

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 546 415**

(51) Int. Cl.:

C07D 491/044 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2004 E 11163737 (7)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2441767**

(54) Título: **Salinosporamides y sus métodos de uso**

(30) Prioridad:

20.06.2003 US 600854
30.04.2004 US 838157

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2015

(73) Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US

(72) Inventor/es:

FENICAL, WILLIAM H.;
JENSEN, PAUL R.;
MINCER, TRACY J. y
FELING, ROBERT H. R.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

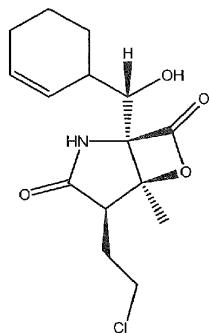
Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 546 415 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**Salinosporamides y sus métodos de uso**

La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un portador farmacéuticamente aceptable, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (V) y sacarosa.



5 V.

Antecedentes

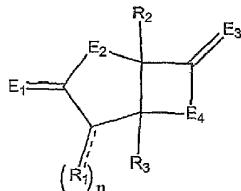
Las enfermedades neoplásicas, caracterizadas por la proliferación de las células que no están sujetas al control normal del ciclo celular, son una causa importante de muerte en los seres humanos. La experiencia clínica en quimioterapia antineoplásica ha demostrado que son deseables nuevos y más eficaces fármacos citotóxicos para tratar estas enfermedades. De hecho, el uso de antineoplásicos ha aumentado debido a la identificación de nuevas neoplasias y tipos de células cancerosas con metástasis en diferentes áreas y debido a la efectividad de los protocolos de tratamiento antineoplásico como tratamiento médico primario y complementario para el cáncer.

Puesto que los antineoplásicos son citotóxicos (tóxicos para las células) no sólo interfieren con la multiplicación de las células tumorales sino también de las células normales. Los antineoplásicos tienen más efecto sobre las células tumorales que sobre las células normales debido a su rápida multiplicación. Por lo tanto, las células del tejido normal que son afectadas por los antineoplásicos son células que están dividiéndose rápidamente, como la médula ósea (se ve en los bajos recuentos sanguíneos), los folículos pilosos (se ve a través de la pérdida de cabello) y el epitelio de la mucosa GI (explica las náuseas, los vómitos, la pérdida de apetito y la diarrea). En general, los antineoplásicos tienen los índices terapéuticos más bajos de cualquier clase de fármacos utilizada en los seres humanos y por consiguiente son considerablemente tóxicos y potencialmente mortales. Ciertos antineoplásicos utilizados comúnmente tienen toxicidades agudas y exclusivas para tejidos específicos. Por ejemplo, los alcaloides de la vinca poseen una significativa toxicidad específica para tejidos nerviosos, mientras que la adriamicina tiene toxicidad específica para el tejido cardíaco y la bleomicina para el tejido pulmonar.

25 Robert H. Feling et al, Angew. Chem Int. Ed. 2003, 42 (3), páginas 355-357 da a conocer Salinosporamide A e indica que este compuesto tiene una potente citotoxicidad *in vitro* contra células de carcinoma de colon humano, células de cáncer de pulmón no microcítico, células cancerosas del SNC, células de melanoma y células de cáncer de mama.

William Fenical et al, Pharmaceutical News, 2002, 9, páginas 480-494 da a conocer Salinosporamide A y afirma que Salinosporamide A es un inhibidor autenticado del proteasoma intracelular y es dirigido al tratamiento del cáncer.

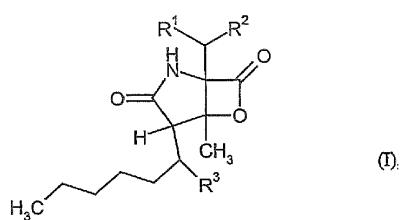
30 WO 2005/002572 es citable contra la invención reivindicada según 54(3) de EPC. WO 2005/002572 da a conocer compuestos de fórmula I:



Formula I

e indica que estos compuestos se pueden usar como antibióticos, antineoplásicos o antiinflamatorios.

WO 2004/071382 es citable contra la invención reivindicada en el apartado 3 del artículo 54 de EPC y describe compuestos de fórmula I:



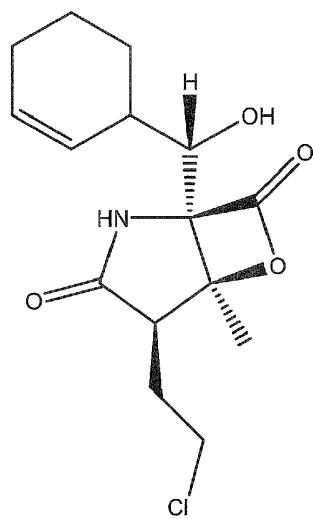
WO 2004/071382 indica que estos compuestos pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer.

Por lo tanto, existe una necesidad continua de antineoplásicos que sean eficaces para inhibir la proliferación de células hiperproliferativas y que tengan simultáneamente valores de Cl_{50} menores que los valores encontrados para los antineoplásicos actuales, dando por resultado una marcada disminución de los efectos secundarios potencialmente graves.

Resumen de la invención

La presente divulgación se basa en el descubrimiento de que determinados productos de la fermentación de las cepas CNB392 y CNB476 de un actinomiceto marino son eficaces inhibidores de células de mamífero hiperproliferativas. Las cepas CNB392 y CNB476 se encuentran dentro de la familia Micromonosporaceae y el epíteto genérico *Salinospora* se ha propuesto para este grupo marino estricto. Los productos de la reacción producidos por esta cepa se clasifican como salinosporamides y son especialmente ventajosos en el tratamiento de trastornos neoplásicos debido a su bajo peso molecular, bajos valores de Cl_{50} , alta potencia farmacéutica y selectividad por las células cancerosas sobre los hongos.

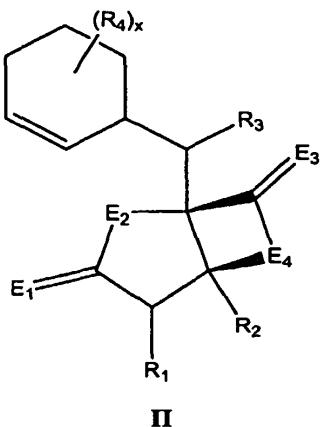
En una realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un compuesto que tiene la estructura (V):



V

donde la composición farmacéutica contiene además sacarosa.

En otra realización de la invención, se proporcionan compuestos que tienen la estructura (II):



en la que:

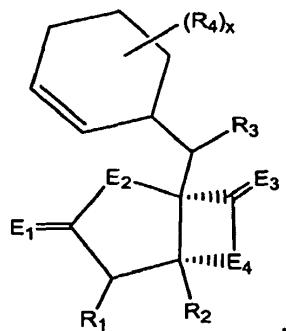
5 R_1 a R_3 son cada uno independientemente -H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

10 Cada R_4 es independientemente alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido;

15 E_1 a E_4 son cada uno independientemente -O-, -NR₅ o -S-, donde R_5 es -H o C₁-C₆ alquilo; y

x es 0 a 8.

En otra realización de la invención, se proporcionan compuestos que tienen la estructura (III):



III

en la que:

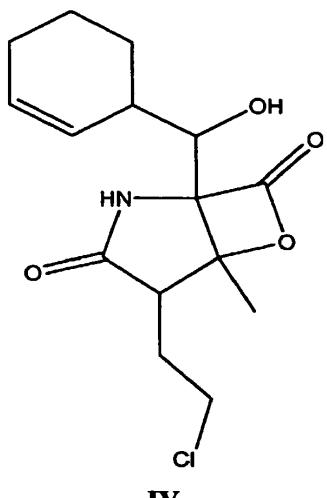
15 R_1 a R_3 son cada uno independientemente -H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo,

20 cada R_4 es independientemente alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido,

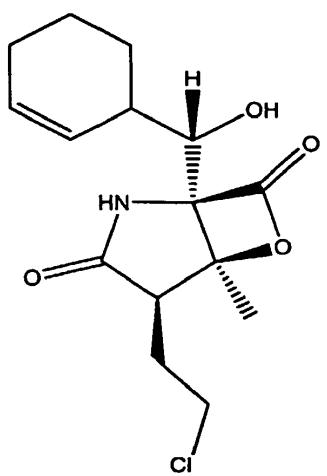
E_1 a E_4 son cada uno independientemente -O-, -NR₅ o -S-, donde R_5 es -H o C₁-C₆ alquilo, y

 x es 0 a 8.

Aún en otra realización de la invención, se proporcionan compuestos que tienen la estructura (IV):



En otra realización de la invención, se proporcionan compuestos que tienen la estructura (V):



- 5 La presente divulgación describe artículos de fabricación que incluyen el material de empaque y una composición farmacéutica de la invención contenida en el material de empaque, donde el material de empaque presenta una rotulación que indica que la composición farmacéutica se puede utilizar para el tratamiento de un trastorno proliferativo de células de mamífero elegido entre adenocarcinoma pancreático, neoplasia del sistema nervioso central, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma óseo, neoplasia de cabeza, neoplasia de cuello, neoplasia gástrica, neoplasia de tiroides, neoplasia de estómago, mieloma, neoplasia de vejiga, neoplasia neuroendocrina, neoplasia que acompaña un linfoma no hodgkiniano y neoplasia que acompaña la enfermedad de Hodgkin.
- 10

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar en métodos para tratar un trastorno proliferativo de células de mamífero. Dicho método se puede llevar a cabo por ejemplo mediante la administración de una composición farmacéutica de la invención a un sujeto que la necesita.

- 15 La presente divulgación proporciona métodos para producir un compuesto de estructura V. Dicho método se puede llevar a cabo, por ejemplo, cultivando cepas CNB392 (ATCC #_____) o CNB476 (ATCC PTA-5275) de *Salinospora* sp. y aislando del cultivo un compuesto de estructura V.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 representa la estructura química de un compuesto ejemplar de la invención, Salinosporamide A, con la estereoquímica relativa.
- 20 La figura 2 representa un árbol filogenético que ilustra la filogenia de "*Salinospora*".
- La figura 3 representa la estructura química del Etopósido, un antineoplásico para el tratamiento contra

varios tipos de cáncer humanos.

La figura 4 compara la actividad citotóxica y las curvas de respuesta a la dosis de Salinosporamide A y Etopósido.

5 La figura 5 es un diagrama de bloques que representa un esquema de separación ejemplar utilizado para aislar el compuesto Salinosporamide A.

Las figuras 6-14 exponen los datos espectroscópicos de NMR, IR y UV utilizados para dilucidar la estructura de Salinosporamide A.

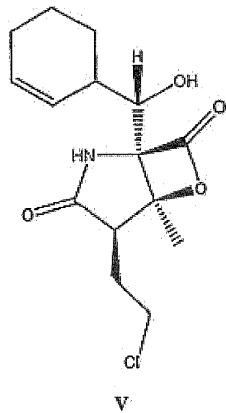
10 La figura 15 expone los nucleótidos de la firma que las cepas CNB392 y CNB476 poseen dentro del 16S de su ADNr, que separan estas cepas filogenéticamente de todos los otros miembros de la familia Micromonosporaceae.

La figura 16 representa la estructura química de un compuesto ejemplar de la invención, salinosporamide A (forma V), con estereoquímica absoluta.

La figura 17 es la gráfica ORTEP de la estructura de rayos X final de salinosporamide A, que representa la estereoquímica absoluta.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un compuesto que tiene la estructura del compuesto (V):



donde la composición farmacéutica contiene además sacarosa.

20 La composición farmacéutica está preferentemente en forma de una solución inyectable estéril o un sólido.

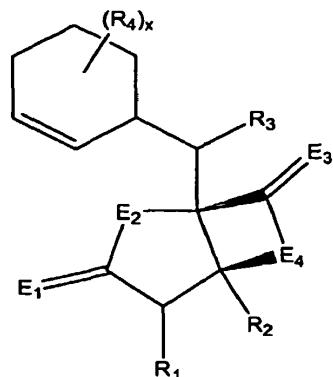
Preferentemente, la solución inyectable estéril es una solución inyectable estéril acuosa.

La composición farmacéutica de la invención contiene además preferentemente otro agente.

25 La invención también proporciona una composición farmacéutica como la definida en este documento para usar en el tratamiento de un trastorno proliferativo de células de mamífero, donde el trastorno se elige del grupo que consiste en adenocarcinoma pancreático, neoplasia del sistema nervioso central, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma óseo, neoplasia de cabeza, neoplasia de cuello, neoplasia gástrica, neoplasia de tiroides, neoplasia de estómago, mieloma, neoplasia de vejiga, neoplasia neuroendocrina, neoplasia que acompaña un linfoma no hodgkiniano y neoplasia que acompaña la enfermedad de Hodgkin.

