

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 803**

51 Int. Cl.:

C07D 405/14 (2006.01) **A61K 31/5377** (2006.01)
C07D 407/06 (2006.01) **A61K 31/551** (2006.01)
C07D 407/14 (2006.01) **A61K 31/496** (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01) **A61K 31/366** (2006.01)
C07D 487/08 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01)
A61K 31/4523 (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2003** **E 15157945 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016** **EP 2927228**

54 Título: **Nuevas sustancias fisiológicamente activas**

30 Prioridad:

29.05.2002 JP 2002155853
31.07.2002 JP 2002223355
10.03.2003 JP 2003063176

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2017

73 Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es:

KOTAKE, YOSHIHIKO;
NIIJIMA, JUN;
FUKUDA, YOSHIO;
NAGAI, MITSUO;
KANADA, MIKIE REGINA;
NAKASHIMA, TAKASHI;
YOSHIDA, MASASHI y
TSUCHIDA, TOSHIO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 603 803 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

Nuevas sustancias fisiológicamente activas

Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto macrólido anular de 12 miembros útil como un medicamento, a la preparación del mismo y al uso del mismo.

Antecedentes de la invención

Compuestos que tienen citotoxicidad se han usado como agentes antitumorales, y se han llevado a cabo muchos cribados que usan la citotoxicidad como un índice. Como resultado, la mayoría de los agentes antitumorales preexistentes afectan a las células cancerosas y simultáneamente a tejidos normales en los que es activa una proliferación de células, por ejemplo, a la médula ósea, el epitelio intestinal y similares. Así, todavía no se ha conseguido suficientemente la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

Además, aunque se puede esperar que los tratamientos mediante los agentes antitumorales sean bastante eficaces para la leucemia, no siempre se puede decir que sean eficaces para un cáncer sólido. Por lo tanto, se demanda intensamente proporcionar agentes antitumorales que sean eficaces para el cáncer sólido y muy seguros.

Se han llevado a cabo cribados para productos de fermentación de un microorganismo usando la citotoxicidad in vitro como un índice, esperando que se pudieran usar como agentes antitumorales. Se han encontrado muchos compuestos que tienen citotoxicidad, sin embargo, la mayoría de ellos muestran actividades citotóxicas solo in vitro, y pocos compuestos de estos muestran actividades antitumorales in vivo, y muy pocos compuestos exhiben eficacia para el cáncer sólido.

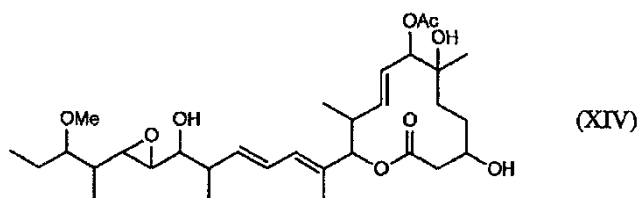
Divulgación de la invención

El objetivo de la presente invención es encontrar compuestos que muestren actividad antitumoral no solo in vitro sino también in vivo y tengan actividades antitumorales para el cáncer sólido a partir de productos de fermentación de un microorganismo o derivados de los mismos.

Se considera que la tumorigénesis de una célula normal está provocada por que se produce la mutación de un gen en la célula y se expresa un gen anormal. Según esto, los presentes inventores han realizado investigaciones intensivas basadas en la inferencia de que el crecimiento de una célula tumoral se puede suprimir al cambiar la expresión génica de la célula tumoral, a saber, el crecimiento de la célula tumoral se puede controlar al cambiar la expresión génica de un oncogén o un gen supresor de tumor, o al cambiar la expresión génica implicada en el ciclo celular. Los presentes inventores han considerado que un compuesto que cambie la expresión génica, en particular, un compuesto que suprima la producción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) en una condición hipóxica podría suprimir la angiogénesis por un tumor y tiene actividades antitumorales para cáncer sólido. A continuación, llevaron a cabo un rastreo para productos de fermentación de un microorganismo y derivados de los mismos usando la producción de VEGF mediante células U251 bajo estimulación hipóxica como un índice. Como resultados, los inventores han encontrado nuevos compuestos fisiológicamente activos, compuestos macrólidos anulares de 12 miembros, a saber 11107, y análogos de los mismos que suprimen la producción de VEGF con una condición hipóxica in vitro, y además suprimen el crecimiento de un tumor sólido in vivo.

Los presentes inventores han encontrado además que 11107D entre los 11107 análogos es estable incluso en solución acuosa, y que los compuestos obtenidos mediante modificaciones químicas de 11107D (posteriormente en la presente memoria, estos se denominan derivados de 11107D) heredan la propiedad de estabilidad en solución acuosa de 11107D e inhiben el crecimiento de células de tumores sólidos en experimentos in vivo en un grado mucho mayor. La presente invención se ha efectuado basándose en estos hallazgos.

Como una técnica relacionada de un compuesto macrólido anular de 12 miembros que es muy estructuralmente similar a los compuestos de la presente invención, se menciona un compuesto macrólido anular de 12 miembros FD-895 (documento JP-A 4-352783) representado por la fórmula (XIV):



La publicación divulga que FD-895 tiene actividades inhibitoras del crecimiento in vitro contra células de leucemia de ratón P388, células de leucemia de ratón L-1210 y células de leucemia humana HL-60 en medio RPM-1640 (columna 6, Tabla 2). Sin embargo, se ha presentado que FD-895 no mostraba actividades antitumorales en un experimento in vivo usando células de leucemia de ratón P388 (Seki-Asano M. y cols, J. Antibiotics, 47, 1395-1401, 1994).

