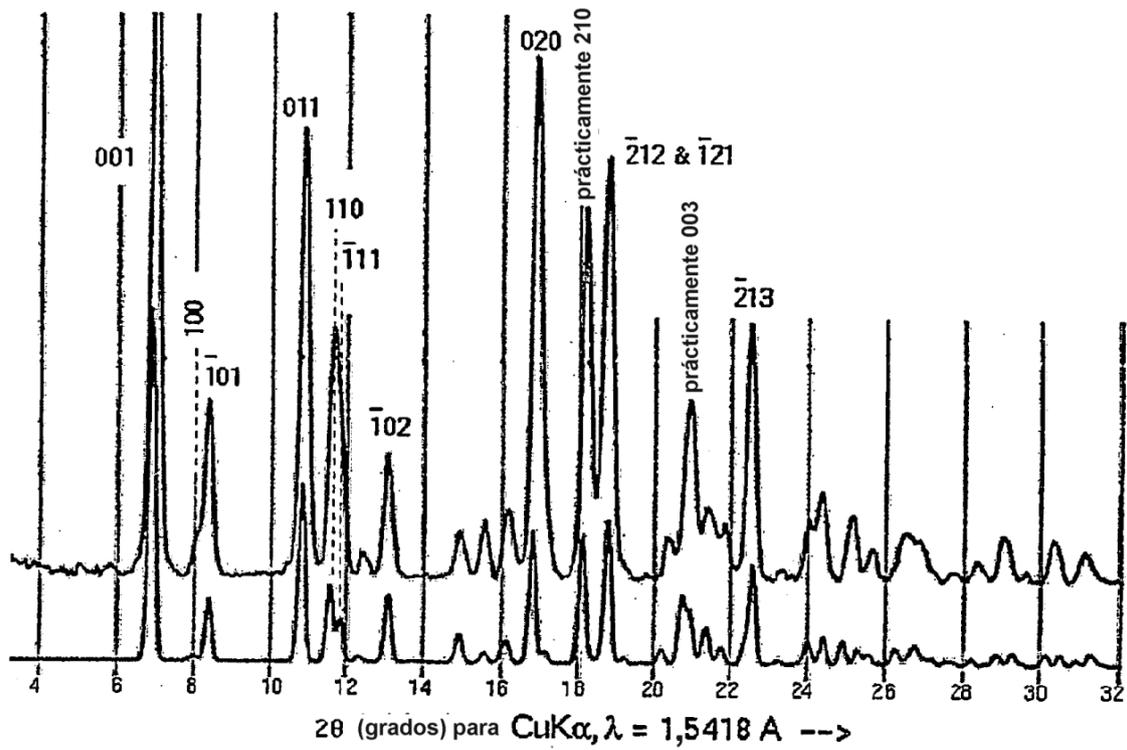


Figura 5

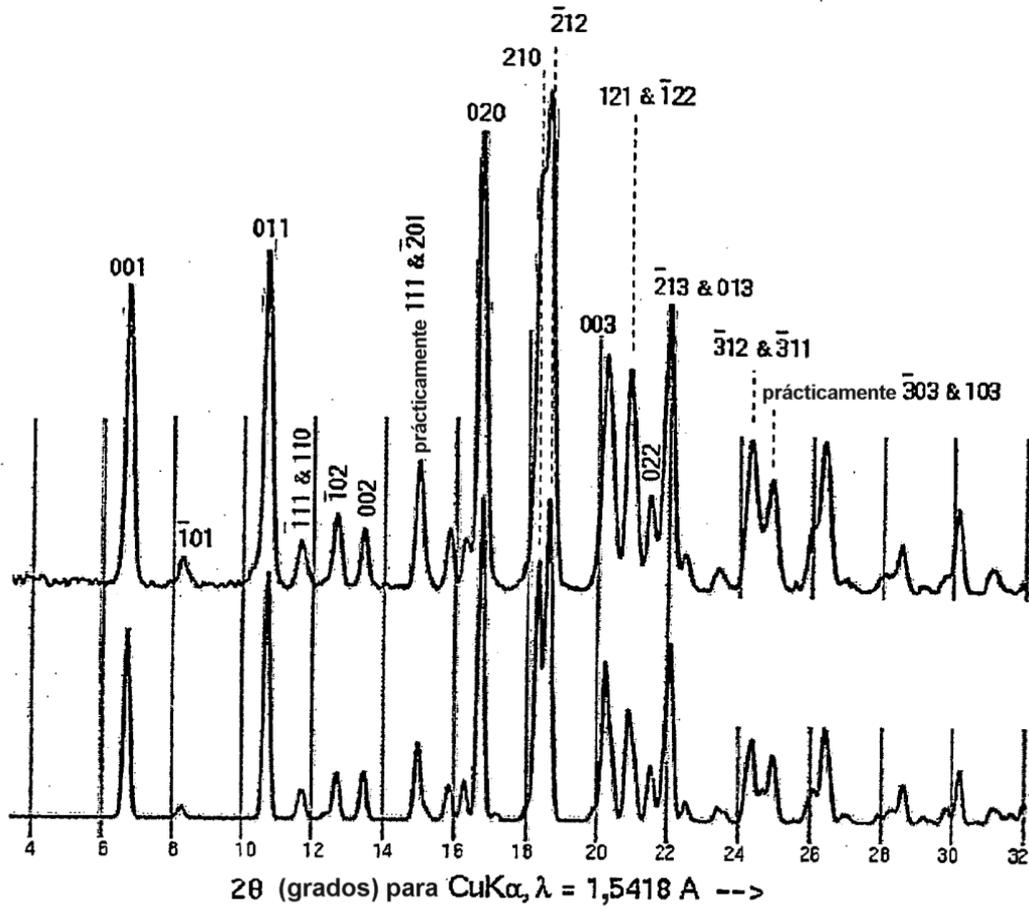