Preferentemente la célula de mamífero es una célula humana.

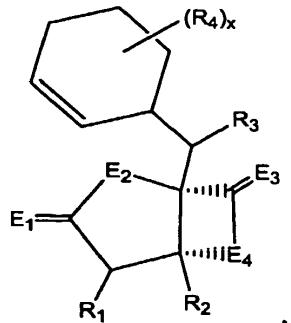
30 En otra realización de la invención, se proporcionan compuestos que tienen la estructura (II):



en la que:

- 5 R_1 a R_3 son cada uno independientemente -H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;
- 10 Cada R_4 es independientemente alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido;
- 10 E_1 a E_4 son cada uno independientemente -O-, -NR₅ o -S-, donde R₅ es -H o C₁-C₆ alquilo; y
x es 0 a 8.

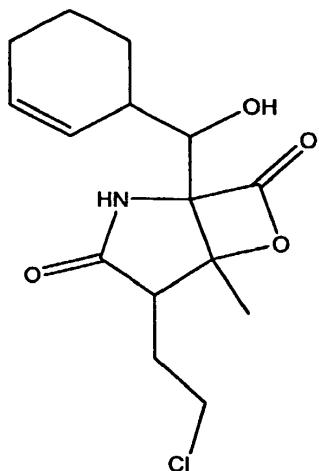
En una realización, se proporcionan compuestos que tienen la estructura (III):



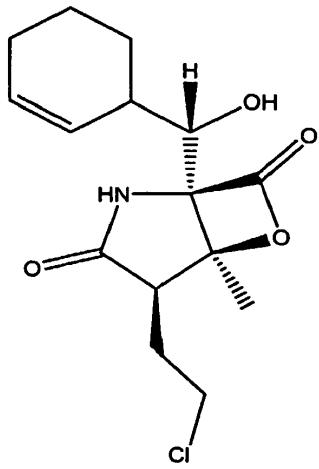
en la que:

- 15 R_1 a R_3 son cada uno independientemente -H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo,
- 20 cada R_4 es independientemente alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido,
- E_1 a E_4 son cada uno independientemente -O-, -NR₅ o -S-, donde R₅ es -H o C₁-C₆ alquilo, y
x es 0 a 8.

Aún en otra realización de la invención, se proporcionan compuestos que tienen la estructura (IV):

**IV**

En otra realización de la invención, se proporcionan compuestos que tienen la estructura (V):

**V**

5 Según se usa en este documento, el término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo monovalente, lineal o ramificada, que tiene de uno a aproximadamente 12 átomos de carbono, que incluye metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, tert-butilo, n-hexilo y similares.

10 Según se usa en este documento, "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que tienen además uno o más sustituyentes elegidos entre hidroxi, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, ciano, nitro, amino, amido, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carboxilo, sulfonilo, sulfonamida, sulfurilo y similares.

Según se usa en este documento, "alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo que tienen entre 1 y aproximadamente 6 átomos de carbono.

15 Según se usa en este documento, "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono, y que tienen un rango de átomos de carbono desde aproximadamente 2 hasta 12, y "alquenilo sustituido" se refiere a grupos alquenilo que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

20 Según se usa en este documento, "alquinilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, y que tienen un rango de átomos de carbono desde aproximadamente 2 hasta 12, y "alquinilo sustituido" se refiere a grupos alquinilo que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

Según se usa en este documento, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen un rango de átomos de carbono desde 6 hasta 14 y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que tienen además uno o más sustituyentes como los

indicados antes.

Según se usa en este documento, "heteroarilo" se refiere a anillos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (p. ej., N, O, S o similares) como parte de la estructura del anillo y tienen un rango de átomos de carbono desde 3 hasta 14, y "heteroarilo sustituido" se refiere a grupos heteroarilo que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

5 Según se usa en este documento, "alcoxi" se refiere a la porción -O-alquilo-, en la que alquilo es el definido antes, y "alcoxi sustituido" se refiere a los grupos alcoxilo que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

10 Según se usa en este documento, "tioalquilo" se refiere a la porción -S-alquilo-, en la que alquilo es el definido antes, y "tioalquilo sustituido" se refiere a los grupos tioalquilo que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

Según se usa en este documento, "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo que contienen anillo que tienen un rango de átomos de carbono desde 3 hasta 8 y "cicloalquilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilo que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

15 Según se usa en este documento, "heterocíclico" se refiere a grupos cílicos (es decir, que contienen anillo) que contienen uno o más heteroátomos (p. ej., N, O, S o similares) como parte de la estructura del anillo y tienen un rango de átomos de carbono desde 3 hasta 14, y "heterocíclico sustituido" se refiere a grupos heterocíclico que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

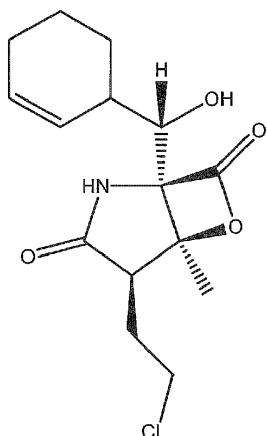
El compuesto de la invención se puede formular en composiciones farmacéuticas en forma natural o como una sal.

20 Las sales atóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de base (formadas con grupos carboxilo libre u otros grupos aniónicos) que se pueden derivar de bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-ethanol, histidina, procaína y similares. Dichas sales también se pueden formar como sales de adición de ácido con cualquier grupo catiónico libre y se formarán generalmente con ácidos inorgánicos como, por ejemplo ácido clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, p-toluenosulfónico, metanosulfónico, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales de la invención incluyen sales de amina formadas por protonación de un grupo amino con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares. Las sales de la invención también incluyen sales de amina formadas por protonación de un grupo amino con ácidos orgánicos adecuados, como ácido p-toluenosulfónico, ácido acético y similares. Otros excipientes que se contemplan para usar en la práctica de la presente invención son los que están disponibles para los expertos en el área, por ejemplo, los que se encuentran en la farmacopea de los Estados Unidos (USP) Vol. XXII y el Formulario Nacional (NF) Vol. XVII, U.S. Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, MD (1989).

35 El compuesto según esta invención contiene un átomo de carbono asimétrico indefinido. Por lo tanto, el compuesto de la invención puede existir como racemato o mezcla racémica, enantiómero individual, mezcla de diastereoisómeros o diastereoisómero individual. El término "estereoisómero" se refiere a compuestos químicos que difieren entre sí sólo en la forma en que los diferentes grupos de la molécula se orientan en el espacio. Los estereoisómeros tienen el mismo peso molecular, la misma composición química y la misma constitución que el otro, pero los átomos están agrupados de manera diferente. Es decir, que ciertas moléculas químicas idénticas están en orientaciones diferentes en el espacio y por consiguiente, en estado puro, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada. Sin embargo, algunos estereoisómeros puros pueden tener una rotación óptica tan leve, que sea indetectable con el equipamiento actual.

40 El carbono estereogénico indefinido puede tener la configuración R o S. Las expresiones "compuesto ópticamente puro" o "isómero ópticamente puro" se refieren a un estereoisómero individual de un compuesto quiral independientemente de la configuración del compuesto.

45 El compuesto de la invención se muestra a continuación:



El compuesto Salinosporamide A tiene una estructura molecular con una diversidad de grupos funcionales (lactona, haluro de alquilo, amida, hidróxido) que se pueden modificar químicamente para producir derivados sintéticos. En consecuencia, el compuesto de la invención, Salinosporamide A, proporciona una estructura líder excelente para el desarrollo de derivados sintéticos y semisintéticos. De hecho, el compuesto Salinosporamide A se puede derivatizar para mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, que faciliten la administración y aumenten la utilidad de los derivados como antineoplásicos.

El compuesto Salinosporamide A muestra una fuerte actividad citotóxica contra células de cáncer de colon humano en los ensayos con células HTC-116. La IC_{50} de 11 ng/mL supera la actividad del etopósido (véase la figura 3, IC_{50} 828 ng/mL), un antineoplásico utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer, en casi dos órdenes de magnitud (véase la figura 4). Esta elevada actividad hace del compuesto Salinosporamide A un excelente candidato para utilizar en el tratamiento de diversos tipos de cáncer humano, especialmente los tipos de cáncer, resistentes, de crecimiento lento, para los que no hay tratamiento. El compuesto Salinosporamide A es específico para la inhibición de células de mamífero y muestra escasa actividad antifúngica contra *Candida albicans* (IC_{50} 250 μ g/mL) y no tiene actividad antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*). La IC_{50} de Salinosporamide A es mucho menor que la de los antineoplásicos más fuertes utilizados actualmente o en los ensayos clínicos.

El compuesto Salinosporamide A es un producto de fermentación de las cepas CNB392 y CNB476 de un actinomiceto marino. Estas cepas son miembros de la orden Actinomycetales, que son bacterias grampositivas con alto contenido de G + C. La novedad de CNB392 y CNB476 es a nivel del género. Las cepas CNB392 y CNB476 de "Salinospora" sp. se depositaron el 20 de junio de 2003, de conformidad con el tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes con el lugar de depósito de cultivos para patentes de American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 U.S.A. con los números de registro ATCC _____ y PTA-5275, respectivamente.

Como es el caso con otros microorganismos, las características de "Salinospora" sp. están sujetas a variación. Por ejemplo, se pueden obtener recombinantes, variantes o mutantes de la cepa especificada mediante tratamiento con diversos mutágenos físicos y químicos conocidos, como rayos ultravioletas, rayos X, rayos gamma y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

El compuesto de la invención se puede preparar, por ejemplo, por fermentación bacteriana que genere el compuesto en cantidades suficientes para el desarrollo de fármacos y para ensayos clínicos. El compuesto se puede producir por fermentación de las cepas CNB392 y CNB476 de actinomiceto en medio líquido con AlBfe+C o CKA. Deben incluirse en el medio de cultivo elementos traza, esenciales necesarios para la multiplicación y el desarrollo del cultivo. Dichos elementos traza existen comúnmente como impurezas en otros constituyentes del medio en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos de los microorganismos. Puede ser deseable agregar pequeñas cantidades (es decir, 0.2 mL/L) de un antiespumante como propilenglicol (PM aproximadamente 2000) al medio de cultivo en gran escala si la formación de espuma se torna un problema. Los metabolitos orgánicos se pueden aislar por adsorción en una resina amberlite XAD-16. Por ejemplo, el compuesto Salinosporamide A se aísla por elución de la resina XAD-16 con metanol:diclorometano 1:1, que produce alrededor de 105 mg del extracto crudo por litro de cultivo. Despues el compuesto Salinosporamide A se aísla del extracto crudo por cromatografía HPLC por desorción súbita de fase reversa y HPLC de fase normal, que produce 6.7 mg de Salinosporamide A. La figura 5 expone un diagrama de bloques que esquematiza los protocolos de aislamiento y separación para los compuestos de la invención.

La estructura de Salinosporamide A se dilucidó mediante diversas técnicas de NMR, espectroscopía de masas, espectroscopía IR y UV como se expone en las figuras 6-14.

La estructura absoluta de salinosporamide A, y la confirmación de la estructura global de salinosporamide A, se

logró por análisis de difracción de rayos X de un solo cristal (véase el ejemplo 3).

La presente divulgación describe artículos de fabricación que incluyen el material de empaque y una composición farmacéutica de la invención contenida en el material de empaque, donde el material de empaque presenta una rotulación que indica que la composición farmacéutica se puede utilizar para el tratamiento de trastornos proliferativos de células de mamífero. La composición farmacéutica de la invención puede contener el compuesto de la invención en una concentración eficaz para tratar trastornos proliferativos de células de mamífero. La concentración puede ser determinada por un experto en el área según un régimen de tratamiento estándar o como se determina, por ejemplo, mediante un ensayo *in vivo* en animales.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar en forma de un sólido, una solución, una emulsión, una dispersión, una micela, un liposoma y similares, donde la composición resultante contiene el compuesto de la invención como principio activo, en mezcla con un portador o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones enterales o parenterales. El compuesto empleado para usar como un componente de la composición farmacéutica se puede combinar, por ejemplo, con los excipientes atóxicos farmacéuticamente aceptables, usuales para comprimidos, pellas, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones y cualquier otra forma para utilizar adecuada. Los portadores que se pueden utilizar incluyen glucosa, lactosa, goma de acacia, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, triglicéridos de longitud de cadena media, dextranos y otros portadores adecuados para utilizar en preparaciones de fabricación en forma sólida, semisólida o líquida. Además, se pueden usar estabilizantes, espesantes, colorantes y perfumes.