Además, FD-895 es inestable en una solución acuosa según se describe posteriormente y se espera que sea inapropiado para mezclar con una solución en infusión durante la administración. Así, no se puede decir que FD-895 tenga suficientes cualidades como un agente antitumoral.

Esto es, la presente invención se refiere a:

(1) (8E,12E,14E)-7-((4-Cicloheptilpiperacina-1-il)carbonil)oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido;

(2) un medicamento que comprende el compuesto descrito en (1), una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un hidrato de ellos como un ingrediente activo;

(3) una composición farmacéutica que comprende el compuesto descrito en (1), una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un hidrato de ellos como un ingrediente activo;

(4) el medicamento descrito en (2), que es un agente terapéutico para tratar un cáncer sólido;

(5) el medicamento descrito en (4), en el que el cáncer sólido es cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de colon o melanoma;

(6) uso del compuesto descrito en (1), una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un hidrato de ellos, para la preparación de un medicamento para tratar cánceres sólidos;

(7) uso según (6), en el que el cáncer sólido es cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de colon o melanoma;

(8) el compuesto según (1), una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un hidrato de ellos para el uso en un método para tratar cánceres sólidos;

(9) el compuesto según (8), en el que el cáncer sólido es cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de colon o melanoma.

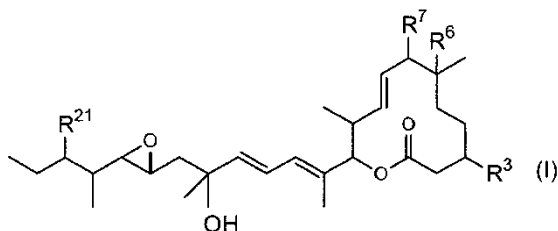
En la presente memoria descriptiva, la fórmula química del compuesto de la presente invención se ilustra como una fórmula química planimétrica por comodidad, pero el compuesto puede incluir ciertos isómeros extraídos de la fórmula química. La presente invención puede incluir todos los isómeros y mezclas de los isómeros tales como un isómero geométrico que se genera a partir de la configuración del compuesto, un isómero óptico basado en un carbono asimétrico, un rotámero, un estereoisómero y un tautómero. La presente invención no se limita a la descripción conveniente de la fórmula química, y puede incluir cualquiera de los isómeros o una mezcla de los mismos. Según esto, cuando el compuesto de la presente invención tiene un carbono asimétrico en la molécula, y existen su sustancia ópticamente activa y racemato, se incluye uno cualquiera. Además, cuando existen cristales polimórficos, la forma cristalina de la presente invención no se limita específicamente a una forma, y una cualquiera de las formas cristalinas puede ser individual o una mezcla de las formas cristalinas. El compuesto según la presente invención o una sal del mismo puede ser un anhidrato o un hidrato, y ambos se incluyen en la presente invención. El metabolito que se genera in vivo mediante la descomposición del compuesto según la presente invención y el profármaco del compuesto según la presente invención o una sal del mismo también se incluyen en la presente invención.

El compuesto de la presente invención se caracteriza estructuralmente por la cadena lateral en la posición 6 y/o la cadena lateral en la posición 7.

Posteriormente, se ilustrará la preparación del compuesto según la presente invención.

El compuesto de la presente invención se puede preparar al cultivar una cepa perteneciente al género *Streptomyces* que tiene una capacidad de producir la sustancia bioactiva 11107D [el compuesto de la fórmula (I), en la que R^3 , R^6 y R^{21} son grupos hidroxilo, y R^7 es un grupo acetoxi] bajo condiciones aeróbicas, recoger el compuesto de las

células y el cultivo del microorganismo, y modificar químicamente el compuesto obtenido como un compuesto clave según un procedimiento convencional.



5 Inicialmente, el procedimiento para la preparación de 11107D se elucidará posteriormente.

La siguiente cepa de microorganismo depositada se puede usar para que el microorganismo produzca 11107D. La cepa se depositó internacionalmente en International Patent Organism Depository (IPOD) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón). Específicamente, *Streptomyces* sp. Mer-11107 se depositó como FERM P-18144 en the National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology (1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón). Además, esta se transfirió a International Deposit FERM BP-7812 en International Patent Organism Depository (IPOD) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón).

La cepa para producir 11107D no está específicamente limitada y también incluye variantes de tales cepas, con tal de que la cepa pertenezca al género *Streptomyces* y tenga la capacidad de producir 11107D. Ejemplos de la cepa son *Streptomyces* sp. A-1532, *Streptomyces* sp. A-1533 y *Streptomyces* sp. A-1534, además de la cepa susodicha. Estas cepas también se depositaron internacionalmente en International Patent Organism Depository (IPOD) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) como FERM BP-7849, FERM BP-7850 y FERM BP-7851, respectivamente.

Se realizará posteriormente la descripción detallada de 1. la propiedad del microorganismo separado, 2. el método de fermentación del microorganismo y 3. el método de purificación de una sustancia activa en la preparación de 11107D.

1. La propiedad del microorganismo separado

Como la cepa para el uso en la presente invención, se espera que se pueda usar una cualquiera de las cepas pertenecientes al género *Streptomyces* y que tienen una capacidad para producir 11107D. Sin embargo, como una cepa típica usada en la presente invención, se ejemplifica una cepa que fue denominada "cepa Mer-11107" por los inventores. Las propiedades taxonómicas de esta cepa son como sigue.