Figura 6

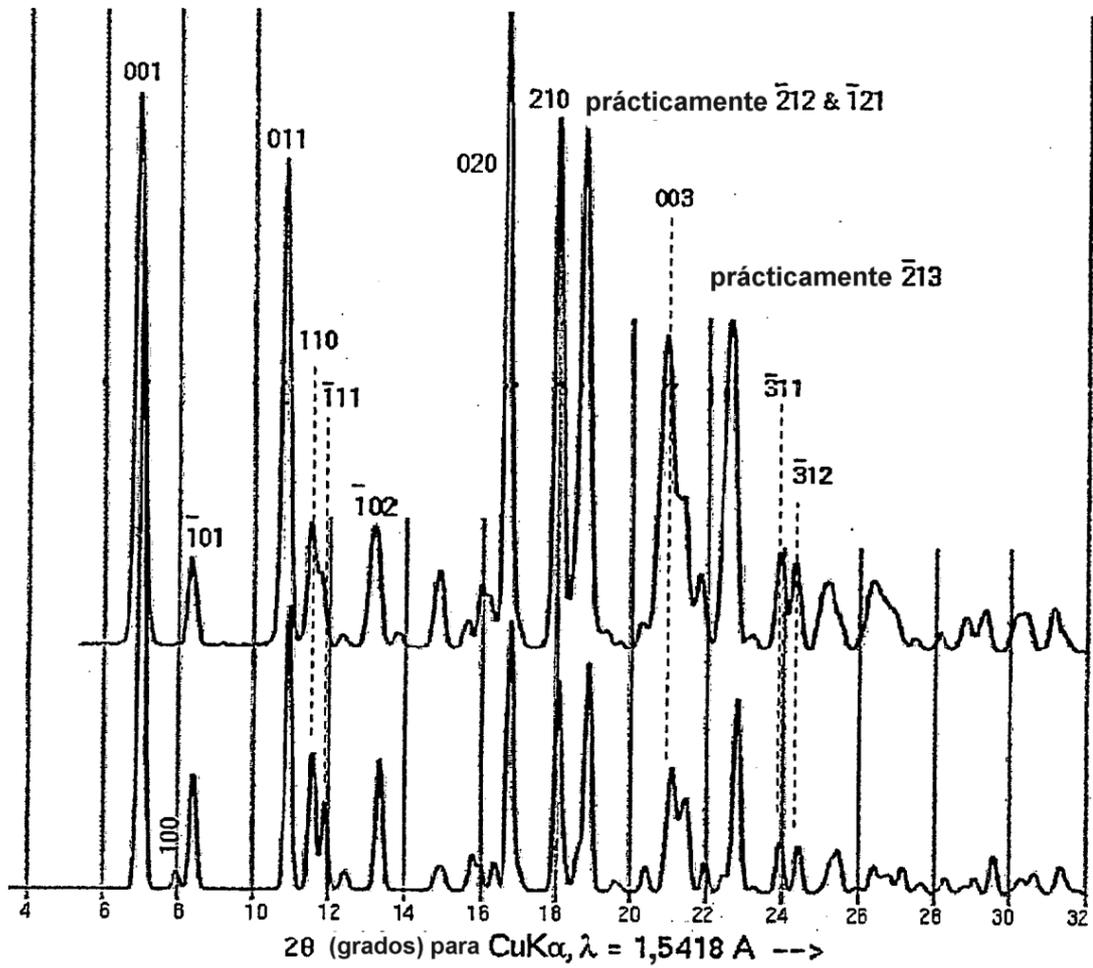


Figura 7

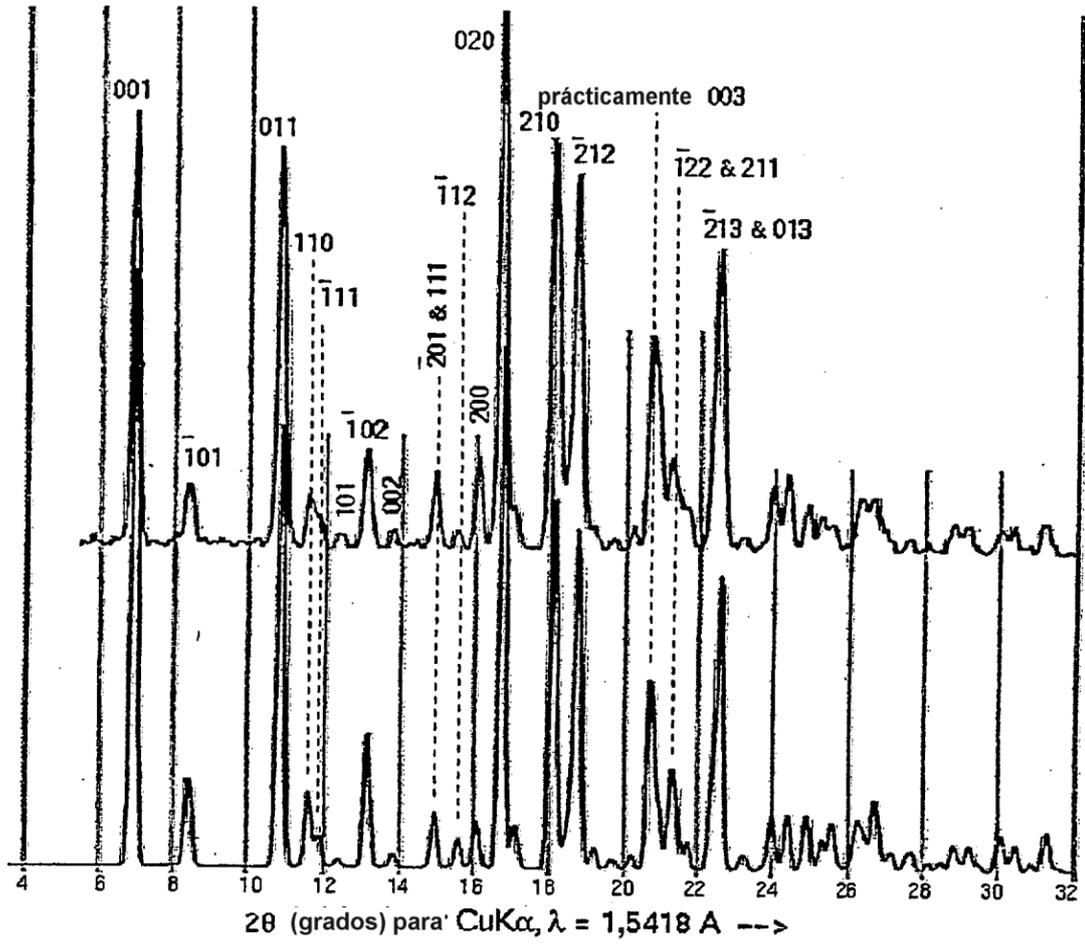