Las composiciones de la presente invención pueden contener otros agentes terapéuticos como los que se describen a continuación, y se pueden formular, por ejemplo, empleando vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, así como aditivos farmacéuticos de un tipo adecuado al modo de administración deseada (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, saborizantes, etc.) según técnicas como las conocidas por los expertos en el área de la formulación farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía oral como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; por vía sublingual; por vía bucal; por vía parenteral, por ejemplo por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intracisternal o técnicas de infusión (por ej., como soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas inyectables estériles); por vía nasal como por ejemplo un aerosol para inhalar; por vía tópica, como en forma de una crema o una pomada; o por vía rectal como en forma de supositorios; en formulaciones en forma farmacéutica que contengan vehículos o diluyentes atóxicos, farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar, por ejemplo, en una forma adecuada para la liberación inmediata o la liberación prolongada. La liberación inmediata o la liberación prolongada se pueden lograr mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que contengan el compuesto de la invención, o, particularmente en el caso de liberación prolongada, mediante el uso de dispositivos como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

Las composiciones farmacéuticas se pueden usar para inhibir la proliferación de células de mamífero. Una realización es un uso de las composiciones farmacéuticas de la invención en un método para inhibir la proliferación de células de mamífero hiperproliferativas. Para los propósitos de esta invención, "células de mamífero hiperproliferativas" son células de mamífero que no están sujetas a las limitaciones características del ciclo celular, por ej., la muerte celular programada (apoptosis). Otra realización preferida es cuando la célula de mamífero es una célula humana.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica como la definida en este documento para usar en un método de tratamiento de un trastorno proliferativo en células de mamífero. Los trastornos proliferativos en células de mamífero que pueden ser tratados eficazmente incluyen los trastornos caracterizados por la formación de neoplasias. Como tal, el compuesto utilizado en la invención es un antineoplásico. Según se usa en este documento, "neoplásico" pertenece a neoplasia, que es un crecimiento anómalo, dicho crecimiento se debe a una proliferación de células no sujetas a las limitaciones habituales del ciclo celular. Según se usa en este documento, "antineoplásico" es cualquier compuesto, composición, mezcla, co-mezcla o combinación que inhiba, elimine, retrase o revierta el fenotipo neoplásico de una célula. Para los propósitos de la invención, las neoplasias se eligen entre adenocarcinoma pancreático, neoplasia del sistema nervioso central, neoplasia de ovario, neoplasia de próstata, sarcoma de tejidos blandos o huesos, neoplasia de cabeza y cuello, neoplasia gástrica que incluye neoplasia de tiroides y neoplasia que acompaña un linfoma no hodgkiniano, neoplasia de estómago, mieloma, neoplasia de vejiga, neoplasia neuroendocrina que incluye neoplasia de tiroides, neoplasia que acompaña un linfoma no hodgkiniano y neoplasia que acompaña la enfermedad de Hodgkin.

La quimioterapia, la cirugía, la radioterapia, la terapia con modificadores de la respuesta biológica y la inmunoterapia se usan en la actualidad en el tratamiento del cáncer. Cada modo de terapia tiene indicaciones específicas que son conocidas por los expertos en el área y se pueden emplear una o todas en un intento por lograr la destrucción total de las células neoplásicas. En este documento se estipula la quimioterapia utilizando uno o más compuestos

salinosporamide de la invención. Además, la quimioterapia de combinación, quimioterapia que utiliza el compuesto de la invención en combinación con otros antineoplásicos, también es considerada una terapia de combinación que es generalmente más eficaz que el uso de un solo antineoplásico. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener además al menos otro antineoplásico. Dichas composiciones también se pueden

5 proporcionar junto con portadores líquidos, geles o sólidos, diluyentes, adyuvantes y excipientes que sean fisiológicamente tolerables. Dichos portadores, diluyentes, adyuvantes y excipientes se pueden encontrar en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) Vol. XXII y el Formulario Nacional (NF) Vol XVII, U.S. Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, Md. (1989). Otros modos de tratamiento se proporcionan en AHFS Drug Information, ed. 1993 por the American Hospital Formulary Service, pp. 522-660.

10 Los antineoplásicos que pueden ser utilizados adicionalmente en las composiciones de la invención incluyen los provistos en el The Merck Index, 11^a ed. Merck & Co., Inc. (1989) pp. Ther 16-17. Los antineoplásicos pueden ser antimetabolitos que pueden incluir, entre otros, metotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, arabinósido de citosina, hidroxiurea y 2-clorodesoxiadenosina. Los antineoplásicos contemplados pueden ser agentes alquilantes que pueden incluir, entre otros, ciclofosfamida, melfalán, busulfán, paraplatino, clorambugilo y mostaza de nitrógeno.

15 Los antineoplásicos pueden ser alcaloides de origen vegetal que pueden incluir, entre otros, vincristina, vinblastina, taxol y etopósido. Los antineoplásicos contemplados pueden ser antibióticos que pueden incluir, entre otros, doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, mitomicina c y bleomicina. Los antineoplásicos contemplados pueden ser hormonas que pueden incluir, entre otros, calusterona, diomostavolona, propionato, epitiostanol, mepitiostano, testolactona, tamoxifeno, fosfato de poliestradiol, acetato de megestrol, flutamida, nilutamida y trilostano. Los

20 antineoplásicos contemplados pueden ser enzimas que pueden incluir, entre otras, derivados de L-asparaginasa o aminoacridina que pueden incluir, pero no exclusivamente, amsacrina. Otros antineoplásicos comprenden los provistos en Skeel, Roland T., "Antineoplastic Drugs and Biologic Response Modifier: Classification, Use and Toxicity of Clinically Useful Agents," Handbook of Cancer Chemotherapy (3^a ed.), Little Brown & Co. (1991).

25 Además de los primates, como los humanos, otros varios mamíferos pueden ser tratados por las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, mamíferos como, pero no exclusivamente, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayos, ratas u otras especies de bovinos, ovinos, equinos, caninos, felinos, roedores o murinos.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad del compuesto en cuestión que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, un animal o un ser humano que está siendo buscada por el investigador, el veterinario, el médico u otro clínico, por ejemplo, disminuir los efectos o los síntomas de los trastornos proliferativos celulares.

Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere dar a entender que el portador, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no debe ser perjudicial para el receptor.

35 Las expresiones "administración de" y/o "administrar un" compuesto se debe entender que significan proporcionar un compuesto de la invención al individuo que necesita tratamiento. La administración de las composiciones de la invención puede ser previa, simultánea o posterior, a la administración de otro agente terapéutico u otro antineoplásico.

40 Las composiciones farmacéuticas para la administración de los compuestos de esta invención se pueden presentar convenientemente en formas farmacéuticas y se pueden preparar por cualquier método bien conocido en el área farmacéutica. Todos los métodos incluyen el paso de asociar el principio activo con el portador que está constituido por uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con un portador líquido o un portador sólido finamente dividido, o ambos, y luego si fuera necesario dando forma al producto en la formulación deseada. En la composición farmacéutica el principio activo en cuestión se incluye en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o el estado de las enfermedades.

45 Las composiciones farmacéuticas que contienen el principio activo pueden estar en una forma adecuada para uso oral, como por ejemplo comprimidos, trociscos, pastillas, soluciones o suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos para dispersión, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires.

50 Las composiciones destinadas al uso oral se pueden preparar según cualquier método conocido en el área para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes elegidos del grupo compuesto por edulcorantes, saborizantes, colorantes y conservantes con el fin de proporcionar preparaciones agradables al paladar y elegantes desde el punto de vista farmacéutico. Los comprimidos contienen al principio activo mezclado con excipientes atóxicos, farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de los mismos. Estos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granulantes y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o acacia, y lubricantes, como por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no tener recubrimiento o se pueden recubrir usando las técnicas conocidas para demorar la desintegración y absorción en el tubo gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período de tiempo más prolongado. Por

ejemplo, se puede emplear un material retardador como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También se pueden recubrir para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para liberación controlada.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en las que se mezcla el principio activo con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como 5 cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuate, vaselina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los principios activos mezclados con excipientes adecuados para la 10 fabricación de suspensiones acuosas. Este tipo de excipientes son suspendentes, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmethylcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma de acacia; dispersantes o humectantes que pueden ser fosfátidos naturales, por ejemplo, lecitina, o productos de la condensación de un óxido de alquíleno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno o productos de la condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxacetanol, o 15 productos de la condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de la condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhidridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más colorantes, uno o más saborizantes y uno o más edulcorantes como sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo 20 aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como por ejemplo vaselina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un espesante, por ejemplo cera de abejas, vaselina sólida o alcohol cetílico. Se pueden agregar edulcorantes, como los indicados antes, y saborizantes para proporcionar una preparación oral apetecible. Estas composiciones se pueden conservar agregando un antioxidante como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos que se pueden dispersar y son adecuados para la preparación de una suspensión acuosa 25 mediante la adición de agua proporcionan el principio activo mezclado con un dispersante o humectante, un suspendente y uno o más conservantes. Los dispersantes o humectantes y los suspendentes adecuados están ejemplificados por los mencionados antes. También pueden estar presentes excipientes adicionales como por ejemplo edulcorantes, saborizantes y colorantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol o sorbitol. Se 30 apreciará que la sacarosa requerida por la composición farmacéutica de la invención también puede actuar como edulcorante. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y saborizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. 35 Esta suspensión se puede formular según las técnicas conocidas utilizando los dispersantes o humectantes y suspendentes adecuados que se mencionaron antes. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente 40 se emplean aceites fijos estériles como solvente o suspendente. Para este propósito se puede utilizar cualquier aceite fijo blando que incluye los mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se pueden usar ácidos grasos como el ácido oleico.

Las composiciones de la invención se pueden administrar a mamíferos para uso veterinario, como animales domésticos, y para uso clínico en humanos de manera similar a otros agentes terapéuticos. En general, la dosis requerida para la eficacia terapéutica variará de acuerdo con el tipo de uso y el modo de administración, así como 45 con los requisitos particulares de cada huésped. Comúnmente, las dosis variarán entre aproximadamente 0.001 y 1000 µg/kg, más generalmente entre 0.01 y 10 µg/kg, del peso corporal del huésped. Alternativamente, las dosis dentro de estos rangos se pueden administrar por infusión constante durante un período prolongado, generalmente superior a las 24 horas, hasta que se hayan obtenido los beneficios terapéuticos deseados. Sin embargo, se comprenderá que el nivel de dosis y la frecuencia de dosificación específicos para cualquier paciente en particular, 50 puede variar y dependerá de diversos factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el género, la dieta, el modo y la hora de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y la terapia que esté recibiendo el huésped.

La invención se describirá ahora más detalladamente por referencia a los ejemplos no limitantes siguientes.

55 Ejemplos

Materiales y métodos

HPLC - La purificación de los compuestos de la invención se llevó a cabo por RP-MPLC en fase sólida C18 (Aldrich) usando un gradiente discontinuo en columnas Kontes Flex (15 x 7 mm). La HPLC preparativa se realizó en un sistema de HPLC isocrático con una bomba Waters de 6000H en columna de fase normal Si-Dynamas-60A (250 x 5 mm) o columna de fase reversa C18-Dynamax-60A, flujo 2 mL/minuto, con un detector refractométrico diferencial Waters R401.

LC-MS - La cromatografía LC-MS se llevó a cabo en un sistema Hewlett-Packard serie HP1100 con detección DAD y MSD1100. La separación se realizó en fase reversa C18 (Agilent Hypersil ODS 5 µm, dimensión de la columna 4.6 x 100 mm), velocidad de flujo 0.7 mL/minuto usando un gradiente estándar: 10% de acetonitrilo, 15 minutos; 98% de acetonitrilo (solventes de alta pureza Burdick & Jackson). La detección MS se hizo en modo ESI positivo, voltaje capilar 3500 eV, voltaje de fragmentación 70 eV, rango de masas *m/z* 100-1000. El modo APCI se midió a una velocidad de flujo de 0.5 mL/minuto, detección positiva, voltaje capilar 3000 eV, voltaje de fragmentación 70 eV.

