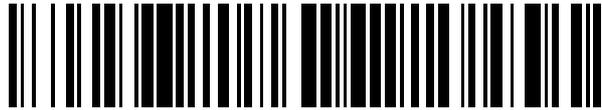


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 778**

51 Int. Cl.:

C07H 17/04 (2006.01)

C07D 313/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2003 E 03762689 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 1521765**

54 Título: **Un metabolito similar a la bafilomicina a partir de una nueva especie de Micromonospora**

30 Prioridad:

02.07.2002 US 393149 P

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

26.05.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. (100.0%)
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:

VAN DUN, JACOBUS, A., J.;
WOUTERS, WALTER, B., L.;
JANICOT, MICHEL, M., F.;
MOCEK, URSULA, MARIA y
LAAKSO, JODI, ANN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 571 778 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

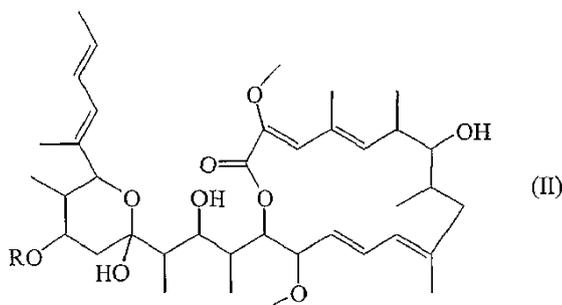
Un metabolito similar a la bafilomicina a partir de una nueva especie de *Micromonospora*

El presente invento se refiere a un nuevo metabolito similar a la bafilomicina aislado a partir de una nueva especie de *micromonosporas*, que tiene una potente actividad antiproliferativa, así como a unos procedimientos para aislar a dicho metabolito, a unas composiciones farmacéuticas que contienen este metabolito y a dicho metabolito destinado a su uso en métodos de tratamiento.

Aunque el conocimiento básico creciente de unas rutas de señalización celular mayoritarias ha permitido el reciente descubrimiento de unas prometedoras "terapias dirigidas" para ayudar a combatir a un cáncer (p.ej. con unos agentes inhibidores de la farnesil transferasa, unas tirosina cinasas de receptores de factores de crecimiento, la Bcr/abl, etc...), unos agentes citotóxicos más clásicos siguen siendo una parte importante del establecimiento de la cartera de productos para oncología en la moderna industria farmacéutica. El éxito parcial de una tradicional quimioterapia citotóxica de un cáncer se origina en gran parte a partir de unos agentes que se derivan de fuentes naturales.

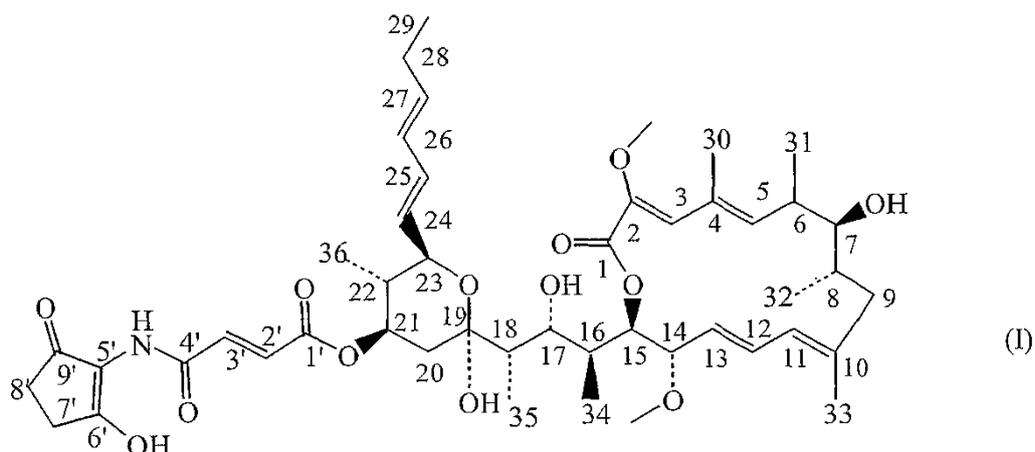
Los macrólidos constituyen un conjunto de antibióticos que incluye miembros naturales. La mayor parte de los macrólidos son producidos por las bacterias *Streptomyces spp.* Sin embargo, también se conocen unos macrólidos producidos por *Micromonospora spp.* Los macrólidos se caracterizan porque ellos están compuestos de un anillo de aglicona grande (con 14 a 16 átomos de carbono) al que se han fijado diversos azúcares. Una serie especial de estos macrólidos la constituyen las bafilomicinas. Estos compuestos comparten la característica estructural de tener un anillo de lactona macrocíclica de 16 miembros y uno o dos azúcares que forman cadenas laterales. Las bafilomicinas antes mencionadas fueron conocidas con anterioridad por tener una actividad como agentes antiparasitarios, antihelmínticos, antibióticos, insecticidas, antifúngicos, agentes para la terapia de enfermedades óseas y como agentes inhibidores de la bomba de protones ATPasa de tipo vacuolar (v-ATPasa). Más tarde, se ha encontrado que cuando se opera a través de ensayos con células tumorales enteras, los compuestos procedentes de este conjunto exhiben una actividad antitumoral.

El documento de solicitud de patente internacional WO 01/02413 describe unos derivados de la bafilomicina de la fórmula (II),



en la que R es -H o -CO-CH=CH-COOH, y unas sales farmacéuticamente aceptables y unos ésteres de los mismos. Estos compuestos presentan una actividad contra el crecimiento de tumores en mamíferos. El documento WO 01/02413 proporciona además un método para el tratamiento o la profilaxia de la invasión de tumores mediante la administración de compuestos de la fórmula (II) o de unos conocidos compuestos macrólidos.

El presente invento abarca una nueva estructura de la fórmula (I), un tautómero de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con una nueva cadena lateral de hexadieno en C23. El compuesto de la fórmula (I) muestra una actividad antiproliferativa y es, de modo sumamente improbable, un sustrato para la P-glicoproteína y/o la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples. El compuesto de la fórmula (I) es un nuevo derivado similar a la bafilomicina, que es aislado a partir de cultivos de fermentación líquidos de nuevos actinomicetos del género *Micromonospora*.



El compuesto de la fórmula (I) fue caracterizado extensamente por su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales. La inhibición dependiente de la dosis del compuesto de la fórmula (I) en cuatro ensayos de proliferación de células tumorales seleccionadas era típica para unos agentes citotóxicos clásicos, con unas curvas de dosis y respuesta con una pronunciada pendiente y estrechas. La observación inicial acerca de la inhibición de la proliferación de células tumorales se extendió a una amplia diversidad de linajes celulares tumorales humanas con origen en el ovario, la próstata, el páncreas, el colon y los pulmones, con unos valores observados de la CI_{50} que están situados en el intervalo de concentraciones del orden de los nM (nanomoles).