Figura 8

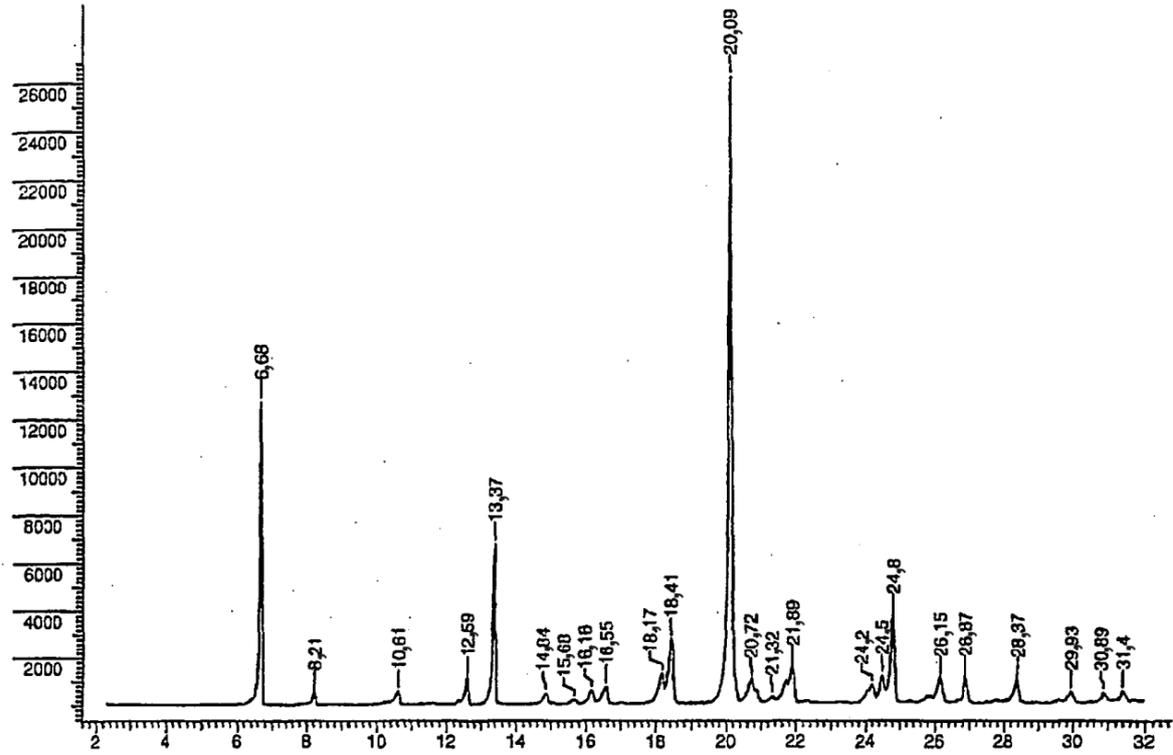


Figura 9