NMR - Los espectros de NMR se midieron en un espectrómetro Varian 300 MHz de gradiente de campo con modo inverso para espectros ¹H o 2D-NMR spectra. Los espectros ¹³C y DEPT se midieron en un instrumento Varian 400 MHz, de banda ancha. La referencia se fijó en el estándar interno tetrametilsilano (TMS, 0.00 ppm).

MS-EI - Los espectros MS-EI de baja resolución se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas Hewlett-Packard con dispositivo de campo de sector magnético, velocidad de calentamiento 20 °C/minuto hasta 320 °C, entrada de inyección directa.

FTMS-MALDI - Los datos de MS de alta resolución se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas IonSpec Ultima FT operando en modo MALDI.

IR - Los espectros infrarrojos se midieron en un espectrofotómetro infrarrojo Perkin-Elmer FT usando ventanas de NaCl.

Ejemplo de referencia 1

Aislamiento y caracterización de la especie "*Salinospora*", Nº de cultivos CNB392 y CNB476

CNB392 y CNB476 poseen nucleótidos de la firma dentro del 16S de su ADNr que separan estas cepas filogenéticamente de todos los otros miembros de la familia Micromonosporaceae (véase la figura 15). Se ha determinado que estos nucleótidos de la firma son un marcador definitivo para los miembros de este grupo que también requieren sodio para su crecimiento fisiológico. Los nucleótidos de la firma se alinearon a las posiciones 27-1492 de *E. coli* usando todos los miembros existentes de la familia Micromonosporaceae en el Proyecto de base de

datos ribosómica a partir de 1-31-01. Para el clado "*Salinospora*", 45 morfotipos parcialmente secuenciados presentaron todos los nucleótidos de la firma de las posiciones 207-468. Los siete aislamientos de "*Salinospora*" secuenciados casi en su totalidad (véase la figura 2) presentaron todas las firmas en la figura 15.

Las cepas CNB392 y CNB476 forman colonias de anaranjado brillante a negras en el agar y carecen de micelio aéreo. Se producen pigmentos marrón oscuro y anaranjado brillante que difunden dependiendo de la etapa del crecimiento celular. Las esporas ennegrecen la superficie de la colonia y nacen en los micelios del sustrato. Los micelios vegetativos se ramifican finamente y no se fragmentan. Las esporas se producen individualmente o en racimos. En estas cepas no se observaron esporangios ni motilidad de las esporas. CNB392 y CNB476 tiene un requisito estricto de sodio para el crecimiento y no crecerán en medios típicos utilizados para el mantenimiento de otros miembros genéricos de la familia Micromonosporaceae. Se encontró que CNB392 y CNB476 crecen óptimamente en los medios sólidos TCG o M1 a 30 °C.

TCG	3 g de triptona	M1	10 g de almidón
	5 g de casitona		4 g de extracto de levadura
	4 g de glucosa		2 g de peptona
	18 g de agar (opcional)		18 g de agar (opcional)
	1 litro de agua de mar filtrada		1 litro de agua de mar filtrada

Fermentación

CNB392 y CNB476 se cultivaron en medio líquido A1Bfe+C o CKA en agitación, 1 litro a 35 °C durante 19 días. Después de 4 días se agregaron 20 gramos de resina Amberlite XAD-16 (Sigma, adsorbente polimérica no iónica).

A1Bfe+C 10 gramos de almidón	CKA 5 g de almidón
4 g de extracto de levadura	4 mL de hidrosolubles (50%)
2 g de peptona	2 g de ración de menhaden
1 g de CaCO ₃	2 g de polvo de algas
5 mL de KBr (solución acuosa, 20 gramos/litro)	2 g de quitosano
5 mL de Fe ₂ (SO ₄) ₃ x 4 H ₂ O (8 gramos/litro)	1 litro de agua de mar filtrada
1 litro de agua de mar filtrada	

Extracción

- 5 La resina XAD-16 se filtra y el extracto orgánico se eluye con 1 litro de acetato de etilo seguido de 1 litro de metanol. Después el filtrado se extrae con acetato de etilo (3 x 200 mL). El extracto crudo de la adsorción de XAD es de 105 mg. El ensayo de citotoxicidad en células de colon humano HCT-116 dio Cl₅₀ < 0.076 µg/mL.

Aislamiento de Salinosporamide A de CNB392

- 10 El extracto crudo se sometió a cromatografía por desorción súbita de fase reversa (RP) C 18 usando un gradiente discontinuo (Figura 5). El ensayo en HCT-116 dio lugar a dos fracciones activas, CNB392-5 y CNB392-6. Después las fracciones activas combinadas (51.7 mg), HCT-116 < 0.076 µg/mL se sometieron a cromatografía en un RP-HPLC isocrático, utilizando 85% de metanol a un flujo de 2 mL/minuto como eluyente y empleando detección por índice de refracción. La fracción activa CNB392-5/6 (7.6 mg, HCT-116 < 0.076 µg/mL) se purificó en un HPLC isocrático de fase normal en gel de sílice con acetato de etilo:isoctano (9:1) a 2 mL/minuto. Se aisló 15 Salinosporamide A (Figura 1) como un sólido incoloro amorfio en 6.7 mg por 1 litro, rendimiento (6.4%). La TLC en gel de sílice (dclorometano:metanol 9:1) muestra Salinosporamide A a *r*_f = 0.6, no hubo extinción UV ni fluorescencia a 256 nm, amarillo con H₂SO₄/etanol, rojo marrón oscuro con reactivo de Godin (vanillina/H₂SO₄/HClO₄). El compuesto Salinosporamide A es soluble en CHCl₃, metanol, y otros solventes polares como DMSO, acetona, acetonitrilo, benceno, piridina, N,N-dimetilformamida y similares. ¹H NMR: (d₅-piridina, 300 MHz) 1.37/1.66 (2H, m, CH₂), 1.70/2.29 (2H, m, CH₂), 1.91 (2H, ancho, CH₂), 2.07 (3H, s, CH₃), 2.32/2.48 (2H, ddd, ³J = 7.0 Hz, CH₂), 2.85 (1H, ancho, m, CH), 3.17 (1H, dd, ³J = 10 Hz, CH), 4.01/4.13 (2H, m, CH₂), 4.25 (1H, d, ³J = 9.0 Hz, CH), 4.98 (1H, ancho, OH), 5.88, (1H, ddd, ³J = 10 Hz, CH), 6.41 (1H, ancho d, ³J = 10 Hz, CH) 10.62 (1H, s, NH).
- 20 ¹³C NMR/DEPT: (d₅-piridina, 400 MHz) 176.4 (COOR), 169.0 (CONH), 128.8 (=CH), 128.4 (=CH), 86.1 (Cq), 80.2 (Cq), 70.9 (CH), 46.2 (CH), 43.2 (CH₂), 39.2 (CH), 29.0 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.3 (CH₂), 21.7 (CH₂), 20.0 (CH₃)

LC-MS (ESI) *t*_r = 10.0 minutos, flujo 0.7 mL/minuto

m/z: (M+H)⁺ 314, (M+Na)⁺ 336; fragmentos: (M+H-CO₂)⁺ 292, (M+H-CO₂-H₂O)⁺ 270, 252, 204. Patrón de Cl: (M+H, 100%)⁺ 314, (M+H, 30 %)⁺ 316.

LC MS (APCI): *t*_r = 11.7 minutos, flujo 0.5 mL/minuto

- 30 m/z: (M+H)⁺ 314, fragmentos: (M+H-CO₂-H₂O)⁺ 270, 252, 232, 216, 160. Patrón de Cl: (M+H, 100%)⁺ 314, (M+H, 30 %)⁺ 316.

EI: m/z: 269, 251, 235, 217, 204, 188 (100%), 160, 152, 138, 126, 110,81.

FTMS-MALDI: m/z: (M+H)⁺ 314.1144

FT-IR: (cm⁻¹) 2920, 2344, s, 1819 m, 1702 s, 1255, 1085 s, 1020 s, 797 s.

- 35 Fórmula molecular: C₁₅H₂₀CINO₄

Ejemplo de referencia 2**Ensayos de bioactividad**

El compuesto Salinosporamide A muestra una fuerte actividad contra células de cáncer de colon humano con una Cl_{50} de 0.011 µg/mL (véase la figura 4). El cribado respecto a actividad antibacteriana o antifúngica no muestra actividad significativa, véase la tabla 1.

Tabla 1

Ensayo	Cl_{50} of Salinosporamide A, (µg/mL)
HCT-116	0.011
<i>Candida albicans</i>	250
<i>Candida albicans</i> (resistente a la anfotericina B)	NSA*
<i>Staphylococcus aureus</i> (resistente a la meticilina)	NSA*
<i>Enterococcus faecium</i> (resistente a la vancomicina)	NSA*

* NSA = sin actividad significativa

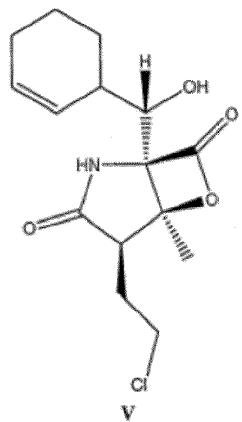
Ejemplo de referencia 3**Determinación de la estereoquímica absoluta**

La cristalización de un compuesto de estructura I a partir de acetato de etilo/iso-octano resultó en cristales cúbicos, individuales, que difractaban como un sistema monoclínico P2(1). El inusual elevado volumen de la celda unitaria de 3009 Å alojó cuatro moléculas independientes en las que se observaron posiciones conformacionales diferentes para el sustituyente flexible cloroetilo. La asignación de la estructura absoluta a partir de la anisotropía de difracción del sustituyente cloro resolvió la estereoquímica absoluta de salinosporamide A como 2R,3S,4R,5S,6S (Figuras 16 y 17) con un parámetro Flack de 0.01 y un esd de 0.03.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un compuesto que tiene la estructura del compuesto (V):



- 5 donde la composición farmacéutica contiene además sacarosa.
- 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde la composición farmacéutica está en forma de una solución inyectable estéril o un sólido.
- 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que la solución inyectable estéril es una solución inyectable estéril acuosa.
- 10 4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición farmacéutica contiene además otro agente.
- 15 5. Una composición farmacéutica como la definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar en el tratamiento de un trastorno proliferativo de células de mamífero, donde el trastorno se elige del grupo que consiste en adenocarcinoma pancreático, neoplasia del sistema nervioso central, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma óseo, neoplasia de cabeza, neoplasia de cuello, neoplasia gástrica, neoplasia de tiroides, neoplasia de estómago, mieloma, neoplasia de vejiga, neoplasia neuroendocrina, neoplasia que acompaña un linfoma no hodgkiniano y neoplasia que acompaña la enfermedad de Hodgkin.
- 6. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la célula de mamífero es una célula humana.