(1) Características morfológicas

Hifas aéreas que forman espirales se extienden desde una hifa vegetativa en esta cepa. Una cadena de esporas que consiste en aproximadamente de 10 a 20 esporas columnares se forma en el borde de las hifas aéreas maduras. El tamaño de las esporas es aproximadamente $0,7 \times 1,0 \mu\text{m}$, la superficie de las esporas es lisa y no se observan órganos específicos tales como esporangio, esclerocio y flagelo.

(2) Características de cultivo sobre diversos medios

Las características de cultivo de la cepa después de la incubación a 28°C durante dos semanas sobre diversos medios se muestran posteriormente. El tono de color se describe mediante el nombre y los códigos de color que se muestran entre paréntesis del Color Harmony Manual (Container Corporation of America).

1) Medio en agar de extracto de levadura-extracto de malta

La cepa crecía bien, las hifas aéreas crecían sobre la superficie y se observaron esporas de color gris claro ("Light gray"; d). El reverso de la colonia era "Light melon yellow" (3ea). No se producía pigmento soluble.

2) Medio en agar de harina de avena

La cepa crecía en el nivel medio, las hifas aéreas crecían ligeramente sobre la superficie y se observaron esporas grises ("Gray"; g). El reverso de la colonia era "Nude tan" (4gc) o "Putty" (1 1/2ec). No se producía pigmento soluble.

3) Medio en agar de sal inorgánica-almidón

- 5 La cepa crecía bien, las hifas aéreas crecían sobre la superficie y se observaban esporas grises ("Gray"; e). El reverso de la colonia era "Fawn" (4ig) o "Gray" (g). No se producía pigmento soluble.

4) Medio en agar de glicerol-asparagina

La cepa crecía bien, las hifas aéreas crecían sobre la superficie y se observaban esporas blancas ("White"; a). El reverso de la colonia era "Pearl pink" (3ca). No se producía pigmento soluble.

- 10 5) Medio en agar de peptona-extracto de levadura-hierro

La cepa crecía mal y las hifas aéreas no crecían sobre la superficie. El reverso de la colonia era "Light melon yellow" (3ea). No se producía pigmento soluble.

6) Medio en agar de tirosina

- 15 La cepa crecía bien, las hifas aéreas crecían sobre la superficie y se observaban esporas blancas ("White"; a). El reverso de la colonia era "Pearl pink" (3ca). No se producía pigmento soluble.

(3) Utilización de diversas fuentes de carbono

Diversas fuentes de carbono se añaden en medio en agar de Pridham-Gottlieb, se muestra posteriormente el crecimiento de la cepa después de la incubación a 28°C durante dos semanas.

20	1) L-arabinosa	±
	2) D-xilosa	±
	3) D-glucosa	+
	4) D-fructosa	+
	5) sacarosa	+
	6) inositol	+
25	7) L-ramnosa	-
	8) D-manitol	+
	9) D-rafinosa	+

(+: positivo, ±: ligeramente positivo, -: negativo)

(4) Propiedades fisiológicas

- 30 Las propiedades fisiológicas de la cepa son como se muestran posteriormente.

(a) Intervalo de temperatura de crecimiento (medio en agar de extracto de levadura-extracto de malta, incubación durante 2 semanas) 12°C a 37°C

(b) Intervalo de temperatura óptima (medio en agar de extracto de levadura-extracto de malta, incubación durante 2 semanas) 21°C a 33°C

(c) Licuefacción de gelatina (medio en agar de glucosa-peptona-gelatina) negativa

(d) Coagulación de leche (medio en agar de leche desnatada) negativa

5 (e) Peptonización de leche (medio en agar de leche desnatada) negativa

(f) Hidrólisis de almidón (medio en agar de sal inorgánica-almidón) positiva

(g) Formación de pigmento melanoide (medio en agar de peptona-extracto de levadura-hierro) negativa

(medio de tirosina) negativa

(h) Producción de sulfuro de hidrógeno (medio en agar de peptona-extracto de levadura-hierro) negativa

10 (i) Reducción de nitrato (caldo que contiene 0,1% de nitrato potásico) negativa

(j) Tolerancia a cloruro sódico (medio en agar de extracto de levadura-extracto de malta, incubación durante 2 semanas) crecimiento con un contenido de sal de 4% o menos

(5) Quimiotaxonomía

Se detectaron ácido LL-diaminopimélico y glicina de la pared celular de la presente cepa.

15 Se considera que la presente cepa es una cepa del género *Streptomyces* a partir de las susodichas características microbianas. Según esto, los presentes inventores han denominado la presente cepa microbiana *Streptomyces* sp. Mer-11107 y han depositado la cepa como FERM P-18144 en the National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology.

20 2. Método de fermentación para producir el microorganismo

La sustancia fisiológicamente activa 11107D según la presente invención se puede producir al inocular la cepa sobre un medio de fuente de nutrición y llevar a cabo fermentación aeróbica. La cepa para producir la sustancia fisiológicamente activa 11107D no se limita a la susodicha cepa, y se puede usar en la presente invención cualquier cepa perteneciente al género *Streptomyces* y que tenga la capacidad de producir 11107D.