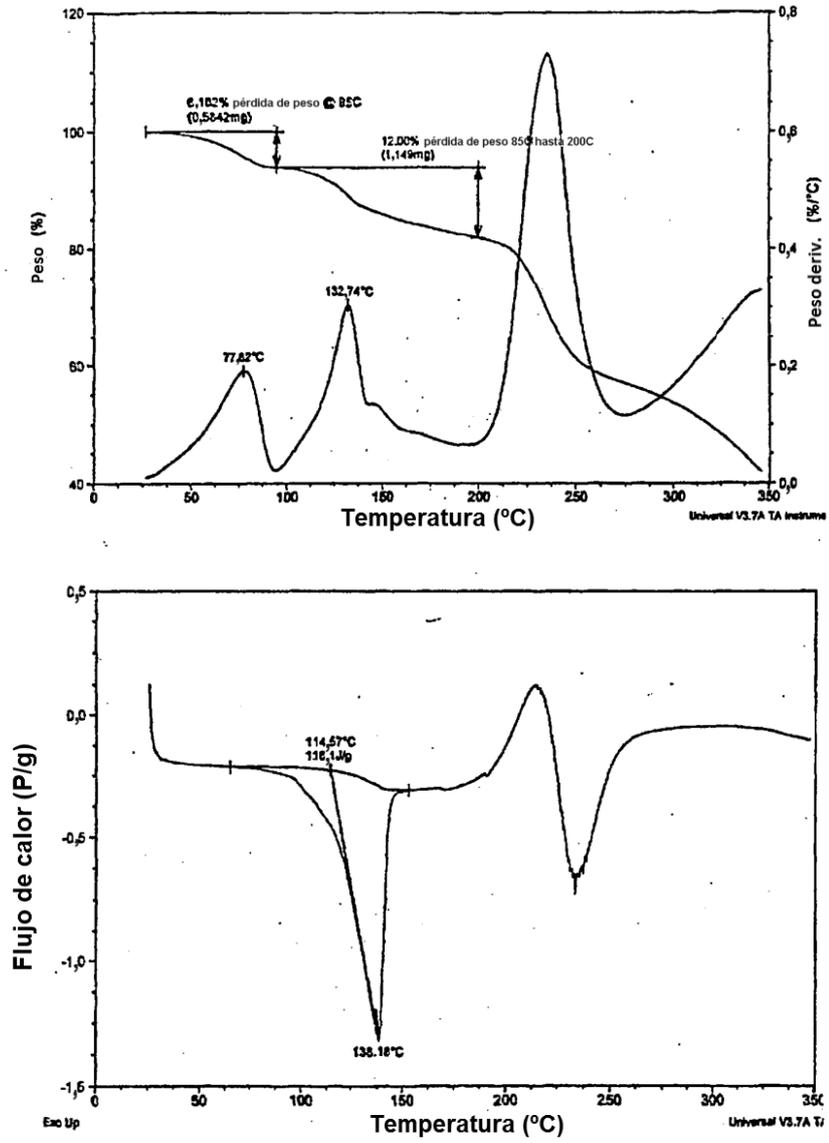


Figura 10

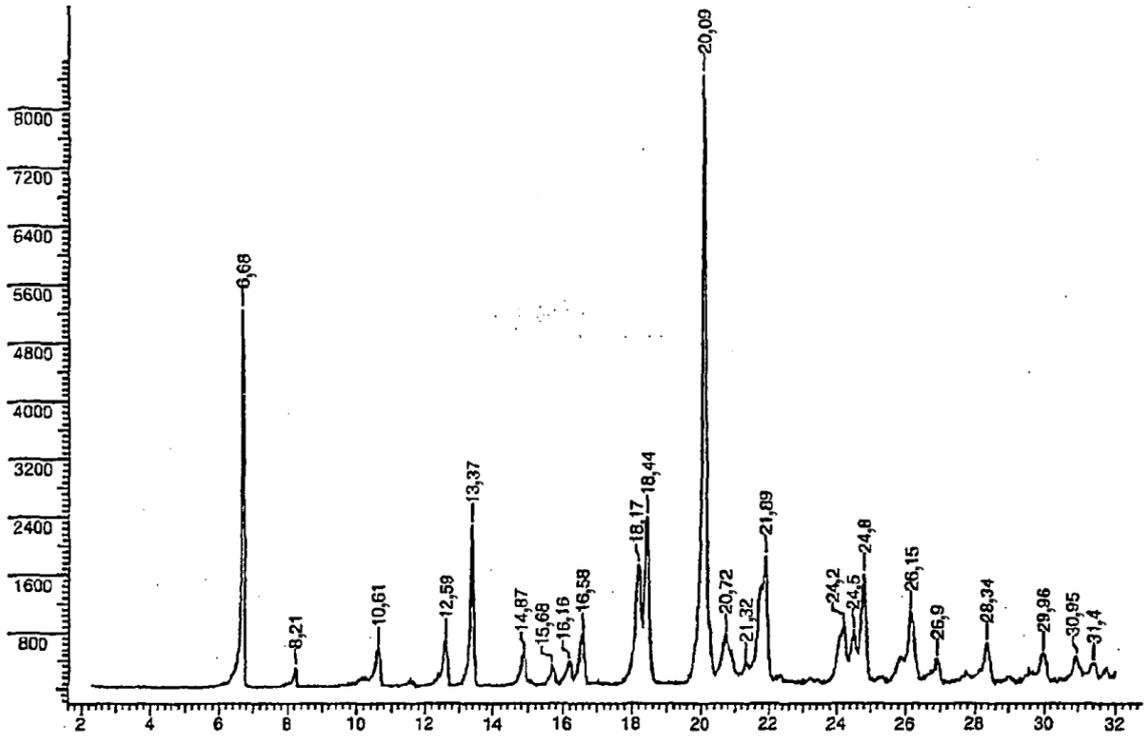