La resistencia a fármacos múltiples es considerada como uno de los elementos principales en el fracaso de los cuidados terapéuticos anticancerosos en pruebas clínicas. Los tumores se vuelven resistentes a agentes terapéuticos por sobreexpresión tanto de la P-glicoproteína como de la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples, que representan los elementos principales del sistema Resistente a Fármacos Múltiples. Por otra parte, la expresión constitutiva de una P-glicoproteína en el epitelio intestinal reducirá marcadamente, en el caso de una administración por vía oral, la absorción cuando el compuesto es un sustrato para la P-glicoproteína. La actividad del compuesto de la fórmula (I) sobre la P-glicoproteína o unos linajes celulares tumorales que expresan la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples y sobre las respectivas células parentales fue comparada con la de un sustrato conocido para la P-glicoproteína/Proteína Resistente a Fármacos Múltiples, a saber la adriamicina. El compuesto de la fórmula (I) inhibía la proliferación celular en el intervalo de concentraciones de nM independientemente del estado de expresión de la P-glicoproteína y/o de la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples. Estos resultados sugieren en gran manera que no hay ningún reconocimiento sustancial del compuesto de la fórmula (I) por las proteínas de bomba de P-glicoproteína y de la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples.

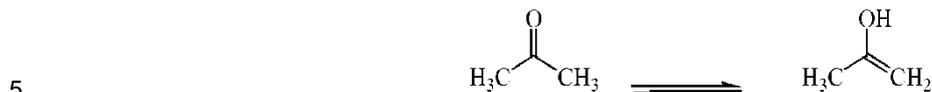
El presente nuevo agente terapéutico del cáncer muestra, de una manera similar a la mayor parte de los miembros de esta clase de compuestos, alguna toxicidad aguda en concentraciones más altas. Las personas expertas en la especialidad serán capaces, no obstante, de determinar un margen terapéutico apropiado dependiendo de la condición del paciente.

Las sales por adición farmacéuticamente aceptables abarcan las sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables y las sales por adición de bases farmacéuticamente aceptables. El compuesto de la fórmula (I) que tiene propiedades básicas puede ser convertido en sus sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables tratándolo con un ácido apropiado. Unos ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, unos ácidos inorgánicos tales como hidrácidos halogenados, p.ej. el ácido clorhídrico o bromhídrico; el ácido sulfúrico; el ácido nítrico; el ácido fosfórico y otros similares; o unos ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos acético, propanoico, hidroxiaacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y otros similares.

El compuesto de la fórmula (I) que tiene propiedades ácidas puede ser convertido en sus sales por adición de bases farmacéuticamente aceptables tratándolo con una apropiada base orgánica o inorgánica. Unas apropiadas formas de sales de bases comprenden, por ejemplo, unas sales de amonio, unas sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, p.ej. unas sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, unas sales con bases orgánicas, p.ej. las sales de benzatina, N-metil-D-glucamina, hidrabramina, y unas sales con unos aminoácidos, tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

El término de "sales por adición de ácidos o bases" comprende también las formas de hidratos y de adición de disolventes que el compuesto de la fórmula (I) es capaz de formar. Unos ejemplos de tales formas son p.ej. los hidratos, alcoholatos y similares.

La estructura abarca varios grupos carbonilo. Estos grupos carbonilo pueden dar lugar a lo que generalmente se denomina "tautomería ceto-enólica". Como un ejemplo se muestran más abajo los tautómeros ceto-enólicos que están en equilibrio. Para las cetonas alifáticas simples está presente en equilibrio muy poca cantidad de la forma enólica. Sin embargo, en otros casos la forma enólica puede estar presente en una concentración más alta.



La tautomería es un tipo de isomería en la que los isómeros solamente difieren por el emplazamiento de un protón y la correspondiente colocación del doble enlace. Los isómeros que están en equilibrio en el estado de solución son denominados tautómeros.

10 Deberá quedar puesto en claro que se entiende que cualquier tautómero de la presente estructura está incluido en el alcance de la presente solicitud.

15 Este invento puede ser puesto en uso en un método para inhibir el crecimiento de tumores, o en un método para el tratamiento de un cáncer, por administración de una cantidad eficaz del compuesto del presente invento a un sujeto, p.ej. a un mamífero (y más particularmente, a un ser humano) que necesita de dicho tratamiento. Los ejemplos de dichos tipos de cánceres que pueden ser inhibidos, no están limitados, sin embargo, a unos cánceres sólidos y hematológicos, una leucemia, unos cánceres de piel tales como un melanoma y un carcinoma de células basales, un

20 cáncer renal, un cáncer de pulmón tal como un cáncer de pulmón de células pequeñas, un cáncer de pulmón de células no pequeñas y un carcinoma de células alveolares, un cáncer de colon, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer pancreático, un cáncer de estómago, un cáncer de tiroides medular, unos cánceres cerebrales y unos cánceres de cabeza y cuello.

25 Estos compuestos pueden ser útiles también en el tratamiento de una neurofibromatosis, una artritis reumatoide, una reestenosis y otras enfermedades proliferativas.

El presente compuesto, a la vista de sus características antibacterianas, es también útil como una medicina antibacteriana. Este invento puede ser puesto en uso en un método para tratar infecciones bacterianas, por administración de una cantidad eficaz del compuesto del presente invento a un sujeto, p.ej. a un mamífero (y más particularmente a un ser humano) que necesita de dicho tratamiento.

El presente invento divulga el compuesto de la fórmula (I) para su uso como una medicina, así como el uso de estos compuestos de la fórmula (I) para la producción de un medicamento destinado a inhibir el crecimiento de tumores.

A la vista de sus útiles propiedades farmacológicas, el presente compuesto puede ser formulado en diversas formas farmacéuticas para finalidades de administración.

30 Para preparar las composiciones farmacéuticas de este invento, una cantidad eficaz de un compuesto particular, en la forma de una sal por adición de base o de ácido, como el ingrediente activo se combina en íntima mezcladura con un vehículo farmacéuticamente aceptable, cuyo vehículo puede adoptar una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación que se desee para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en una forma de dosificación unitaria que es apropiada, preferiblemente, para su

35 administración por vía oral, por vía rectal, por vía percutánea o por inyección parenteral. Por ejemplo, para preparar las composiciones en una forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y compuestos similares en el caso de unas preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones, o unos vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, agentes aglutinantes, agentes desintegrantes y otros similares en el

40 caso de polvos, píldoras, cápsulas y tabletas.