25 El método de fermentación del susodicho microorganismo es según el método de fermentación general del microorganismo, pero preferiblemente se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas tales como cultivo con agitación o fermentación con aireación-agitación usando medio líquido. El medio usado para el cultivo puede ser un medio que contiene una fuente de nutrición que puede ser utilizada por un microorganismo perteneciente al género *Streptomyces*, por lo tanto se puede utilizar la totalidad de diversos medios sintéticos, semisintéticos u orgánicos y similares. Como la fuente de carbono en la composición del medio, se puede usar uno solo o una combinación de glucosa, sacarosa, fructosa, glicerina, dextrina, almidón, melazas, aceite de soja y similares. Como la fuente de nitrógeno, se pueden usar una sola o una combinación de fuentes de nitrógeno orgánico tales como Pharma Media, peptona, extracto de carne, polvo de soja, caseína, un aminoácido, extracto de levadura y urea, y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como nitrato sódico y sulfato amónico. Adicionalmente, por ejemplo, se pueden añadir y usar sales tales como cloruro sódico, cloruro potásico, carbonato cálcico, sulfato magnésico, fosfato sódico, fosfato potásico y cloruro de cobalto; sales de metales pesados, vitaminas tales como vitamina B o biotina, si es necesario. Además, cuando la formación de espuma es notable durante el cultivo, se pueden añadir al medio apropiadamente diversos agentes antiespumantes, según sea necesario. Cuando se añade el agente antiespumante, se requiere fijarlo a una concentración que no afecte adversamente a la producción de una sustancia buscada y, por ejemplo, la concentración de uso es deseablemente 0,05% o menos.

45 La condición de cultivo se puede seleccionar apropiadamente dentro del intervalo en el que la cepa microbiana crece bien y puede producir la susodicha sustancia. Por ejemplo, el pH de un medio es aproximadamente 5 a 9, y preferiblemente cerca de neutro en general. La temperatura de fermentación se mantiene habitualmente a de 20°C a 40°C y preferiblemente de 28°C a 35°C. El período de fermentación es de aproximadamente 2 a 8 días, y habitualmente de aproximadamente 3 a 5 días. Las susodichas condiciones de fermentación se pueden cambiar adecuadamente según el tipo y la propiedad del microorganismo usado, las condiciones externas y similares, y es

innecesario decir que se puede seleccionar una condición óptima. La sustancia fisiológicamente activa 11107D de la presente invención que se acumulaba en el caldo de cultivo se puede recoger mediante procedimientos de separación habituales utilizando su propiedad, tales como un método de extracción con disolvente y un método de resina absorbente.

La sustancia fisiológicamente activa 11107D también se puede preparar, por ejemplo, al usar un microorganismo perteneciente al género *Streptomyces* (por ejemplo, la cepa de *Streptomyces* sp. AB-1704 (FERM P-18999)) y usar sustancia 11107B (el compuesto descrito en el Ejemplo A4 del documento WO 02/060890, según se muestra en los Ejemplos de referencia 6 a 10.

3. Método de purificación para la sustancia bioactiva

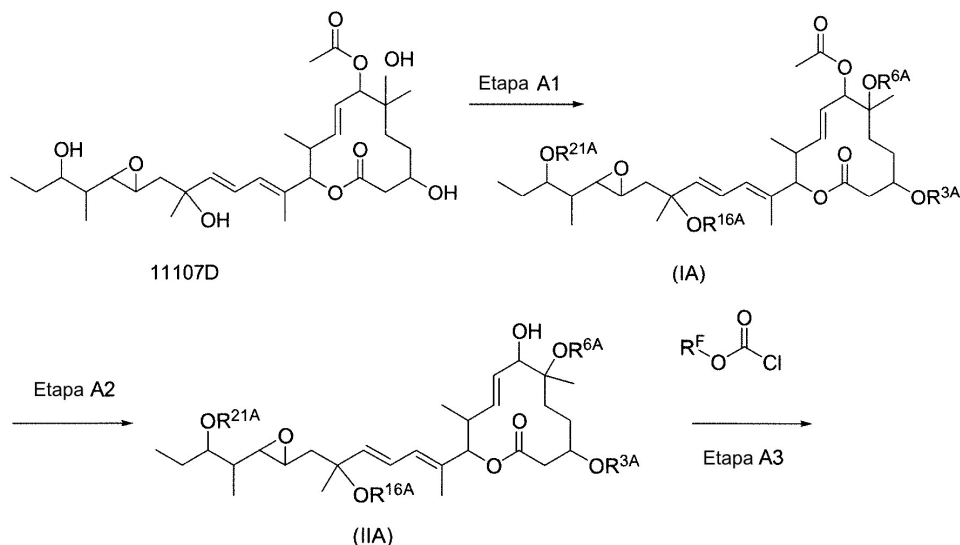
Métodos generales para la separación y la purificación que se usan para el aislamiento de metabolitos microbianos del caldo de cultivo se pueden emplear a fin de recoger 11107D del medio de cultivo después de la fermentación. Por ejemplo, pueden corresponder a todos los métodos tales como extracción mediante un disolvente orgánico, típicamente usando metanol, etanol, butanol, acetato de etilo o cloroformo; diversos tipos de cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de filtración en gel usando Sephadex LH-20; el tratamiento de adsorción y desorción mediante cromatografía de absorción, típicamente usando carbono activo o gel de sílice o mediante cromatografía en capa fina; o cromatografía de líquidos de alta resolución, típicamente usando una columna de fase inversa, para ésta. Además, los métodos de purificación para 11107D no se limitan específicamente a los métodos mostrados en la presente memoria.