Figura 11

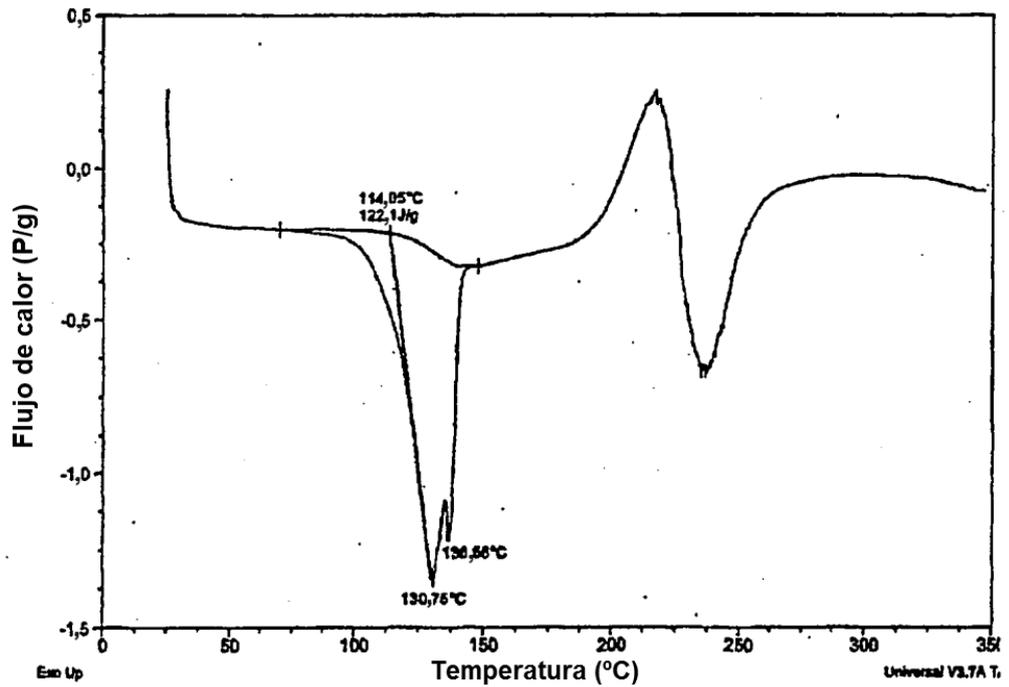
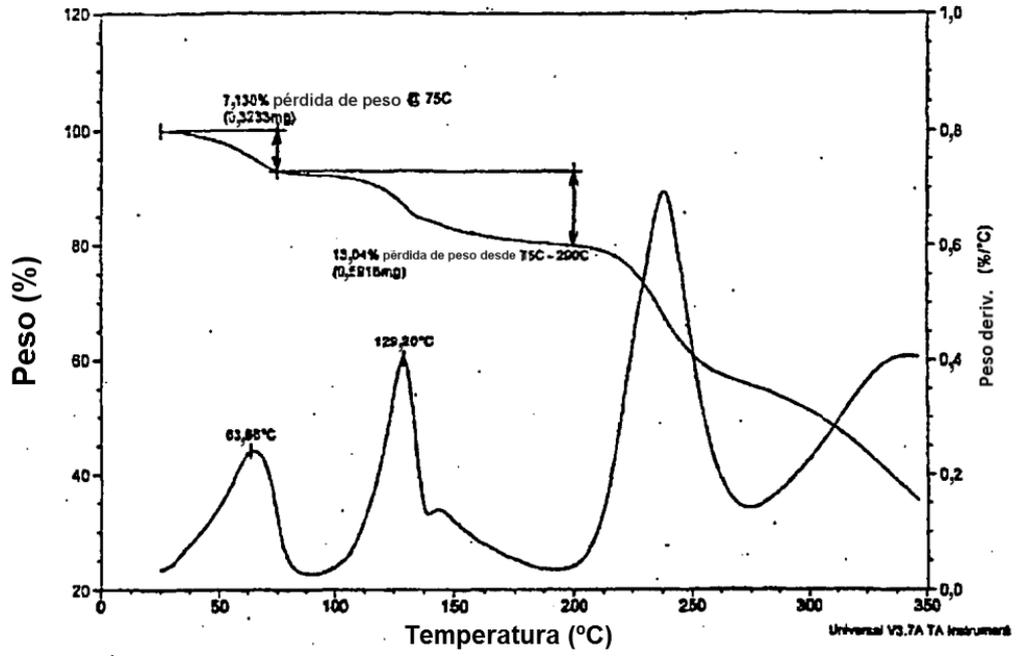