A causa de su facilidad en la administración, las tabletas y las cápsulas representan la forma de unidad de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean evidentemente unos vehículos farmacéuticos sólidos. Para unas composiciones parenterales, el vehículo comprenderá usualmente agua estéril, por lo menos en una gran parte, aunque se pueden incluir otros ingredientes, para ayudar a la solubilidad, por ejemplo, se pueden preparar

45 unas soluciones inyectables, en las que el vehículo comprende una solución salina, una solución de glucosa, o una mezcla de una solución salina y de una solución de glucosa. Se pueden preparar también unas suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear unos apropiados vehículos líquidos, agentes suspendedores y otros similares. En las composiciones apropiadas para una administración por vía percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente acrecentador de la penetración y/o un apropiado agente humectante, combinados

50 opcionalmente con unos apropiados aditivos de cualquier naturaleza en unas proporciones secundarias, cuyos aditivos no causan un importante efecto perjudicial para la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las deseadas composiciones. Estas composiciones se pueden administrar

de diversas maneras, p.ej. como un parche transdérmico, como un agente para aplicarse en un lugar exacto (en inglés spot-on) o como un ungüento.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas más arriba mencionadas en una forma de unidad de dosificación para conseguir facilidad de administración y uniformidad de dosificación. El concepto de forma de unidad de dosificación, como se usa en la memoria descriptiva y en las presentes reivindicaciones, se refiere a unas unidades físicamente discretas que son apropiadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad previamente determinada de un ingrediente activo, que se ha calculado para producir el deseado efecto terapéutico, en asociación con el requerido vehículo farmacéutico. Unos ejemplos de dichas formas de unidades de dosificación son unas tabletas (incluyendo tabletas entalladas o revestidas), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, obleas, soluciones inyectables o suspensiones, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples segregados de los/las mismas.

Los expertos en la especialidad podrían determinar fácilmente la cantidad eficaz a partir de los resultados de ensayos que se presentan aquí seguidamente. En general, se considera que una cantidad efectiva terapéuticamente podría estar situada entre 0,001 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal, y en particular entre 0,5 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la requerida dosis en forma de dos, tres, cuatro o más sub-dosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas sub-dosis pueden ser formuladas como formas de dosificación unitarias, que contienen, por ejemplo, de 0,5 a 500 mg y, en particular, de 10 mg a 500 mg de un ingrediente activo por cada forma de dosificación unitaria.

Breve descripción de los dibujos

FIG 1A: *Inhibición de la proliferación de células tumorales dependiente de la dosis (bioensayo) por el compuesto de la fórmula (I).* Unas células de tumores MCF-7 humanos fueron tratadas con las concentraciones indicadas del compuesto de la fórmula (I) durante 4 días. Los resultados, expresados como el % de las células testigos sin tratar, son el valor de la media \pm el error típico (SE) de por lo menos 3 diferentes experimentos.

FIG 1B: *Inhibición de la proliferación de células tumorales dependiente de la dosis (bioensayo) por el compuesto de la fórmula (I).* Unas células de tumores H7-29 humanos fueron tratadas con las concentraciones indicadas del compuesto de la fórmula (I) durante 4 días. Los resultados, expresados como el % de las células testigos sin tratar, son el valor de la media \pm SE de por lo menos 3 diferentes experimentos.

FIG 1C: *Inhibición de la proliferación de células tumorales dependiente de la dosis (bioensayo) por el compuesto de la fórmula (I).* Unas células de tumores K562/C1,000 humanos fueron tratadas con las concentraciones indicadas del compuesto de la fórmula (I) durante 4 días. Los resultados, expresados como el % de las células testigos sin tratar, son el valor de la media \pm SE de por lo menos 3 diferentes experimentos.

FIG 1D: *Inhibición de la proliferación de células tumorales dependiente de la dosis (bioensayo) por el compuesto de la fórmula (I).* Unas células de tumores Malme-3M humanos fueron tratadas con las concentraciones indicadas del compuesto de la fórmula (I) durante 4 días. Los resultados, expresados como el % de las células testigos sin tratar, son el valor de la media \pm SE de por lo menos 3 diferentes experimentos.

Parte experimental

En el curso de un programa de escrutinio diseñado para identificar nuevos compuestos antitumorales (agentes citotóxicos), se aisló un nuevo metabolito similar a la bafilomicina. El mismo metabolito fue aislado a partir de unos cultivos de fermentación líquidos de dos diferentes actinomicetos del género *Micromonospora*. El *Micromonospora* spp. JS1035 fue aislado a partir de unos sedimentos fluviales procedentes de Sombo, Camerún, mientras que el *Micromonospora* spp. JS1044 fue aislado a partir de unos sedimentos fluviales procedentes de Mundemba, Camerún. Tan pronto como se detectó que ambas cepas producían el mismo compuesto activo, se decidió caracterizar aún más el compuesto que estaba presente en cultivos de fermentación líquidos procedentes de *Micromonospora* spp. JS1035. Un cultivo de cada microorganismo utilizado para la producción de este nuevo macrólido ha sido depositado en el Laboratorio de Microbiología en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos en la Universidad de Gante bajo el número de acceso LMG P-21525 para el *Micromonospora* spp. JS1035 y bajo el número de acceso LMG P-21526 para el *Micromonospora* spp. JS1044. Estos depósitos han sido hechos acogiendo a las disposiciones del Tratado de Budapest, y todas las restricciones acerca de la disponibilidad de los mismos para el público serán mantenidas irrevocablemente al concederse una patente para esta solicitud.

General

Fermentación y aislamiento

Unos cultivos de fermentación líquidos de *Micromonospora* spp. JS1035 se extrajeron con acetato de etilo para proporcionar el extracto crudo que subsiguientemente fue purificado usando una cromatografía de reparto en contracorriente, del inglés counter current partition chromatography (acrónimo CPC). El material puro para la explicación de la estructura se obtuvo después de dos consecutivos fraccionamientos por CPC usando diferentes

condiciones. Un análisis por espectro de masas (véase la Tabla 1) de este material indicó un peso molecular de 853 y una fórmula molecular de $C_{47}H_{67}NO_{13}$.

Tabla 1 Propiedades físico químicas del compuesto de la fórmula (I)

Aspecto	Material sólido de color pardo claro
Punto de fusión	114-120°C
$[\alpha]_D^{25}$	-38,0 (c 0,1, MeOH)
Fórmula Molecular	$C_{47}H_{67}NO_{13}$
Pos. en ESI*-MS	854 (M+H) ⁺
HRFAB*-MS (m/z)	Encontrado: 876,4514 Calculado: 876,4510 (para $C_{47}H_{67}NO_{13}Na$)
UV (MeOH) λ_{max} nm (ϵ)	233,286,345
IR* ν_{max} (película) cm^{-1}	3408, 2923, 1717, 1687, 1614, 1247, 1097, 751

5 * ESI: acrónimo de Electron Spray Ionisation = ionización por impacto electrónico, HRFAB: acrónimo de High Resolution Fast Atom Bombardment = bombardeo con átomos rápidos de alta resolución, IR: acrónimo de Inversion Recovery = recuperación de la inversión

Determinación de la estructura

10 Los datos de resonancia magnética nuclear = Nuclear Magnetic Resonance con el acrónimo NMR para el compuesto de la fórmula (I) se obtuvieron inicialmente en $CDCl_3$. Sin embargo, prontamente se descubrió que el compuesto de la fórmula (I) no era estable en este disolvente. Un subsiguiente trabajo por NMR se realizó usando acetona- d_6 y proporcionó un complejo espectro de NMR de protones. Se obtuvo una plena tanda de experimentos de NMR que incluyen ^{13}C NMR, Intensificación sin Distorsión por Transferencia de la Polarización = Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT), Espectroscopia Correlacionada = Correlated Spectroscopy (COSY), Coherencia de Cuantos Múltiplos Heteronucleares = Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) y Coherencia de Bandas Múltiplos Heteronucleares = Heteronuclear Multiple Band Coherence (HMBC)