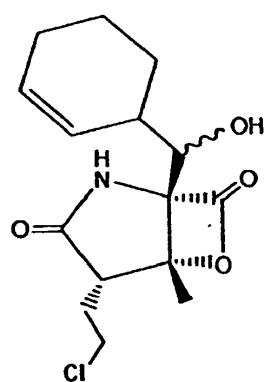


FIG. 1

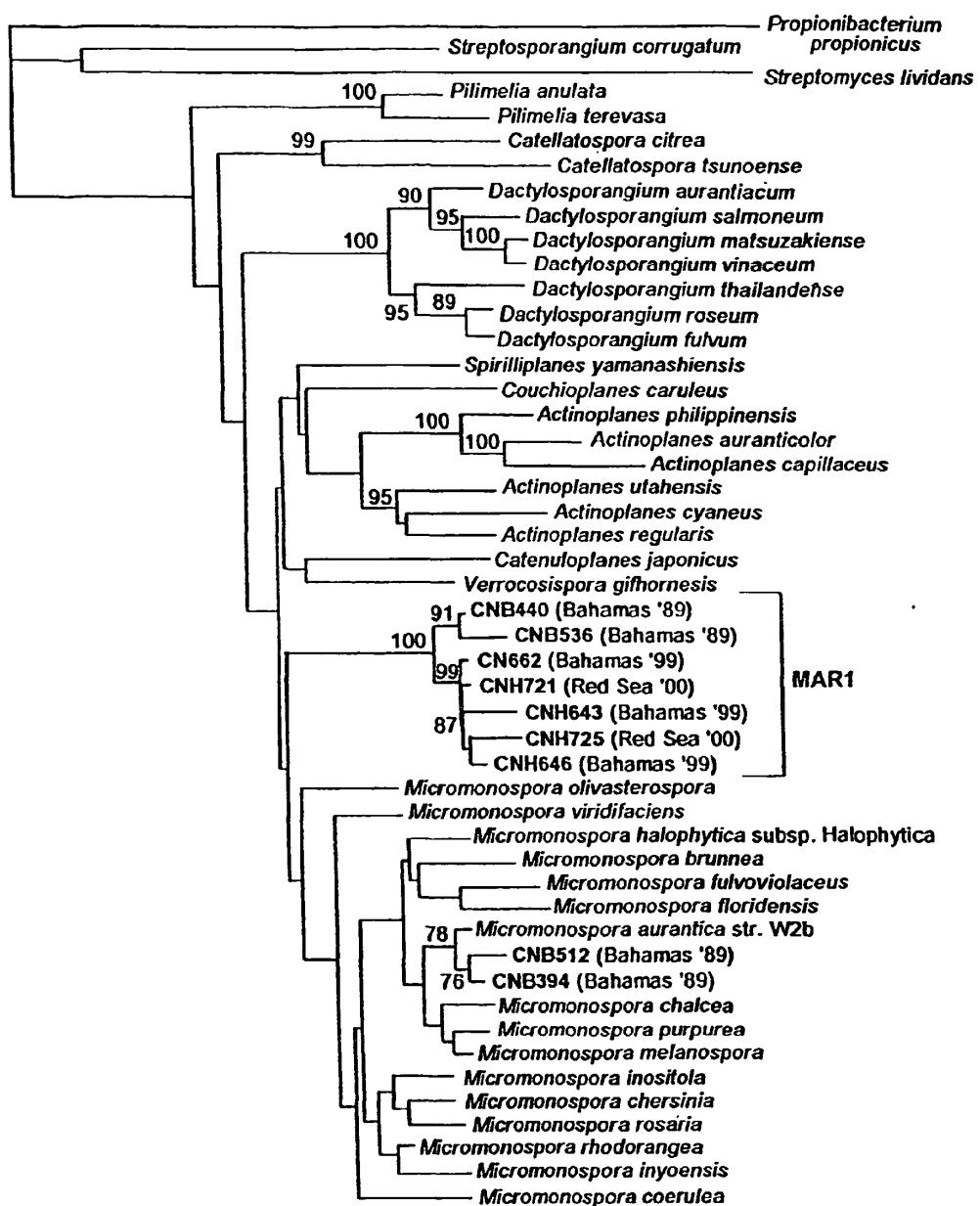


FIG. 2

Etopósido (2)

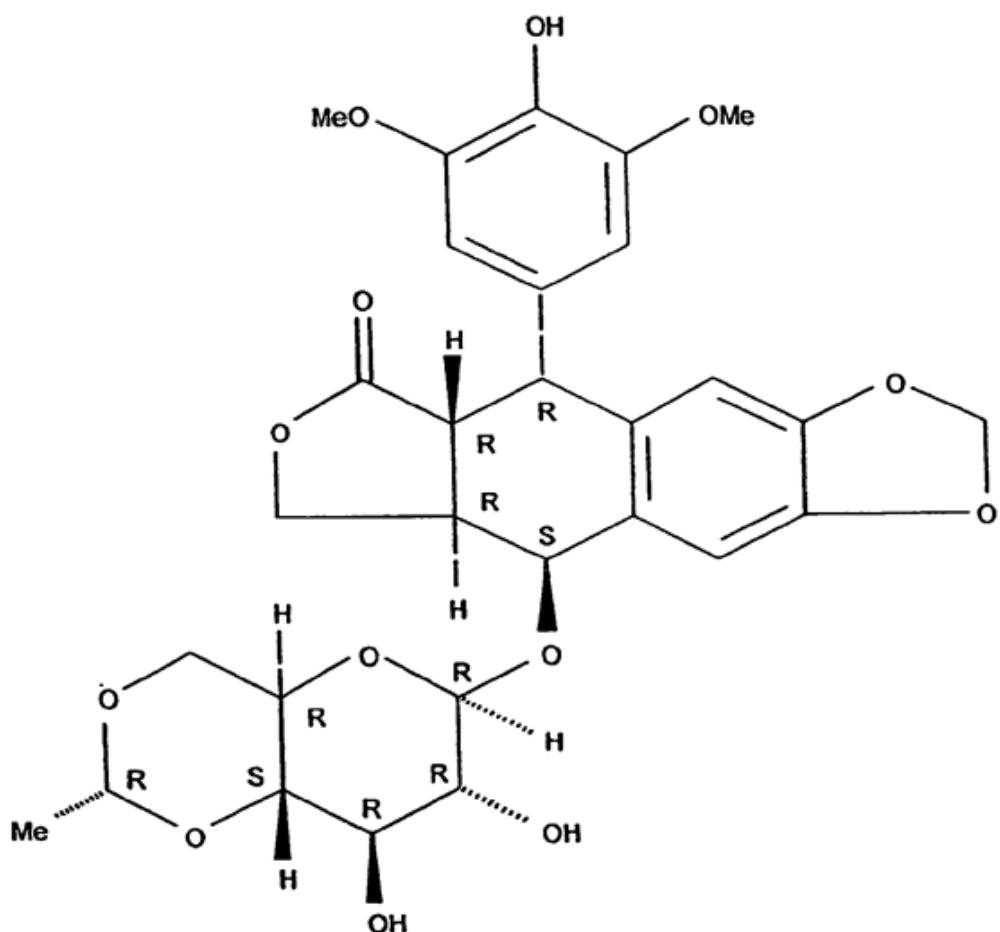


FIG. 3

Actividad citotóxica de salinosporamide A (1) y curva de respuesta a la dosis

Comp8 (unidades/millilitro)

Muestra	Pocillos	Nº muestra	DO	Valor medio	DO Ctr. prom	% Supervivencia	Concentración	CI50
Co03	C8	1	0.013	0.013	1.305	0.958	78.125	0.011
Co04	D8.	2	0.044	0.044	1.305	3.335	19.531	0.011
Co05	E8	3	0.059	0.059	1.305	4.484	4.883	0.011
Co06	F8	4	0.105	0.105	1.305	8.011	1.221	0.011
Co07	G8	5	0.170	0.170	1.305	12.993	0.305	0.011
Co08	H8	6	0.304	0.304	1.305	23.266	0.076	0.011

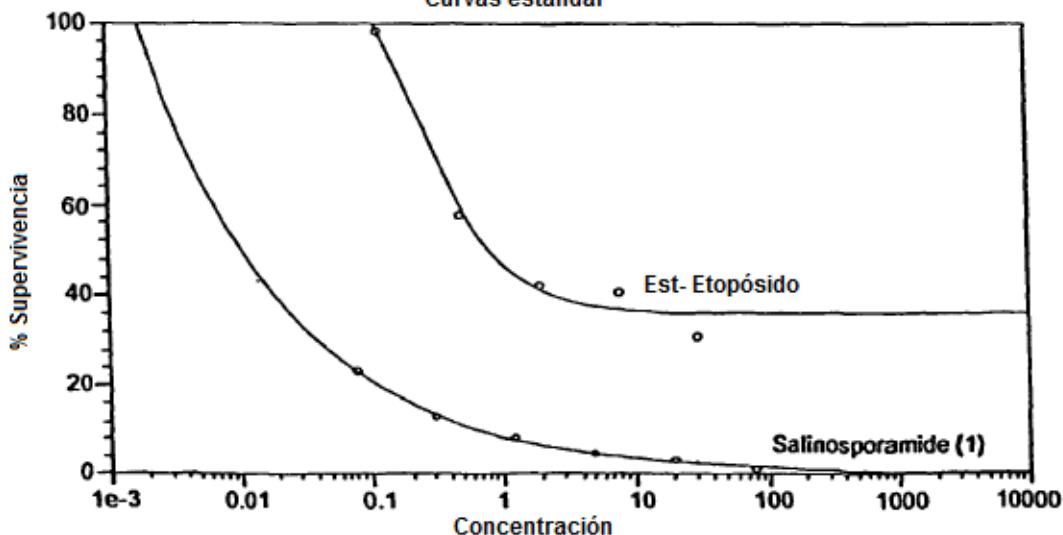
Estándares (mg/ml)

Muestra	Concentración	Conc. retrocalc.	Pocillos	DO	DO media	% Supervivencia	CV %	DO Ctr. prom	CI50
Sta03	31.250	Interv. ?	C12	0.413	0.413	31.621	0.0	1.305	0.828
Sta04	7.813	Interv. ?	D12	0.542	0.542	41.510	0.0	1.305	0.828
Sta05	1.953	Interv. ?	E12	0.557	0.557	42.660	0.0	1.305	0.828
Sta06	0.488	Interv. ?	F12	0.760	0.760	58.222	0.0	1.305	0.828
Sta07	0.122	Interv. ?	G12	1.287	1.287	98.620	0.0	1.305	0.828
Sta08	0.031	Interv. ?	H12	1.615	1.615	123.764	0.0	1.305	0.828

Menor valor del estándar: 0.413

Mayor valor del estándar: 1.615

Curvas estándar



$$y = \frac{(A - D)}{(1 + (x/C)^B)} + D: \quad A \quad B \quad C \quad D \quad R^2$$

- Comp.8 (Comp8: Concentración vs % Supervivencia) **2183.255** **0.398** **8.34e-7** **0.073** **0.997**
- Est. (Est: Concentración vs % Supervivencia) **133.236** **1.227** **0.192** **36.119** **0.993**