Figura 12

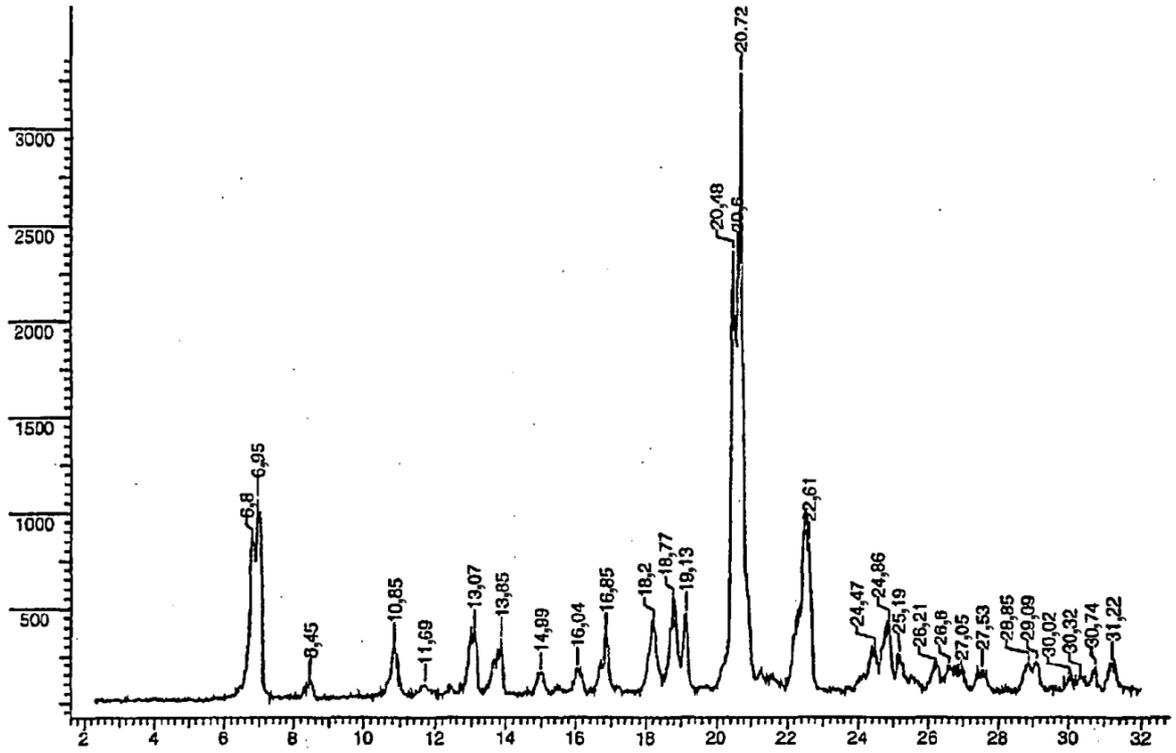


Figura 13