15 El ensamble de las estructuras parciales para el compuesto de la fórmula (I) fue sencillo. Los datos de NMR (Tabla 2) para el macrólido, C16-C23, y C1'-C4' estaban en buena concordancia con los datos publicados. (Werner G. y colaboradores J. Antibiotics 37: 110-117, 1984). La fijación de la nueva cadena lateral de hexadieno (C24-C29) se efectuó mediante un cuidadoso estudio de las correlaciones entre átomos relevantes. Por ejemplo, el H24 mostró una correlación según HMBC con los C22 y C23, y el H25 mostró también una correlación según HMBC con el C23. Los datos de COSY fueron también coherentes con la colocación de la nueva cadena lateral en C23. Varias señales de ^{13}C NMR (en C5', C6' y C9') correspondientes al anillo de ciclopentenona fueron ocultadas en el espectro de ^{13}C NMR, probablemente debido a la presencia de unas estructuras de resonancia entre el OH vinílico y el grupo carbonilo.

20 Otros informes publicados detallan la estereoquímica para otras bafilomicinas y otros miembros de esta clase (O'Shea M. y colaboradores J. Antibiotics 50: 1073-1077, 1997). Las moléculas de esta clase tienen la misma estereoquímica para el anillo de lactona, el anillo de tetrahidropirina y el enlace C16-C18. Todas ellas poseen una red de enlaces de hidrógeno que incluye a C19OH, C17OH y C1=O. Esta red define de una manera efectiva la configuración de la cadena lateral. Basándose en el análisis de la constante de acoplamiento, del desplazamiento químico y de los datos de Espectroscopia por Efecto de Overhauser de Marco Rotatorio = Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY), la estereoquímica propuesta del compuesto de la fórmula (I) es coherente con esta conformación. La nueva cadena lateral de hexadieno en C23 fue asignada como alfa con relación al anillo basándose en dos correlaciones claves según la ROESY. Existe una correlación entre H23 y CH_3 -36 y también entre H23 y H21. Estas correlaciones serían improbables a menos que el H23 estuviese situado por encima del anillo.

Tabla 2. Desplazamientos químicos en NMR 1H y ^{13}C para el compuesto de la fórmula (I)^a

	δ_C (ppm)	M	δ_H (ppm)
1	167,57	S	
2	141,97	S	
3	133,35	d	6,63 (1H, s)
4	132,74	s	
5	145,55	d	5,94 (1H, d, 8,7)

ES 2 571 778 T3

	δ_c (ppm)	M	δ_H (ppm)
6	37,85	d	2,52 (1H, m)
7	80,17	d	3,28 (1H, br d, J 5,4)
8	41,93	d	1,86(1H, m)
9	42,27	t	2,12 (1H, m), 2,03 (1H, m)
10	144,98	s	
11	125,19	d	5,80 (1H, d, 10,7)
12	134,53	d	6,67 (1H, dd, 15,0, 10,8)
13	126,95	d	5,12 (1H, m)
14	82,98	d	4,07(1H, m)
15	77,01	d	4,96 (1H, dd, 8,4, 1,3)
16	38,23	d	2,13 (1H, m)
17	70,80	d	4,11 (1H, m)
18	42,27	d	1,84 (1H, m)
19	100,26	s	
20	40,22	t	2,35 (1H, dd, 11,7, 4,8), 1,34 (1H, m)
21	75,11	d	5,08 (1H, m)
22	41,81	d	1,50 (1H, m)
23	75,34	d	4,14 (1H, m)
24	130,81	d	5,50 (1H, dd, 15,1, 7,6)
25	133,51	d	6,18 (1H, dd, 15,5, 15,4)
26	129,72	d	5,99 (1H, dd, 15,1, 10,5)
27	137,21	d	5,70 (1H, m)
28	26,16	t	2,09 (2H, m)
29	13,73	q	0,97 (3H, d, 2,8)
30	14,13	q	1,94 (3H, br s)
31	17,62	q	1,03 (3H, d, 7,0)
32	22,20	q	0,90 (3H, d, 6,8)
33	20,33	q	1,93 (3H, br s)
34	10,02	q	0,85 (3H, m)
35	7,2	q	1,00 (3H, d, 2,5)
36	11,61	q	0,85 (3H, m)
2-OCH3	59,94	q	3,50 (3H, s)
14-OCH3	55,63	q	3,23 (3H, s)
1'	168,14	s	
2'	134,97	d	7,57 (1H, d, 15,3)
3'	132,97	d	6,82 (1H, d, 15,3)
4'	165,00	s	
5'	^b	s	
6'	^b	s	
7'	27,75	t	2,52 (2H, m)
8'	37,31	t	2,52 (2H, m)
9'	^b	s	

^a δ en ppm, valor de J en Hz. Los datos fueron registrados a 500 y 125 MHz, respectivamente en acetona- d_6 .

^bseñal no observada.

Actividad biológica

Se usó un jurado de ensayos de proliferación celular (que se citan en el presente contexto como "bioensayos") basándose en la inhibición de la proliferación celular en unos linajes celulares tumorales humanas seleccionados MCF-7 mamario, HT-29 de colon, K562/C1,000 de leucemia y Malme-3M de melanoma) con el fin de identificar actividades antiproliferativas en las diferentes muestras a lo largo de los procesos de purificación. Unos extractos procedentes de la cepa JS1035, que crecieron en cuatro diferentes medios, se ensayaron en unos bioensayos; el que contenía la mayor parte de la actividad antiproliferativa se seleccionó para un estudio ulterior. Una dilución a 1:1.000 del extracto activo dio como resultado una inhibición casi completa de la proliferación celular en los tres linajes celulares ensayados (el linaje celular Malme-3M de melanoma fue omitido en este estadio). A partir de este extracto crudo inicial, unas fracciones recogidas a partir de una cromatografía de reparto en contracorriente fueron analizadas individualmente acerca de proliferación de células de MCF-7. Se mostró que contenía actividad antiproliferativa una única fracción mayoritaria, la cual fue purificada luego por HPLC (Cromatografía de Fase Líquida de Alto Rendimiento). Se encontró que un único pico de HPLC contenía actividades antiproliferativas medidas por inhibición de la proliferación de células en el bioensayo. Este pico se usó para iniciar la explicación de la estructura del compuesto activo de la fórmula (I). El subsiguiente trabajo acerca de la estructura se completó usando un material aislado con dos consecutivas etapas de CPC.