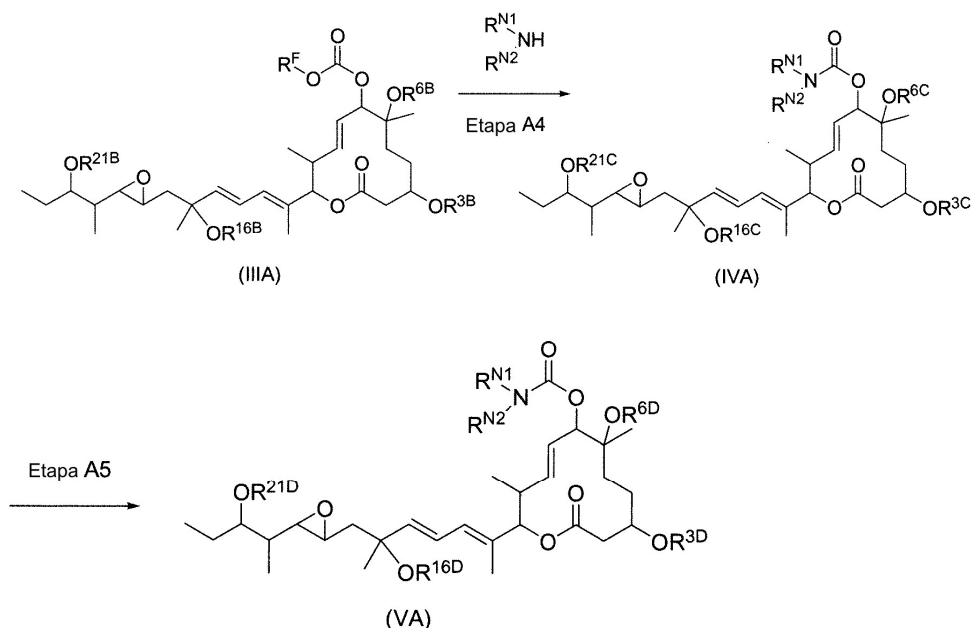
El compuesto 11107D se puede aislar y purificar al usar estos métodos solos o en combinación o usándolos repetidamente.

Posteriormente, se elucidará la preparación para el compuesto de la presente invención.

El compuesto de la presente invención se puede sintetizar a partir de 11107D aislado y purificado como un compuesto de partida según se describe en el ejemplo experimental posteriormente. La introducción y la retirada de un grupo protector para un grupo hidroxilo se puede llevar a cabo según se necesite mediante el método descrito en el documento (Protective Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene, John Wiley & Sons, Inc. 3ª Edición) o un método análogo al mismo, aunque dependiendo del tipo del grupo protector y la estabilidad del compuesto con relación a la preparación, El compuesto de la presente invención se puede preparar al usar las reacciones de introducción y retirada para el grupo protector de hidroxilo y la preparación descrita anteriormente en una combinación adecuada. Más específicamente, el compuesto de la presente invención se puede preparar al usar la preparación para un derivado de uretano.

Posteriormente, se elucidarán métodos sintéticos para preparar el compuesto de la presente invención.





- 5 En la fórmula, R^{3A}, R^{6A}, R^{16A} y R^{21A} representa cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo protector, con la condición de que R^{3A}, R^{6A}, R^{16A} y R^{21A} no representen simultáneamente átomos de hidrógeno; R^{3B}, R^{6B}, R^{16B} y R^{21B} representa cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo protector o un grupo representado por la fórmula R^FO-CO- (en la que R^F representa un grupo arilo C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido), con la condición de que R^{3B}, R^{6B}, R^{16B} y R^{21B} no representen simultáneamente átomos de hidrógeno; R^{3C}, R^{6C}, R^{16C} y R^{21C} representa cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo protector o un grupo representado por la fórmula R^{N1}R^{N2}N-CO- (en la que R^{N1} y R^{N2} representa cada uno el grupo que se define anteriormente); y R^{3D}, R^{6D}, R^{16D} y R^{21D} representa cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo representado por la fórmula R^{N1}R^{N2}N-CO- (en la que R^{N1} y R^{N2} representa cada uno el grupo que se define anteriormente).

- 15 La etapa A1 es una etapa para preparar el compuesto de la fórmula (IA). Esta etapa se lleva a cabo al proteger el grupo o los grupos hidroxilo de 11107D.

La reacción para proteger el grupo o los grupos hidroxilo se lleva a cabo según un procedimiento muy conocido en la química sintética orgánica, aunque seleccionándose dependiendo del tipo del grupo protector.

20 Ejemplos del grupo protector son 1-etoxietilo, tetrahidropirano, 1-metil-1-metoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropirano, 4-metoxitetrahidrotiopirano, S,S-dióxido de 4-metoxitetrahidrotiopirano, metoximetilo, metiltiomietilo, metoxietoximetilo, tricloroetoximetilo, trimetilsilietilo, trimetilsilietoximetilo, terc-butildimetilsililo, trietilsililo, dietilisopropilsililo, trimetilsililo, triisopropilsililo, metil-di-terc-butilsililo, difenilmetsililo, bencilo, p-metoxibencilo, p-metilbencilo, p-nitrobencilo y trifenilmetilo. Todos o parte de los grupos hidroxilo pueden estar apropiadamente protegidos por estos grupos protectores.