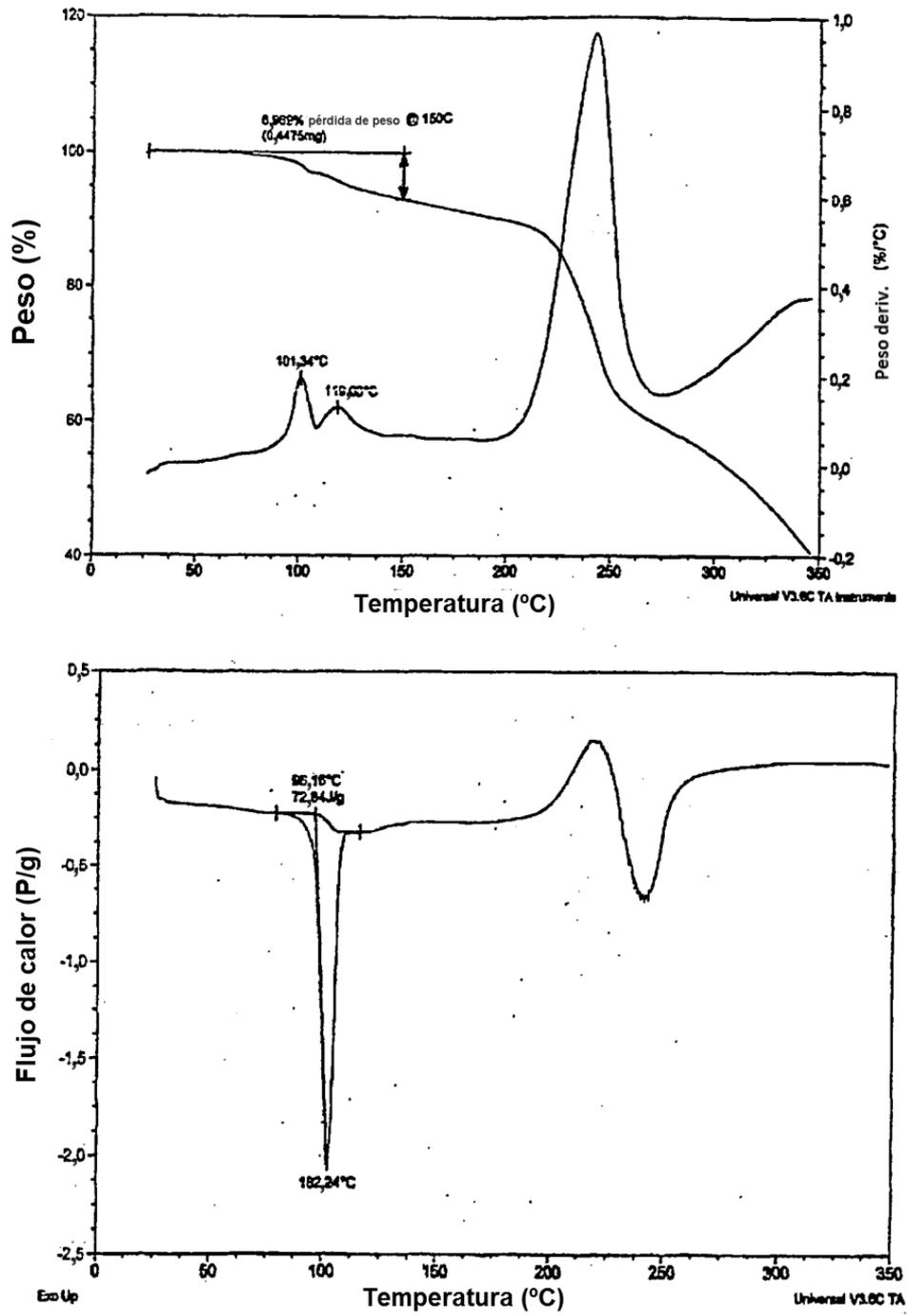


Figura 14

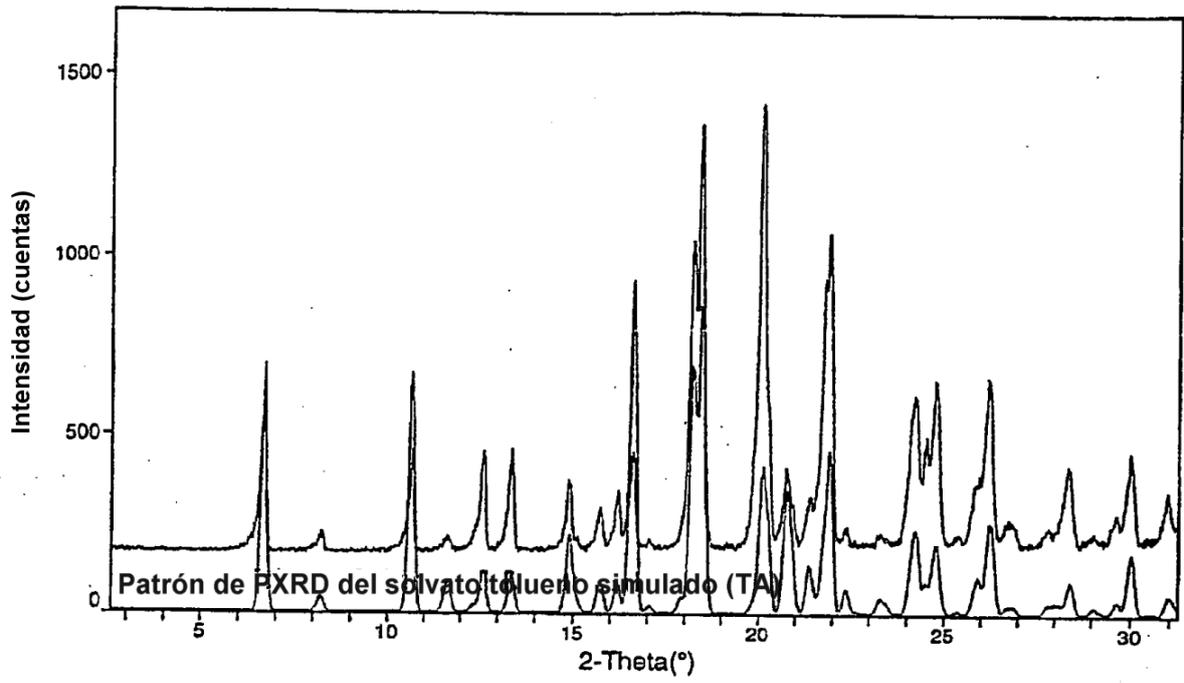