El compuesto purificado de la fórmula (I) fue caracterizado extensamente por su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales. Tal como se indica en las Figuras 1A-D, la inhibición dependiente de la dosis del compuesto de la fórmula (I) en los cuatro ensayos de proliferación de células tumorales que se seleccionaron, era típica de unos clásicos agentes citotóxicos, con unas curvas de dosis y respuesta con pendientes muy pronunciadas y estrechas. El compuesto de fórmula (I) exhibió una potencia similar para la inhibición de la proliferación de células tumorales en el intervalo de concentraciones del orden de nM con una actividad ligeramente más alta en células de carcinoma HT-29 de colon (en concentraciones por debajo de las nanomolares) (Tabla 3). La observación inicial acerca de la inhibición de la proliferación de células tumorales fue extendida a una amplia diversidad de células tumorales humanas que se originaban de un ovario, una próstata, un páncreas, un colon y un pulmón con unos valores de CI_{50} observados que se encontraban en el intervalo de concentraciones del orden de nM (Tabla 4).

La actividad del compuesto de la fórmula (I) en linajes celulares tumorales que expresan la P-glicoproteína o la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples y las respectivas células parentales, K562/C1,000+ y K562A7, COR-L23/R y COR-L23, se comparó con la de un sustrato conocido para la P-glicoproteína/ Proteína Resistente a Fármacos Múltiples, a saber la adriamicina. Tal como se indica en la Tabla 5, el compuesto de la fórmula (I) inhibía la proliferación de células en el intervalo de concentraciones del orden de nM, independientemente del estado relativo de expresión de la P-glicoproteína y la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples (no había ninguna diferencia significativa entre los valores de CI_{50}). Por el contrario, las células, K562/C1,000+ y CORL23/R exhibieron una resistencia respectivamente 250 veces mayor y 20 mayor a la aniquilación de células por la adriamicina, en comparación con sus respectivos linajes celulares parentales. Estos resultados sugerían firmemente que no hay un reconocimiento sustancial del compuesto de la fórmula (I) por las proteínas de bomba de la P-glicoproteína y de la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples.

Tabla 3. *Inhibición de la proliferación de células tumorales por el compuesto de la fórmula (I).*

La sensibilidad a la aniquilación de células por el compuesto de la fórmula (I) se avaluó en células de MCF-7 de mama, HT-29 de colon, K562/C1,000 de leucemia y Malme-3M de melanoma. La viabilidad de las células se determinó después de una incubación durante 4 días en ausencia (testigo) o en presencia de concentraciones crecientes del compuesto de la fórmula (I). Los resultados, en forma de media \pm SE, de por lo menos tres experimentos separados se expresan como valores de CI_{50} (en nM).

Linajes celulares	Compuesto de fórmula (I)
MCF-7	1,92 \pm 0,35
HT-29	0,61 \pm 0,04
K562/C1,000	9,89 \pm 7,35
Malme-3M	7,96 \pm 2,73

Tabla 4. *Efecto del compuesto de la fórmula (I) sobre la proliferación de células tumorales humanas.* La actividad del compuesto de la fórmula (I) sobre la proliferación de células tumorales se averiguó en varios linajes celulares tumorales humanas procedentes de diversos orígenes. Tal como se indica en la sección de *Materiales y Métodos*, un período de tiempo de incubación de 4 días en ausencia (testigo) o en presencia de concentraciones crecientes del compuesto de la fórmula (I) fue seguido por una determinación de la viabilidad de células usando el método de tinción con MTT. Los resultados, la media \pm SE procedentes de por lo menos dos experimentos separados, se expresan como valores de CI_{50} (en nM) que representan la concentración de un compuesto requerido para inhibir la proliferación celular en un 50 %.

Linaje celular	Origen del tejido	Compuesto de fórmula (I)
A2780	Ovario	1,37 ± 0,13
DU 145	Próstata	1,95 ± 0,30
Capan-1	Páncreas	6,93 ± 3,39
HCT 116	Colon	1,56 ± 0,03
LoVo	Colon	5,98 ± 5,52
H1299	Pulmón	1,46 ± 0,13

5 **Tabla 5.** ¿El compuesto de la fórmula (I) es un sustrato para la P-glicoproteína/la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples? La sensibilidad a la aniquilación de células por el compuesto de la fórmula (I) y por adriamicina se comprobó en células parentales de leucemia K562A7 humana y en la contrapartida que sobreexpresa la P-glicoproteína, células K562/C1,000+; así como células de COR-L23 de carcinoma de células pequeñas parentales, en la contrapartida que sobreexpresa la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples, COR-L23/R. La viabilidad de las células se determinó después de una incubación durante 4 días en ausencia (testigo) o en presencia de concentraciones crecientes del compuesto de la fórmula (I). Los resultados, media ± SE, procedentes de por lo menos dos experimentos separados, se expresan como valores de CI_{50} (en nM).

Linaje celular	Compuesto de fórmula (I)	Adriamicina
K562A7	14,08 ± 1,25	26,78 ± 5,82
K562/C1,000+	29,34 ± 1,80	7,829 ± 806
COR-L23	5,13 ± 0,91	36,57 ± 19,09
COR-L23/R	6,90 ± 0,24	676 ± 261

10 **Ejemplo 1**

Determinación de la estructura

15 Los espectros de 1H y ^{13}C NMR fueron registrados a 300K en un espectrómetro Bruker Avance DRX 500 que funcionaba a 500 y 125 MHz, respectivamente. Se usaron unas secuencias patrones de impulsos para los experimentos de DEPT, COSY, HMQC y HMBC. Los datos de ROESY se adquirieron usando un impulso de bloqueo de espín a 300.000 μs (a 22 dB). Los puntos de fusión fueron determinados usando un aparato para el punto de fusión Electrothermal 9100 y están sin corregir. Los datos acerca de la Recuperación de la Inversión (IR) se midieron usando un espectrofotómetro de Perkin Elmer 1600 serie FTIR. Un polarímetro de Perkin-Elmer 243B se usó para procurar datos de rotación óptica. Un MS (Espectro de Masas) de alta resolución se obtuvo usando un Espectrómetro de Masas Híbrido en Tándem Micromass 70SEQ. La CPC se realizó en un cromatógrafo en contracorriente a alta velocidad de P.C., Inc., que estaba equipado con una columna de bobina de capas múltiples Ito que estaba conectada en interfase con un detector de Matriz de Fotodiodos de Waters 991 (que vigilaba a 270 nm).

Fermentación y aislamiento

25 La cepa JS1035 de actinomicetos se aisló a partir de un sedimento del fondo de río recogido cerca de Sombo, Camerún. El medio de siembra contenía 20 g, de glucosa, 15,0 g de Pharmamedia (Trader's Protein), 5,0 g de un extracto de levadura, 4,0 g de $CaCO_3$, 3,0 g de $(NH_4)_2(SO_4)$, 0,03 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ en 1 l de agua destilada, el pH se había ajustado a 6,5. El medio de producción contenía 20,0 g, de glucosa, 50,0 g de dextrina, 30,0 g de Pharmamedia (Trader's Protein), 1,0 g de un extracto de levadura, 5,0 g de $CaCO_3$, 0,001 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ en 1 l de agua destilada, el pH se había ajustado a 7,0. Los medios fueron dispensados en partes alícuotas de 25 o 30 ml a unos matraces con una capacidad de 250 ml y se autoclavaron durante 15 minutos. Unos materiales de alimentación congelados de esporas (1,0 ml) se usaron para inocular unos cultivos iniciadores (25 ml de medios de siembra por cada matraz Erlenmeyer de 250 ml). Los cultivos iniciadores fueron incubados a 28°C y con una humedad de ~ 75% en un sacudidor agitador orbital (carrera de 2", 250 rpm) durante 48 h. Los cultivos iniciadores (1 ml) se usaron para inocular 200 matraces con medios de producción (30 ml de los medios de producción por cada matraz Erlenmeyer de 250 ml), que luego fueron incubados durante 6 días en las condiciones más arriba mencionadas.