Por ejemplo, derivados protegidos en el hidroxilo protegidos mediante 1-etoxietilo, tetrahidropirano, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropirano, 4-metoxitetrahidrotiopirano o S,S-dióxido de 4-metoxitetrahidrotiopirano se pueden sintetizar al tratar 11107D con un éter vinílico correspondiente tal como etilvinil-éter o dihidropirano en presencia de un ácido. Ejemplos del ácido son ácidos generales incluyendo ácidos orgánicos tales como p-toluenosulfonato de piridinio (PPTS), ácido p-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético o ácido metanosulfónico; y sales inorgánicas tales como cloruro de hidrógeno, ácido nítrico, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. Entre ellos, un ejemplo preferido es el p-toluenosulfonato de piridinio (PPTS), ácido p-toluenosulfónico o ácido canforsulfónico. El disolvente usado en la reacción no está específicamente limitado, pero es deseable un disolvente inerte que no pueda reaccionar fácilmente con una materia prima. Ejemplos de tales disolventes son éteres tales como tetrahidrofurano, éter dietílico, éter diisopropílico, dioxano y dimetoxietano; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono y 1,2-dicloroetano; hidrocarburos tales como hexano, benceno y tolueno; cetonas tales como acetona y metil-etil-cetona; nitrilos tales como acetonitrilo; amidas tales como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metil-2-piridona y hexametilfosforamida; y sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido, de los que un ejemplo preferido es diclorometano, cloroformo o tetrahidrofurano. El tiempo de reacción es 10 minutos a 5 días y es preferiblemente 1 día a 2 días. La temperatura de reacción es una temperatura de -78°C hasta el calentamiento bajo reflujo y es preferiblemente temperatura ambiente. Las cantidades del éter vinílico y el ácido usadas en la reacción son de 1 a 200 equivalentes y de 0,05 a 2 equivalentes, y preferiblemente de 30 a 50 equivalentes y de 0,1 a 0,3 equivalentes, respectivamente, con respecto a 11107D.

Ejemplos de otros grupos protectores son metoximetilo, metiltiommetilo, metoxietoximetilo, tricloroetoximetilo, trimetilsililetilo, trimetilsililetoximetilo, terc-butildimetilsililo, trietilsililo, trimetilsililo, dietilisopropilsililo, triisopropilsililo, di-terc-butilmethylsililo, difenilmethylsililo, bencilo, p-metoxibencilo, p-metilbencilo, p-nitrobencilo, p-clorobencilo y trifenilmethyl. Tales derivados protegidos en el hidroxilo se pueden sintetizar al hacer reaccionar una materia prima con un cloruro, bromuro o trifluorometanosulfonato de los grupos protectores respectivos en presencia de una base. La base es una base orgánica o base inorgánica general. Ejemplos de la base orgánica son una base aromática tal como imidazol, 4-(N,N-dimetilamino)piridina (la 4-dimetilaminopiridina, N,N-dimetilaminopiridina y dimetilaminopiridina usada en la presente memoria descriptiva tiene el mismo significado), piridina, 2,6-lutidina o colidina; una amina terciaria tal como N-metilpiperidina, N-metilpirrolidina, trietilamina, trimetilamina, diisopropiletilamina, ciclohexildimetilamina, N-metilmorfolina o 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno; una amina secundaria tal como diisobutilamina o diciclohexilamina; un alquil-litio tal como metil-litio o butil-litio; un alcóxido metálico tal como metóxido sódico o etóxido sódico. Ejemplos de la base inorgánica son un hidróxido de metal alcalino tal como hidruro sódico o hidruro potásico; un hidróxido de metal alcalinotérreo tal como hidruro cálcico; un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido sódico o hidróxido potásico; un carbonato de metal alcalino tal como carbonato sódico, carbonato potásico o carbonato de cesio; y un hidrogenocarbonato de metal alcalino tal como bicarbonato sódico. Ejemplos preferidos de la base para la protección del grupo hidroxilo por un grupo protector sililo son una base aromática tal como imidazol o 4-dimetilaminopiridina; y una amina terciaria tal como trietilamina. El disolvente usado en la reacción no está específicamente limitado, pero es deseable uno que no reaccione fácilmente con una materia prima. Ejemplos de tales disolventes son los susodichos disolventes inertes, de los que un ejemplo preferido es tetrahidrofurano, diclorometano o N,N-dimetilformamida. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 3 días y es preferiblemente de 1 día a 2 días. La temperatura de reacción es una temperatura de -78°C hasta calentamiento bajo reflujo y es preferiblemente de -10°C a 50°C. Las cantidades del cloruro, el bromuro o el trifluorometanosulfato y la base usadas en la reacción son de 1 a 20 equivalentes y de 0,5 a 30 equivalentes, preferiblemente de 1 a 15 equivalentes y de 0,5 a 20 equivalentes, respectivamente, con respecto a 11107D.

Los grupos hidroxilo de 11107D se pueden proteger selectivamente al seleccionar el reactivo y la equivalencia del mismo para el uso en la protección de los grupos hidroxilo. Por ejemplo, un compuesto en el que los grupos hidroxilo en la posición 3 y la posición 21 están protegidos selectivamente se puede obtener al llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente usando clorotrietilsilano, trietilamina y 4-dimetilaminopiridina en diclorometano o usando terc-butilclorodimetilsilano e imidazol en N,N-dimetilformamida. En este procedimiento, por ejemplo, el grupo hidroxilo en la posición 3 se puede proteger selectivamente al controlar la equivalencia de clorotrietilsilano o terc-butilclorodimetilsilano. Además, es posible que dos o tres de los cuatro grupos hidroxilo estén protegidos por un grupo sililo, y a continuación los otros dos o el otro grupo hidroxilo se protege mediante el susodicho etoxietilo o similares.