Figura 15

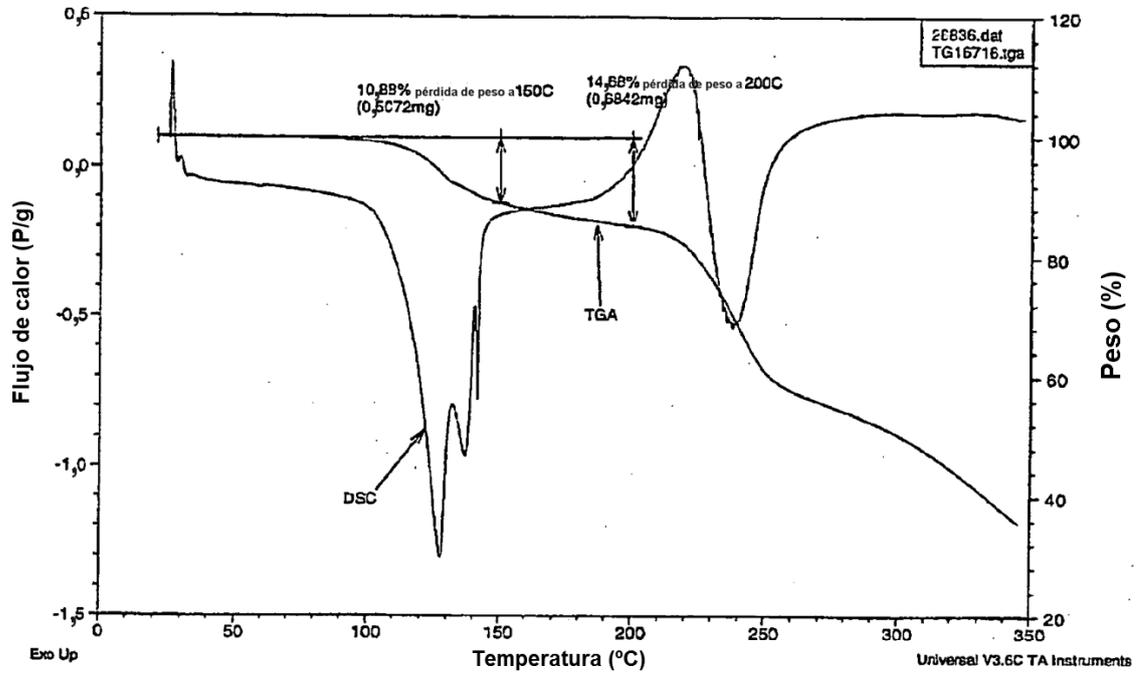


Figura 16