35 Se añadió a cada matraz acetato de etilo (22,5 ml) y los contenidos de los matraces se agruparon dentro de unas botellas de centrifuga con una capacidad de 500 ml. Cada botella fue agitada energicamente y centrifugada a 6.000 x g durante 8 minutos. El acetato de etilo se retiró desde cada botella y se secó sobre Na_2SO_4 . El acetato de etilo se añadió de nuevo a las botellas de centrifuga hasta llegar a un volumen total de aproximadamente 450 ml, y el proceso se repitió. El extracto se secó bajo presión reducida para proporcionar un extracto crudo (5,4 g).

Una parte alícuota (400 mg) del extracto crudo se sometió a una CPC. El sistema de disolventes se componía de una mezcla equilibrada de n-hexano, EtOAc, MeOH y agua (1:3:3:3, v/v/v/v). La fase inferior se usó como la fase estacionaria y la fase superior sirvió como la fase móvil que fue bombeada a razón de 3 ml/minuto. La velocidad de rotación de la columna era de 800 rpm. El extracto crudo se preparó disolviéndolo en una mezcla de fases superior e inferior. El material se cargó luego sobre la columna. El primer pico en eluirse se recogió y secó para proporcionar 303 mg de un material purificado. Este material se sometió de nuevo a una cromatografía CPC usando unas condiciones modificadas. El sistema modificado de disolventes consistía en una mezcla equilibrada de agua, MeOH, y n-hexano (1:9:10, v/v/v). De nuevo, la fase inferior se usó como la fase estacionaria y la fase superior sirvió como la fase móvil. Después de 90 minutos, las fases superior e inferior fueron cambiadas y el primer pico en eluirse después del cambio de disolventes se recogió y secó para proporcionar 9,2 mg del compuesto puro de la fórmula (I). Inicialmente, el compuesto de la fórmula (I) se aisló usando una HPLC después de la primera separación por CPC. En ese caso, la fracción activa de la CPC fue separada ulteriormente usando una HPLC de fase inversa (de LiChrospher, 10 µm, 10 x 25 mm, C₁₈). Se usó un gradiente lineal comenzando con 95:5 de CH₃CN:H₂O hasta con 100 % de CH₃CN durante 25 minutos para aislar el compuesto de la fórmula (I). Una inyección para HPLC de 5 mg proporcionó 0,5 mg del compuesto (I).

Fármacos

Todas las muestras ensayadas fueron disueltas en DMSO (dimetilsulfóxido) y se hicieron diluciones adicionales (típicamente a 1:1,000) en un medio de cultivo, no excediendo las concentraciones finales de DMSO jamás de 0,1 % (v/v) en unos ensayos de proliferación de células. Las sales MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio], MTS [sal interna de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio] y PMS [metosulfato de fenazina] se disolvieron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Las MTT y MTS son ambas unas sales de tetrazolio ampliamente usadas en ensayos de proliferación y toxicidad de células. Después de haber entrado en una célula, estas sales de tetrazolio son (bio)reducidas para dar un derivado de formazano intensamente coloreado. En el caso de la MTT, el formazano formado es cristalino y necesita ser disuelto antes de efectuar la cuantificación colorimétrica. La MTS necesita un aceptor de electrones intermedio (PMS) para su eficiente reducción a la forma del producto final de formazano soluble y se usa para linajes celulares en suspensión.

Linajes celulares y cultivo de células

Las células de adenocarcinoma mamario MCF-7 se cultivaron en un medio de Eagle modificado por Dulbecco, del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 50 µg/ml de gentamicina y 5 % de suero de ternero fetal. Las células de carcinoma de colon HT-29 humano fueron cultivadas en el medio 5a de Mc Coy suplementado con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 5 % de suero de ternero fetal. Las células de melanoma Malme-3M humano fueron cultivadas en un medio DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de Na, 50 µg/ml de gentamicina y 10 % de suero de ternero fetal. Las células de carcinoma de próstata DU 145 humano se cultivaron en un medio DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 10 % de suero de ternero fetal. Las células de adenocarcinoma pancreático Capan-1 humano se cultivaron en un medio DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de Na, 50 µg/ml de gentamicina y 10 % de suero de ternero fetal inactivado por calor. Las células de carcinoma colorrectal HCT 116 humano se cultivaron en un medio 5a de Mc Coy suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de Na, 50 µg/ml de gentamicina y 10 % de suero de ternero fetal. Las células no pequeñas de carcinoma de pulmón H1299 humano fueron cultivadas en un medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de Na, 10 mM de HEPES y 10 % de suero de ternero fetal inactivado por calor. Todos estos linajes celulares se obtuvieron a partir de la ATCC [American Type Culture Collection [Colección Americana de Cultivos Tipo], Manassas, VA, EE.UU.]. El linaje celular de carcinoma de ovario A2780 humano fue una amable donación del Dr. T.C. Hamilton [Fox Chase Cancer Centre, Pensilvania, EE.UU.] y se cultivó en un medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 10 % de suero de ternero fetal. El linaje celular de adenocarcinoma de colon LoVo humano fue una amable donación del Dr. M. Grandi [Pharmacia-Fice, Nerviano, Milán, Italia] y se cultivó en un medio F12 de HAM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 1 % de vitaminas (BME) y 10 % de suero de ternero fetal. Las células fueron mantenidas rutinariamente en forma de cultivos de monocapas a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. El linaje celular de leucemia K562/C1,000 humana fue una amable donación del Dr. H. Heyligen [Dr. Willems Instituut, Diepenbeek, Bélgica] y es un linaje celular que expresan la P-glicoproteína, que se había obtenido cultivando las células en concentraciones crecientes de colquicina. Las células fueron mantenidas en forma de un cultivo en suspensión a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en un medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 5 % de suero de ternero fetal. El linaje celular de leucemia K562A7 humana fue una amable donación del Dr. H. Heyligen y es el linaje de células parentales sensibles a fármacos de las células K562/C1,000. El linaje celular K562/C1,000+ se obtuvo cultivando las células de K562/C1,000 durante 2 semanas adicionales con 1 µM de colquicina. Este tratamiento induce unos más altos niveles de la P-glicoproteína y del ARNm y un más estable perfil de resistencias. Las células fueron mantenidas en forma de un cultivo en suspensión a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en un medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 5 % de suero de ternero fetal. Los linajes celulares de cáncer de pulmón de células grandes humanas se obtuvieron a partir de la ECACC (European Collection of Cell Cultures [Colección Europea de Cultivos Celulares], Salisbury, R.U.). El COR-L23 es el linaje de células parentales sensibles a fármacos