FIG. 4

Aislamiento de salinosporamide A (1), esquema de separación

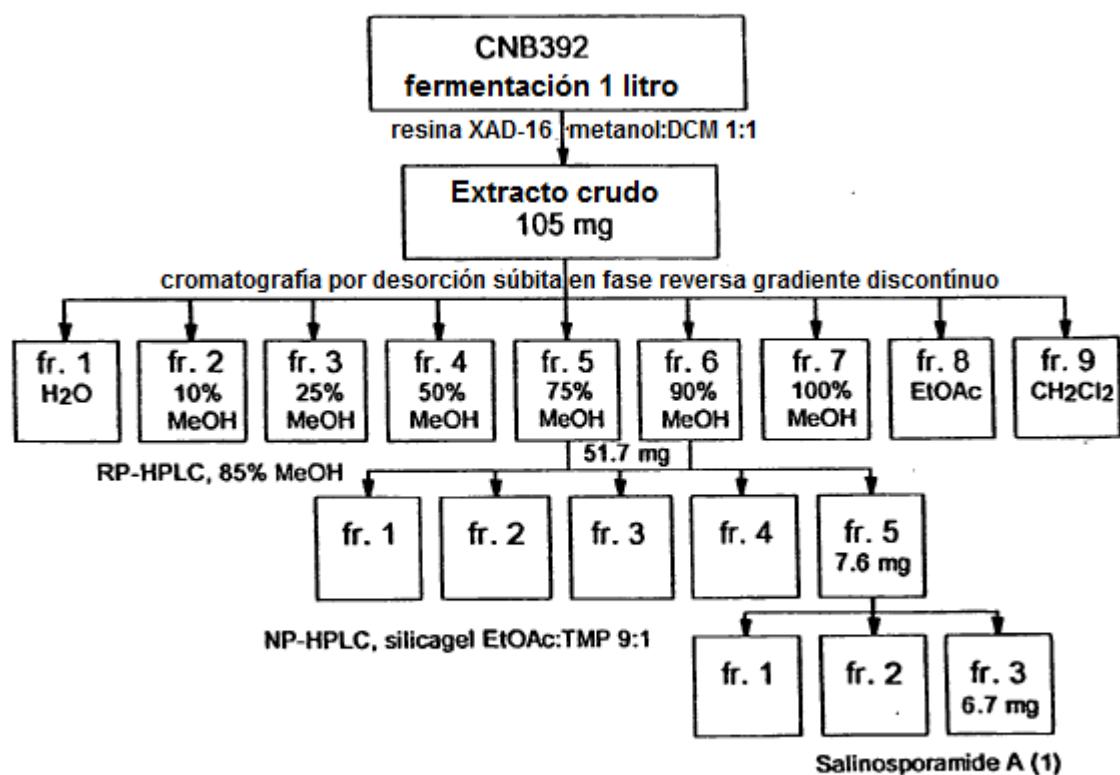


FIG. 5

¹H-NMR de salinosporamide A (1), 300 MHz, d5-piridina

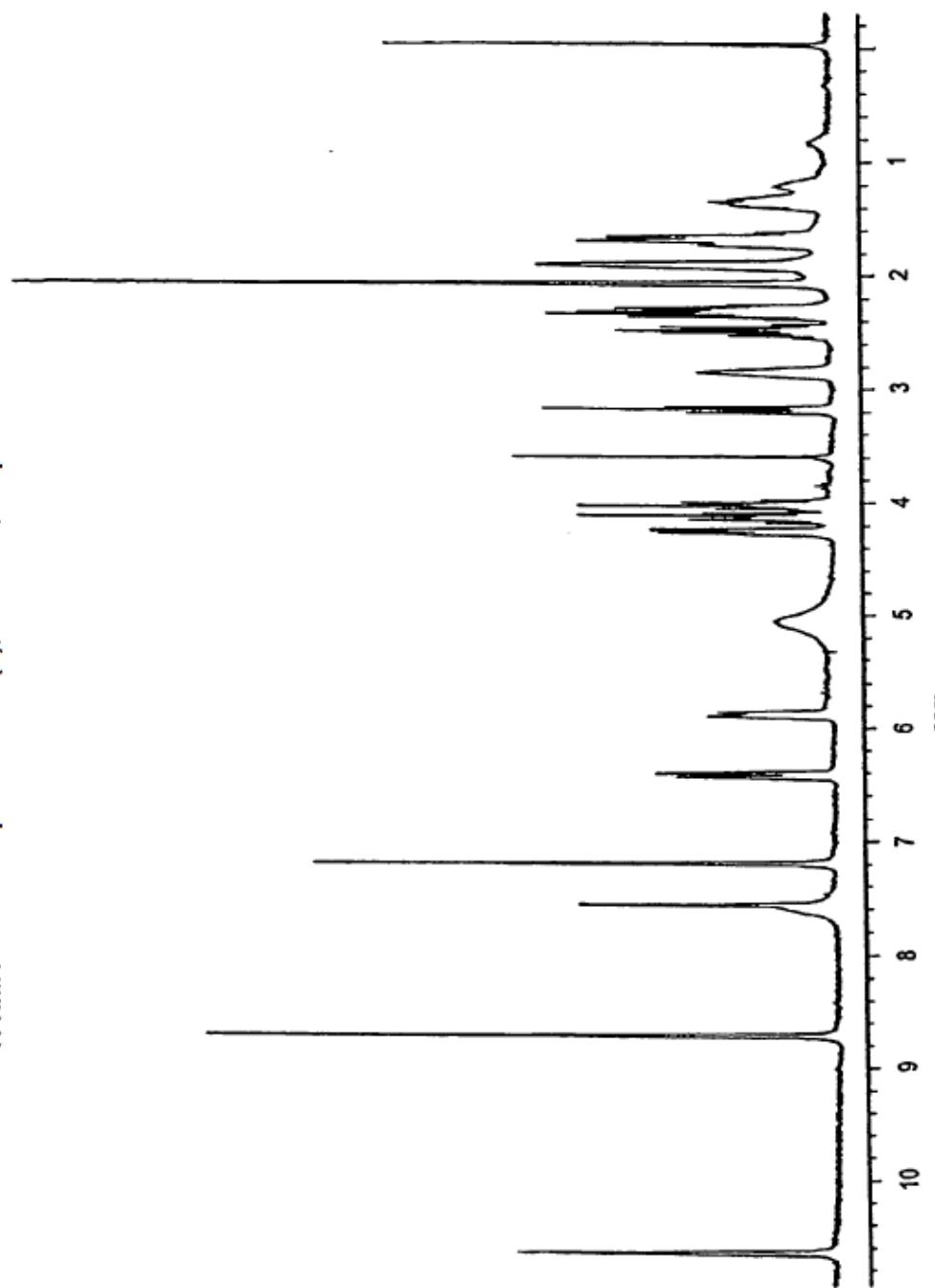


FIG. 6

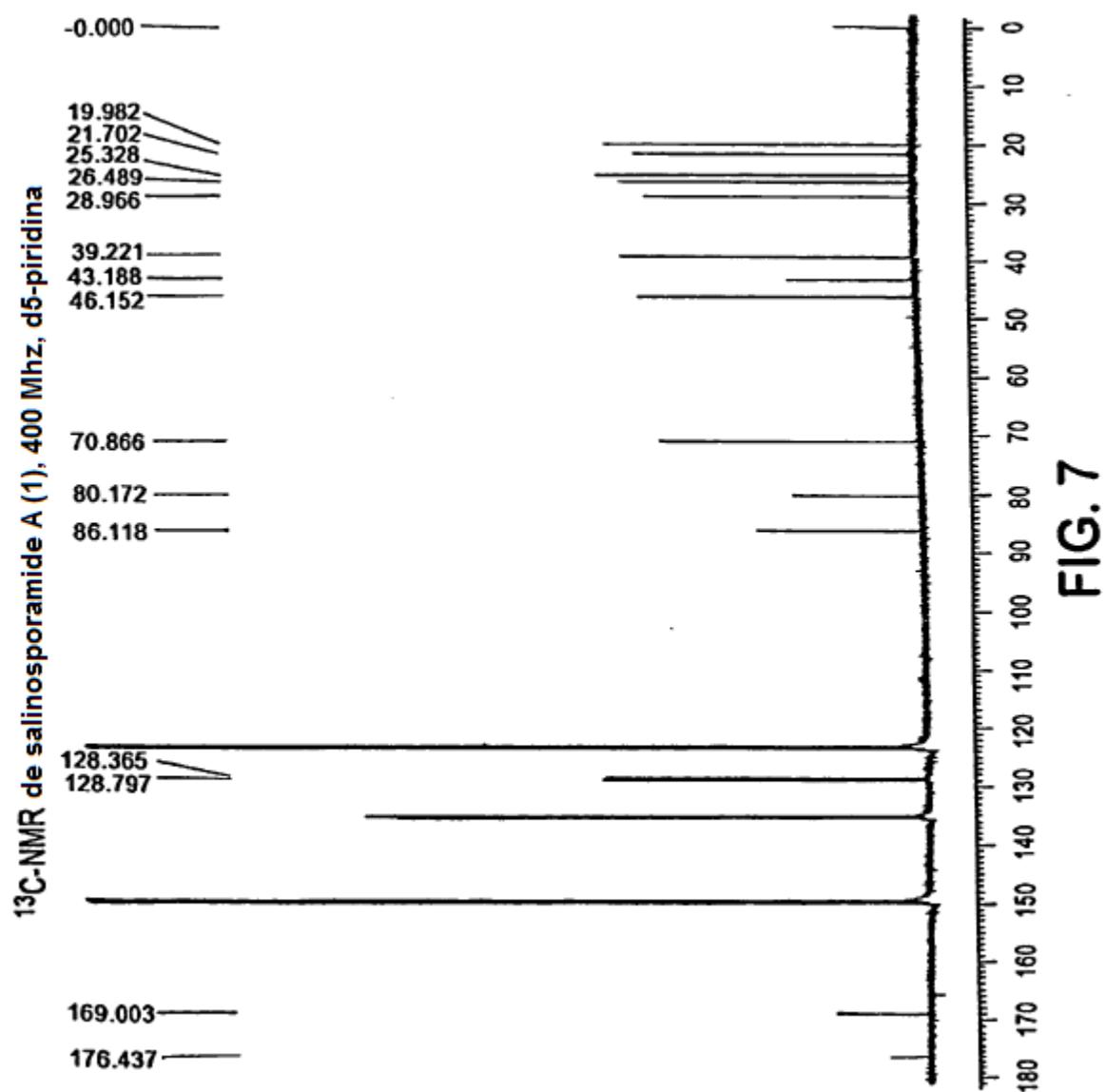


FIG. 7

HMQC de salinosporamide A (1), 300 Mhz, d5-piridina