La etapa A2 es una etapa para preparar el compuesto de la fórmula (IIA). Esta etapa se lleva a cabo al convertir el grupo acetoxi del compuesto de la fórmula (IA) en el grupo hidroxilo mediante el tratamiento de una base en un disolvente inerte.

Ejemplos de la base usada en la presente memoria son bases inorgánicas incluyendo un hidruro de metal alcalino tal como hidruro sódico o hidruro potásico; un hidruro de metal alcalinotérreo tal como hidruro cálcico; un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido de litio, hidróxido sódico o hidróxido potásico; un carbonato de metal alcalino tal como carbonato de litio, carbonato sódico o carbonato potásico; un hidrogenocarbonato de metal alcalino tal como bicarbonato sódico; y un alcóxido metálico tal como metóxido de litio, metóxido sódico, etóxido sódico o terc-butóxido potásico, así como bases tales como guanidina o amoníaco. Ejemplos preferidos de la base son carbonato potásico y guanidina.

Ejemplos del disolvente inerte usado en la presente memoria incluyen, además de los susodichos disolventes inertes, un disolvente alcohólico tal como metanol, etanol, isopropanol o terc-butanol, y agua. Estos disolventes se pueden usar en combinación como una mezcla. Un disolvente preferido es un disolvente alcohólico o una mezcla de un alcohol y un disolvente halogenado. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 5 días y es preferiblemente de 30 minutos a 1 día. La temperatura de reacción es una temperatura de -78°C hasta calentamiento bajo reflujo y es preferiblemente temperatura ambiente. La cantidad de la base usada en la reacción es de 1 a 10 equivalentes y preferiblemente de 2 a 5 equivalentes con respecto al compuesto de la fórmula (IA).

La etapa A3 es una etapa para preparar el compuesto de la fórmula (IIIA). Esta etapa se lleva a cabo al tratar el grupo hidroxilo del compuesto de la fórmula (IIA) con un derivado de cloroformiato o carbonildiimidazol en presencia de una base. Ejemplos del derivado de cloroformiato son cloroformiato de 4-nitrofenilo, cloroformiato de fenilo, cloroformiato de 4-clorofenilo, cloroformiato de 4-bromofenilo y cloroformiato de 2,4-dinitrofenilo. Ejemplos de la base son las susodichas bases orgánicas y bases inorgánicas, de las que, por ejemplo, se usa preferiblemente diisopropiletilamina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, piridina, 2,6-lutidina o hidruro sódico. El disolvente usado en la reacción no está específicamente limitado, pero es deseable un disolvente que no reaccione fácilmente con una materia prima. Ejemplos de tales disolventes son los susodichos disolventes inertes, de los cuales, por ejemplo, se usa preferiblemente tetrahidrofurano, diclorometano o N,N-dimetilformamida. Las cantidades del derivado de cloroformiato y la base para el uso en la reacción son de 1 a 10 equivalentes y de 1 a 20 equivalentes, y

preferiblemente de 1 a 5 equivalentes y de 1 a 10 equivalentes, respectivamente, con respecto al compuesto de la fórmula (IIA). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 30 horas y es preferiblemente de 1 a 4 horas. La temperatura de reacción es una temperatura de -78°C hasta calentamiento bajo reflujo y es preferiblemente de -10°C a 50°C.

Para el compuesto hidroxilado (IA) en el que no se han protegido de uno a tres de OR^{3A}, OR^{6A}, OR^{16A} y OR^{21A} en la etapa A1, los grupos hidroxilo se pueden convertir en grupos éster carbónico mediante la etapa A3. Más específicamente, los grupos hidroxilo del compuesto (IA) distintos al grupo hidroxilo en la posición 7 se pueden convertir en grupos éster carbónico del mismo modo que el grupo hidroxilo en la posición 7 mediante tratamiento con una base y un derivado de cloroformiato en equivalentes correspondientes al número de grupos hidroxilo que se van a convertir en grupos éster carbónico.

La etapa A4 es una etapa para preparar el compuesto de la fórmula (IVA). Esta etapa se lleva a cabo al tratar el éster carbónico de la fórmula (IIIA) con una amina (R^{N1}R^{N2}H) que puede formar un compuesto deseado de la fórmula (I) o (I-d) en un disolvente inerte en presencia de una base o con la amina sola.