5 y el COR-L23/R es la variante resistente a fármacos múltiples que expresa la Proteína Resistente a Fármacos Múltiples, desarrollado por incubación in vitro escalonada continua de células COR-L23 con concentraciones crecientes de doxorubicina. El medio de cultivo para ambos linajes celulares consistía en un RPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 10 % de suero de ternero fetal. Las células fueron mantenidas rutinariamente en forma de cultivos de monocapas a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % . Todos los medios y suplementos se obtuvieron de LifeTechnologies, Merelbeke, Bélgica. Las células estaban libres de contaminación por micoplasmas tal como se determinó usando el estuche de cultivo de tejidos de *Mycoplasma* Gen-Probe [de BioMérieux, Bruselas, Bélgica].

Ensayos de proliferación celular

10 Los ensayos de proliferación celular se realizaron tal como se ha descrito (una evaluación crítica del uso de los ensayos de tetrazolio en microcultivo para medir el crecimiento y la función de las células (Mossman, T. J. Immunol Meth 65: 55-63, (1983)).

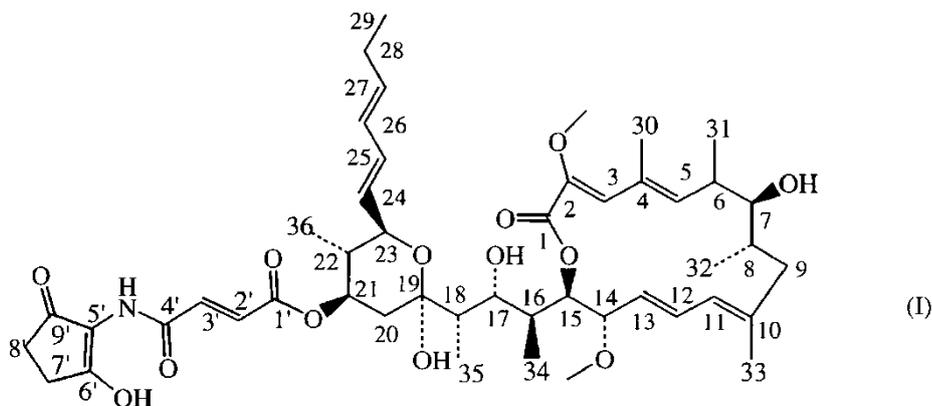
15 En el caso de linajes celulares adherentes las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos Falcon/NUNC [Life Technologies, Merelbeke, Bélgica] y se dejaron adherir al material plástico durante 18-48 horas. Luego se cambió el medio y se añadieron fármacos y/o disolventes. Después de una incubación durante 4 días, se evaluó la densidad de las células usando un ensayo basado en MTT, que mide la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro de 96 pocillos Emax [de Sopachem, Bruselas, Bélgica]. Para los experimentos con el cultivo en suspensión, las células K562A7, K562/C1,000 y K562/C1,000+ se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos Falcon®. Los fármacos y/o el medio de ensayo se añadieron inmediatamente después de haber sembrado. Después

20 de una incubación durante 4 días, el crecimiento de las células se avaluó usando un ensayo basado en MTS/PMS que media la absorbancia a 490 nm usando un espectrofotómetro de 96 pocillos Emax.

25 La actividad antiproliferativa se calcula como el porcentaje de células viables remanentes en condiciones tratadas en función del testigo (células no tratadas). Los resultados son expresados como valores de la CI₅₀, que representa la concentración del compuesto que se requiere para inhibir la proliferación de células en un 50 %. Dentro de un experimento, el resultado para cada condición experimental es la media de por lo menos 3 pocillos de réplica.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I)



(I)

un tautómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto como se describe en la reivindicación 1.
3. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 2, en el que una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 se mezcla íntimamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 4. Un procedimiento para la producción de un compuesto de la fórmula (I) como se ha definido en la reivindicación 1, que comprende cultivar una cepa de un microorganismo que es capaz de producir un compuesto de la fórmula (I), recuperar el compuesto de la fórmula (I) a partir del caldo cultivado y, opcionalmente, salificar el compuesto recuperado.
- 15 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el microorganismo es una especie de *Micromonospora*.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como una medicina.
7. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la producción de un medicamento destinado a la inhibición de un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer pancreático, un cáncer de colon, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, una leucemia y un melanoma.
- 20 8. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1, aislado a partir de *Micromonospora* spp JS1035 depósito n° LMG P-12525, que tiene actividad contra un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer pancreático, un cáncer de colon, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, una leucemia y un melanoma.
9. Un compuesto como se ha definido en la reivindicación 8, en donde el compuesto tiene un peso molecular de 853 y una fórmula molecular de $C_{47}H_{67}NO_{13}$.
- 25 10. Un microorganismo, en donde dicho microorganismo ha sido depositado bajo el n° de depósito LMG P-12525.
11. Un microorganismo, en donde dicho microorganismo ha sido depositado bajo el n° de depósito LMG P-12526.