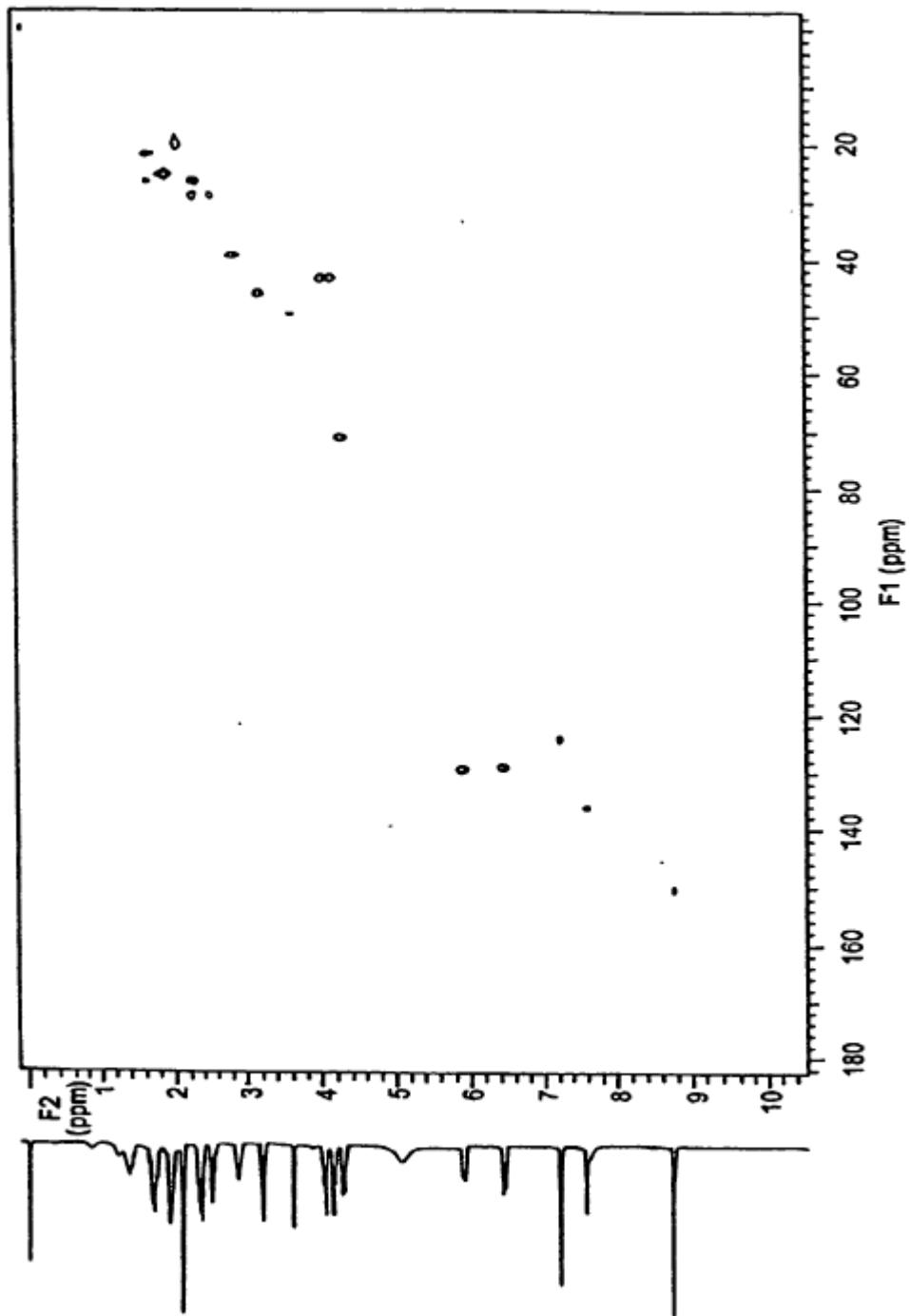


FIG. 8

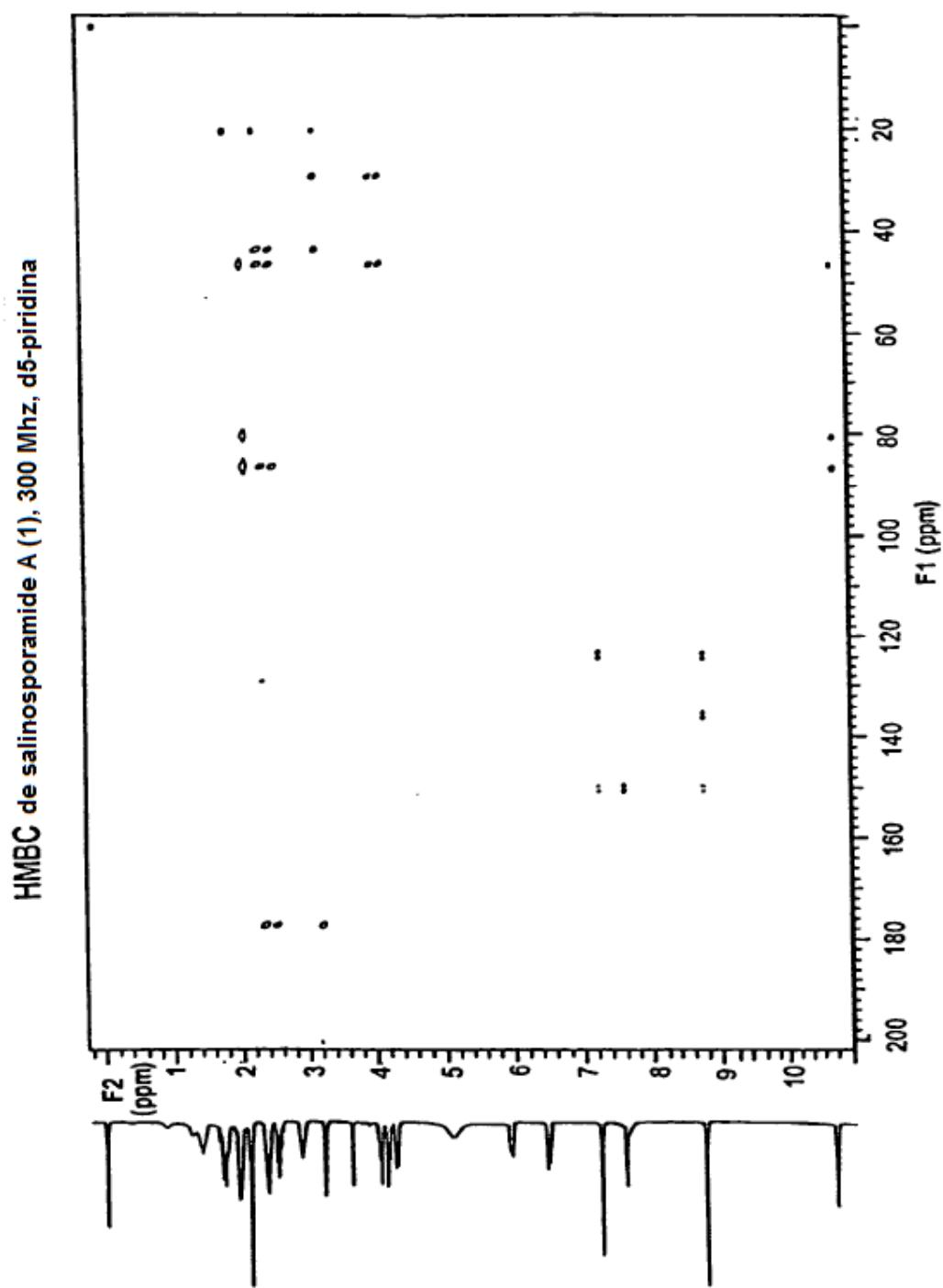


FIG. 9

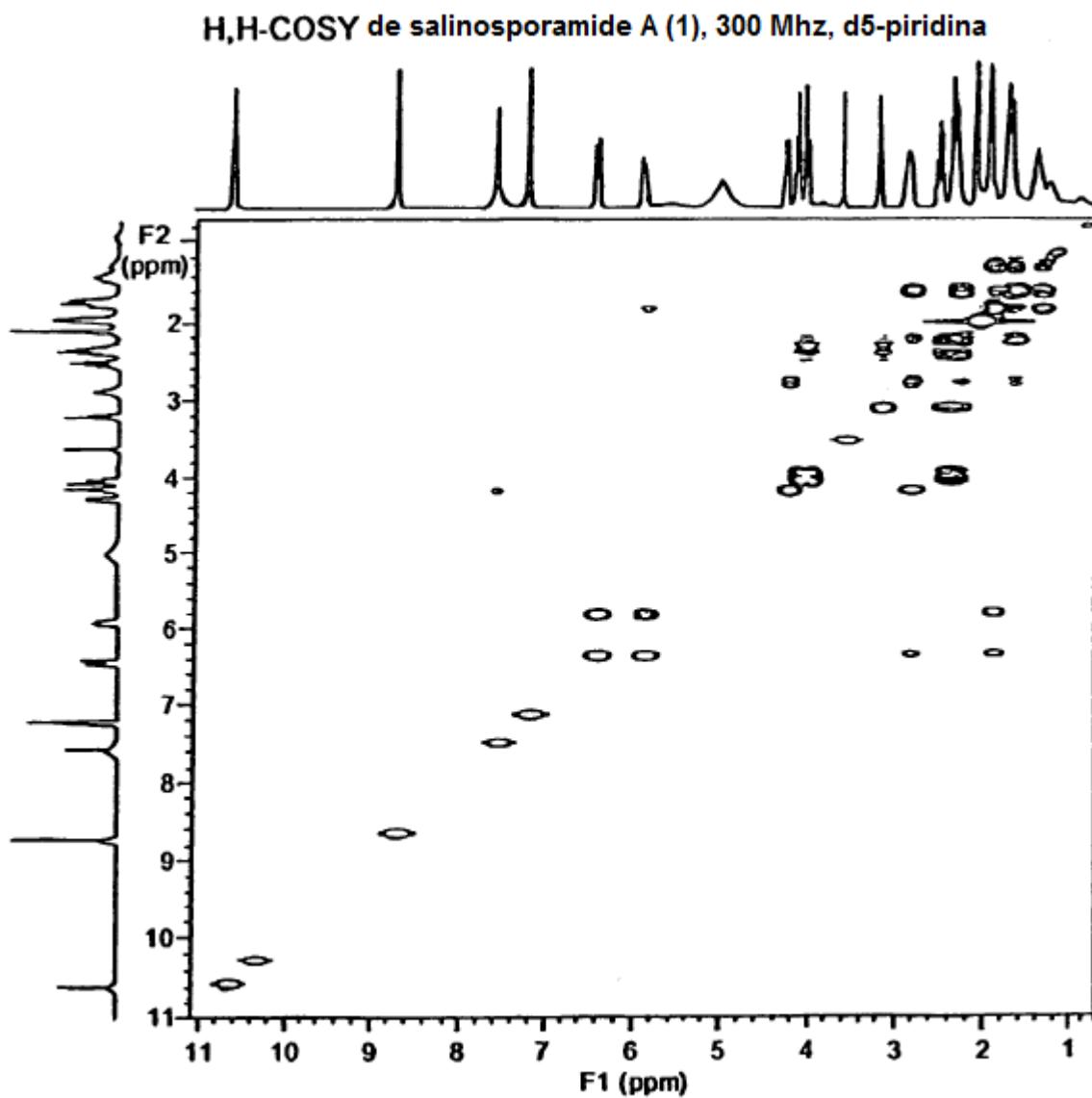


FIG. 10

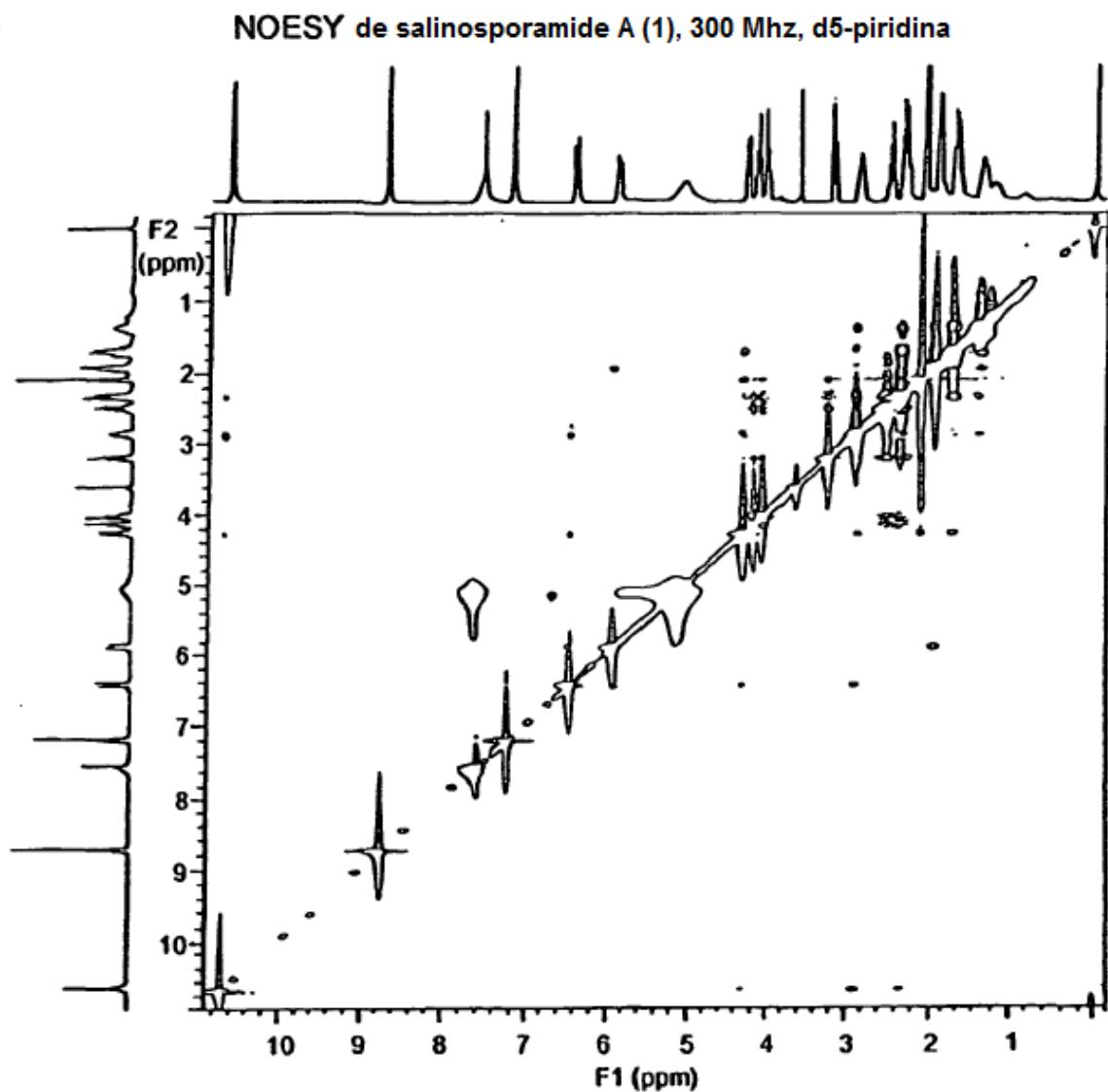


FIG. 11

Mass spectrum (ESI-mode) of salinosporamide A (1)
MS Spectrum
• MSD1 SPC, t₁tempo=10.183;10.383de ROBERTIB392X1.D API-ES, Pos, Scan, Frag: 70

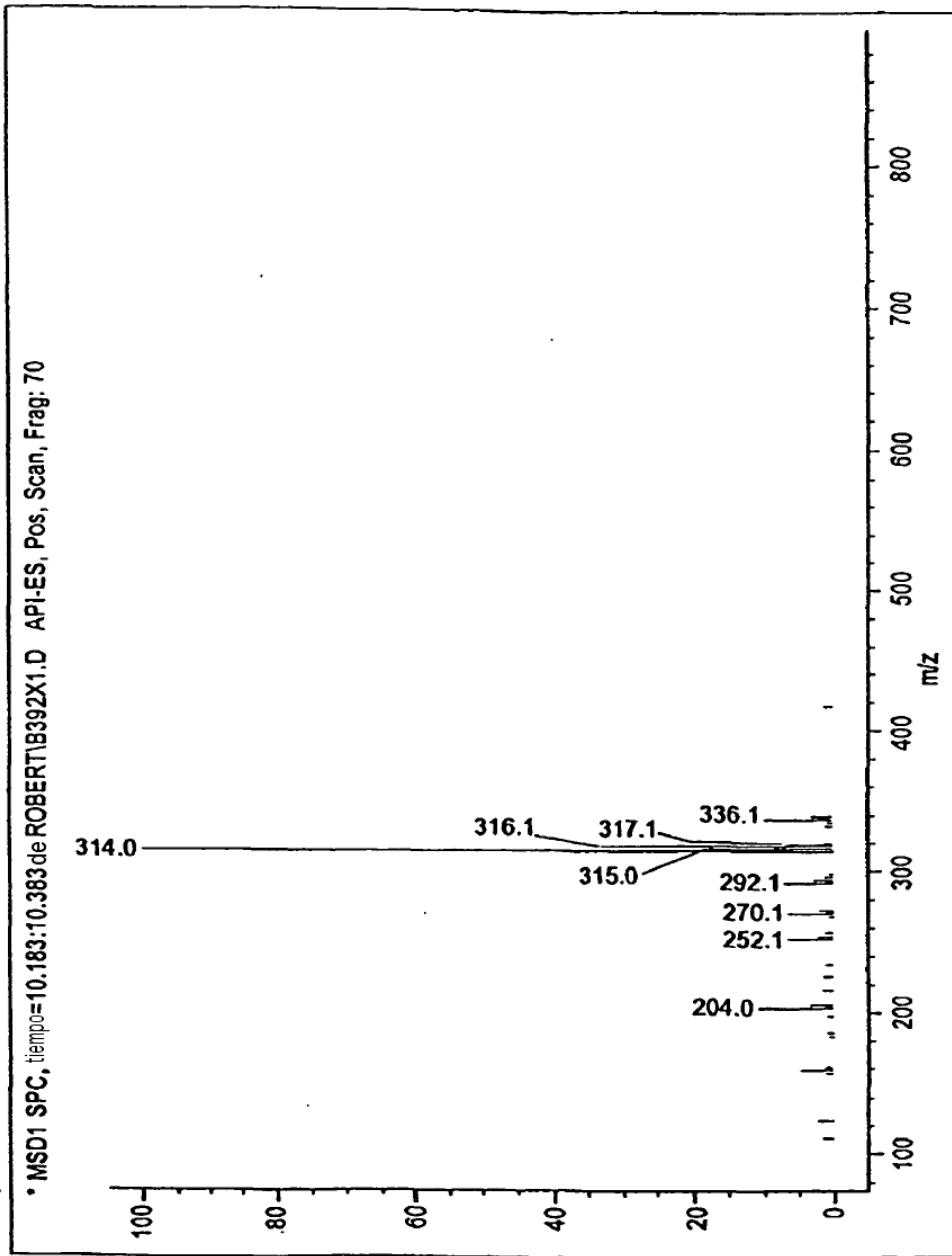
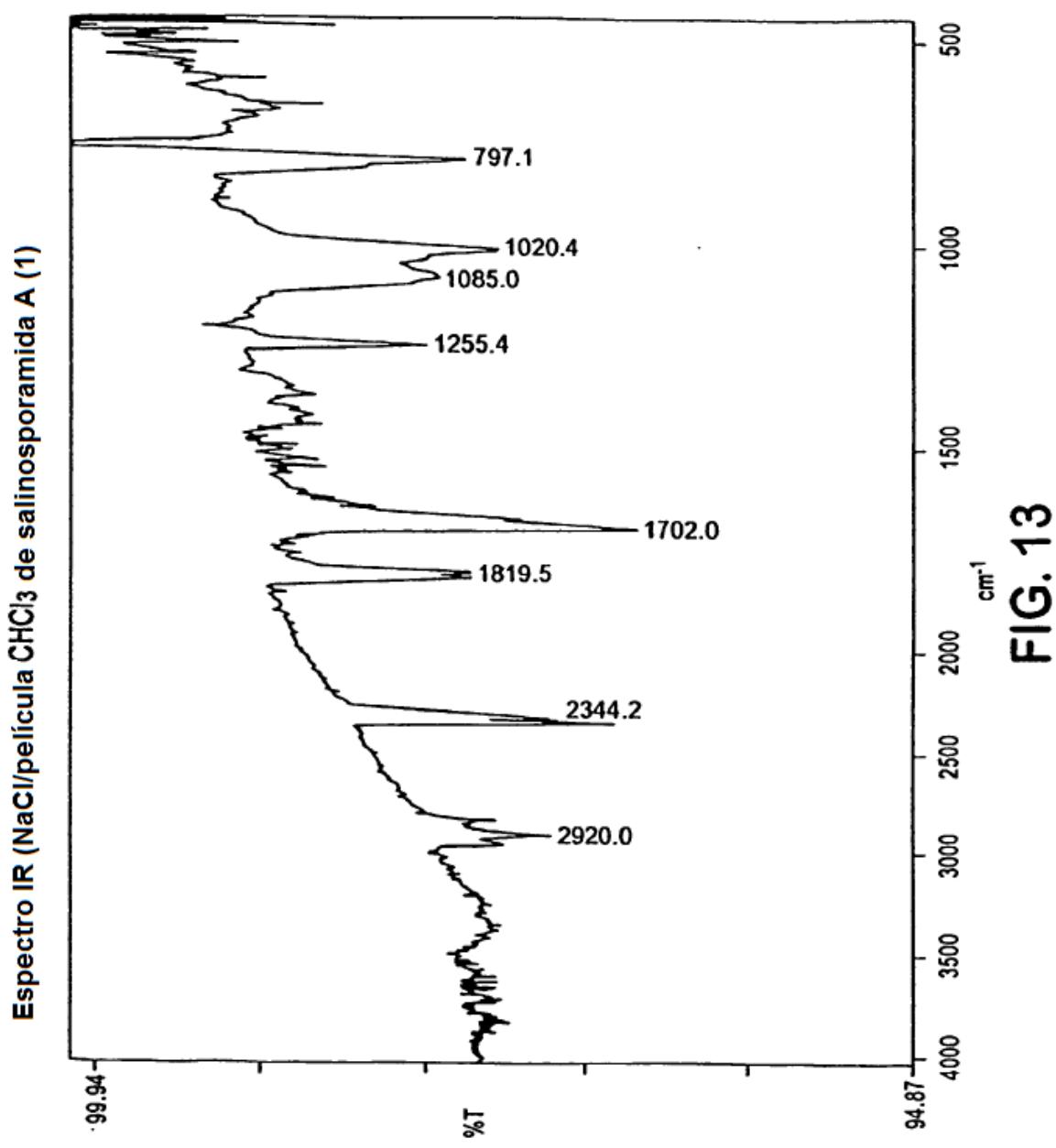


FIG. 12



UV spectrum (LC-DAD, CH₃CN:water 2:1)desalinosporamide A (1)

*DAD1, 11.674:11.807 (40.1 mAU, %Fs) Ref=2.927 & 12.007 deB392XA2.D

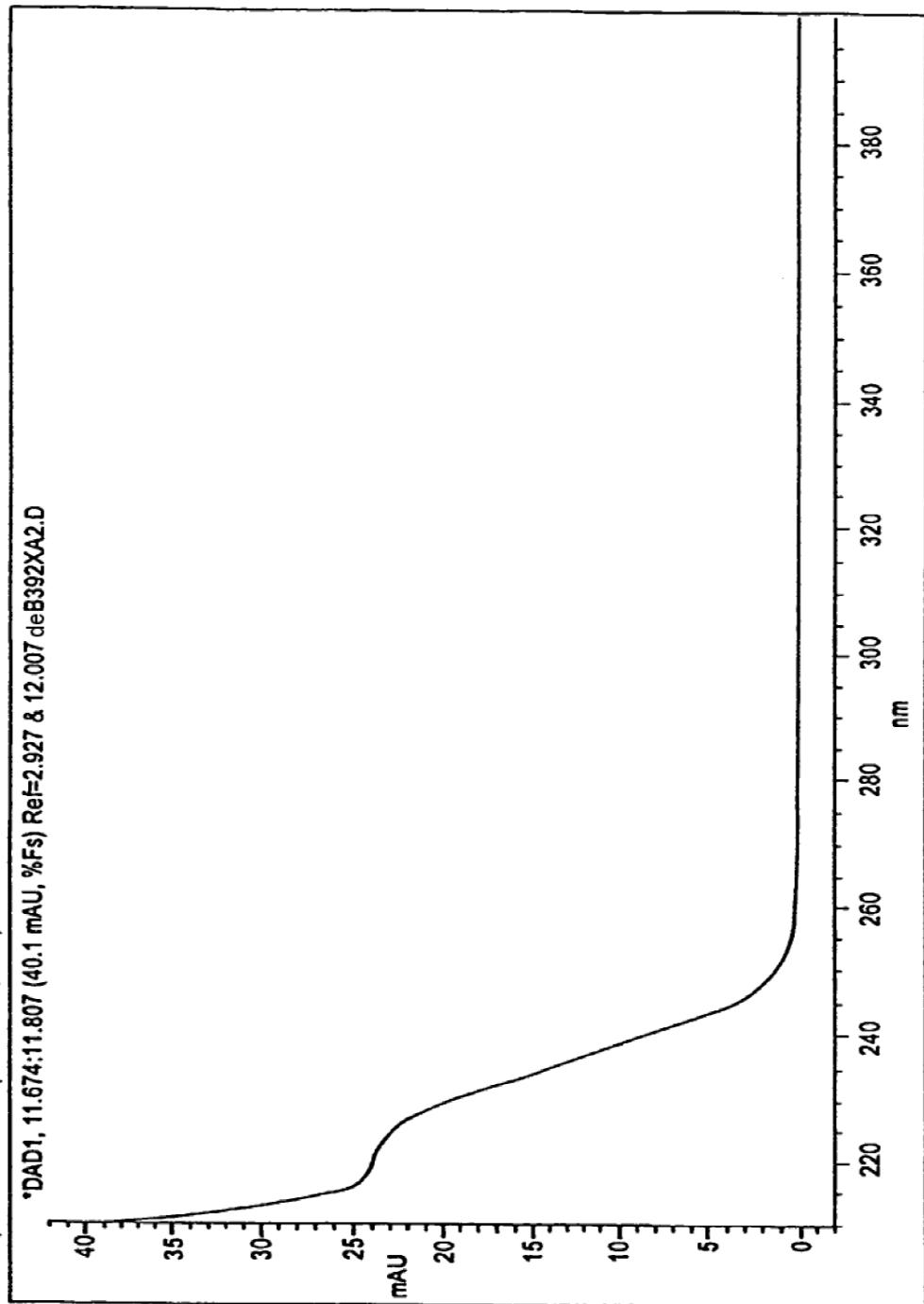


FIG. 14

Posición 16S ADNr	Actinoplanes	Micromonospora	Dactylosporangium	Castellatospora	Pilimelia	Catenuloplanes	Couchioplanes	Sporilioplanes	Verrucosospores	Marinospores
207	U	U	U	U	C	U	U	U	U	A
219	C	C	C	C	U	C	C	C	C	U
279	A	A	A	(AU)	A	A	A	A	A	G
366	A	(AG)	A	A	A	A	A	A	A	C
467	A	A	(GA)	A	G	(GA)	A	A	A	U
468	A	A	A	A	A	A	A	A	A	U
546	G	G	G	G	A	G	G	G	G	A
615	C	(GC)	C	(UC)	U	(GU)	C	C	U	U
1116	C	C	(CU)	C	C	C	C	C	C	U
1456	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G

FIG. 15

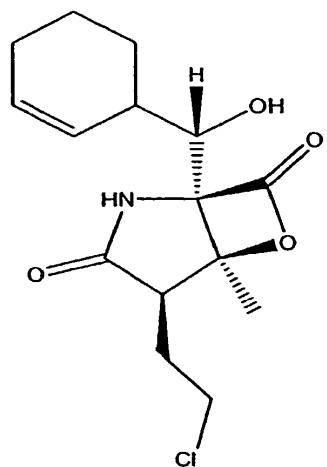


FIG. 16

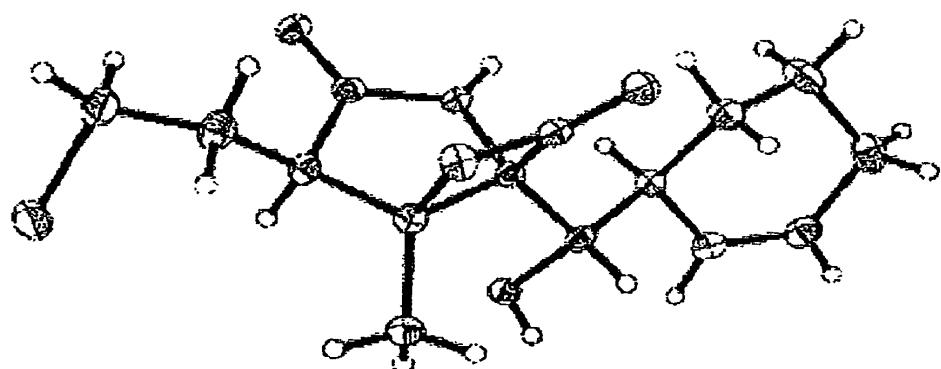


FIG. 17