FIG 1A

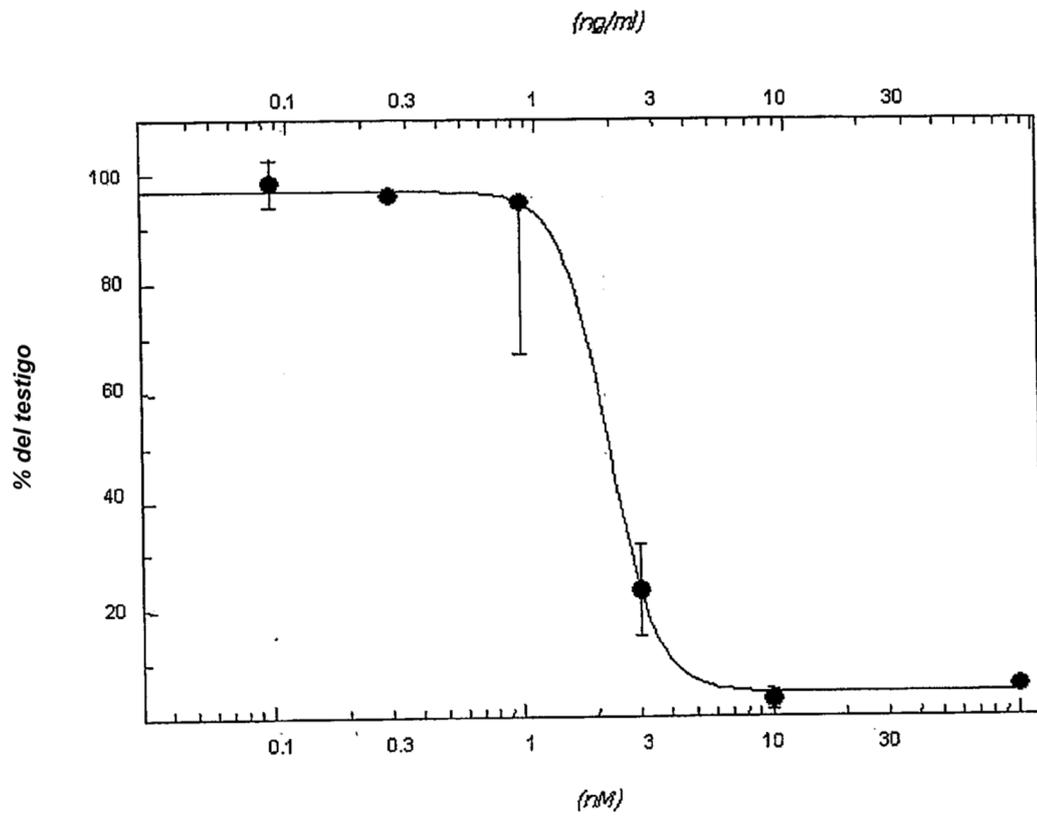


FIG 1B

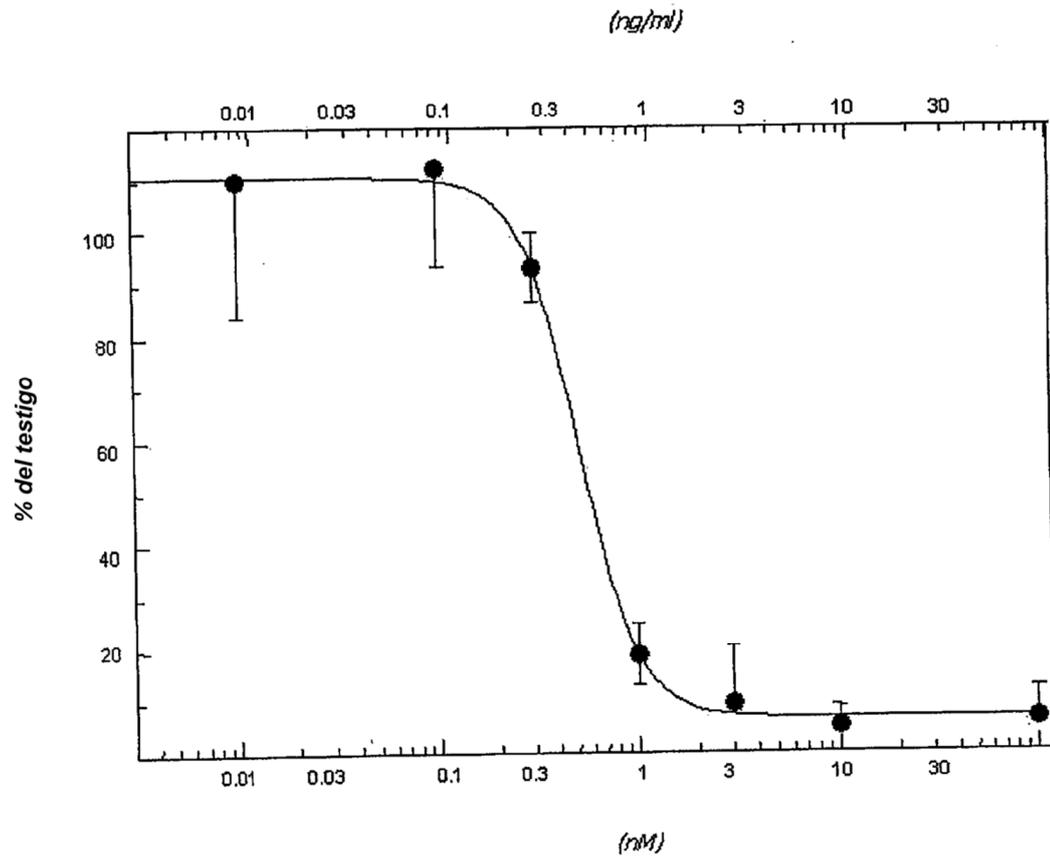


FIG 1C

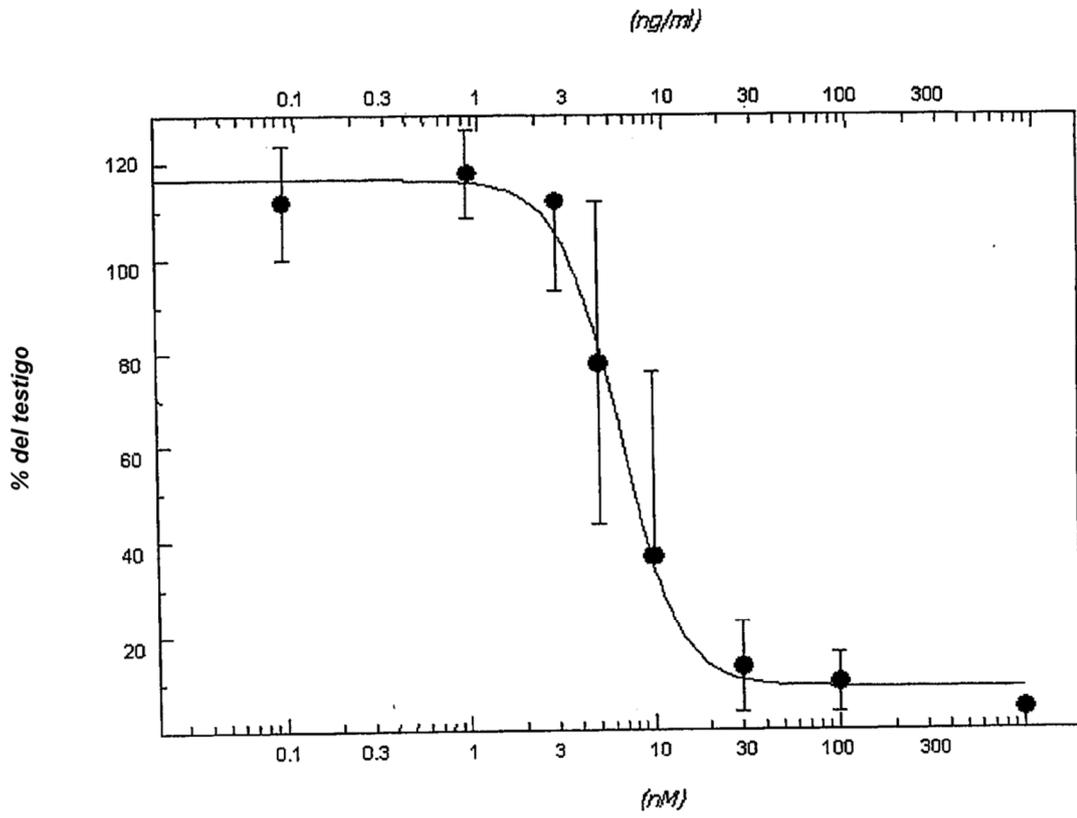


FIG 1D