Ejemplos de la amina usada en la presente memoria son metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, octilamina, decilamina, ciclopropilamina, ciclopentilamina, ciclohexilamina, dimetilamina, dietilamina, etilmetilamina, etilendiamina, 1,3-propanodiamina, 1,4-butanodiamina, N,N-dimetiletiletilendiamina, N,N-dimetil-1,3-propanodiamina, N,N-dimetil-1,4-butanodiamina, N,N-dietiletiletilendiamina, N,N-dietil-1,3-propanodiamina, N,N-dietil-1,4-butanodiamina, N,N,N'-trimetiletiletilendiamina, N,N,N'-trimetil-1,3-propanodiamina, N,N,N'-trimetil-1,4-butanodiamina, N-etil-N',N'-dimetiletiletilendiamina, N-etil-N',N'-dimetil-1,3-propanodiamina, N-etil-N',N'-dimetil-1,4-butanodiamina, N,N,N'-trietiletiletilendiamina, N,N,N'-trietil-1,3-propanodiamina, N,N,N'-trietil-1,4-butanodiamina, N,N-dietil-N'-metiletiletilendiamina, N,N-dietil-N'-metil-1,3-propanodiamina, N,N-dietil-N'-metil-1,4-butanodiamina, N,N'-dimetil-N-feniletiletilendiamina, N,N'-dimetil-N-fenil-1,3-propanodiamina, N-bencil-N,N'-dimetiletiletilendiamina, N-bencil-N,N'-dimetil-1,3-propanodiamina, morfolina, tiomorfolina, S-óxido de tiomorfolina, S,S-dióxido de tiomorfolina, pirrolidina, piperidina, piperacina, homopiperacina, 4-hidroxipiperidina, 4-metoxipiperidina, 1-metilpiperacina, 1-etilpiperacina, 1-propilpiperacina, 1-butilpiperacina, 1-isopropilpiperacina, 1-ciclobutilpiperacina, 1-ciclopentilpiperacina, 1-ciclohexilpiperacina, 1-cicloheptilpiperacina, 1-ciclooctilpiperacina, 1-(ciclopropilmetil)piperacina, 1-bencilpiperacina, 1-metilhomopiperacina, 1-etilhomopiperacina, 1-(2-aminoetil)pirrolidina, 1-(2-(N-metilamino)etil)pirrolidina, 1-(3-aminopropil)pirrolidina, 1-(3-(N-metilamino)propil)pirrolidina, 1-(2-aminoetil)piperidina, 1-(2-(N-metilamino)etil)piperidina, 1-(3-aminopropil)piperidina, 1-(3-(N-metilamino)propil)piperidina, 4-(2-aminoetil)morfolina, 4-(2-(metilamino)etil)morfolina, 4-(3-aminopropil)morfolina, 4-(3-(N-metilamino)propil)morfolina, 1-(2-aminoetil)-4-metilpiperacina, 1-(3-aminopropil)-4-metilpiperacina, 1-(3-(N-metilamino)propil)-4-metilpiperacina, 1-amino-4-metilpiperidina, 1-metilamino-4-metilpiperidina, 1-etil-4-(N-metilamino)piperidina, 1-metilamino-4-propilpiperidina, 1-butil-4-(N-metilamino)piperidina, 1-(N,N-dimetilamino)piperidina, 1-(N,N-dietilamino)piperidina, 4-(pirrolidin-1-il)piperidina, 4-(piperidin-1-il)piperidina, 3-aminoquinuclidina, 3-(N-metilamino)quinuclidina, anilina, N-metilnilina, N,N-dimetil-p-fenilendiamina, N,N-dimetil-m-fenilendiamina, N,N,N'-trimetil-p-fenilendiamina, N,N,N'-trimetil-m-fenilendiamina, 1-naftilamina, 2-naftilamina, bencilamina, N-metilbencilamina, fenetilamina, N-metilfenetilamina, 2-picolilamina, 3-picolilamina, 4-picolilamina, N-metil-2-picolilamina, N-metil-3-picolilamina, N-metil-4-picolilamina, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, 2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano y 1,4-diazabicyclo[4.3.0]nonano.

Ejemplos de la base son las susodichas bases orgánicas y bases inorgánicas, de las que, por ejemplo, se usa preferiblemente diisopropiletilamina, dimetilaminopiridina, trietilamina, piridina, 2,6-lutidina o hidruro sódico. El disolvente usado en la reacción no está específicamente limitado, pero es deseable un disolvente que no reaccione fácilmente con una materia prima. Ejemplos de tales disolventes son los susodichos disolventes inertes, de los que, por ejemplo, se usa preferiblemente tetrahidrofurano, diclorometano o N,N-dimetilformamida. Las cantidades de la amina y la base usadas en la reacción son de 1 a 10 equivalentes y de 2 a 20 equivalentes, y preferiblemente de 1,5 a 5 equivalentes y de 2 a 10 equivalentes, respectivamente, con respecto al compuesto de la fórmula (IIIA). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 30 horas y es preferiblemente de 1 a 2 horas. La temperatura de reacción es una temperatura de -78°C hasta el calentamiento bajo reflujo y es preferiblemente de -10°C a 50°C.

El compuesto de la fórmula (IVA) también se puede preparar al tratar el compuesto de la fórmula (IIA) con un isocianato en un disolvente inerte en presencia de una base y/o cloruro cuproso. El isocianato no está específicamente limitado e incluye, por ejemplo, isocianato de etilo, isocianato de metilo e isocianato de fenilo. Ejemplos de la base son las susodichas bases orgánicas y bases inorgánicas, de las cuales, por ejemplo, se usa preferiblemente diisopropiletilamina, dimetilaminopiridina, trietilamina, piridina, 2,6-lutidina o hidruro sódico. El disolvente usado en la reacción no está específicamente limitado, pero es deseable un disolvente que no reaccione fácilmente con una materia prima. Ejemplos de tales disolventes son los susodichos disolventes inertes, de los cuales, por ejemplo, se usa preferiblemente tetrahidrofurano, diclorometano o N,N-dimetilformamida. Las cantidades de la base y el isocianato usadas en la reacción son de 3 a 100 equivalentes y de 1 a 20 equivalentes, preferiblemente de 5 a 20 equivalentes y de 3 a 10 equivalentes, respectivamente, con respecto al compuesto de la fórmula (IIIA). En caso de que se use cloruro cuproso, la cantidad del mismo es de 1 a 10 equivalentes y preferiblemente de 2 a 6 equivalentes. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 30 horas y es preferiblemente de 1 a 2 horas. La temperatura de reacción es una temperatura de -78°C hasta el calentamiento bajo reflujo y es preferiblemente de -10°C a 50°C.

El compuesto hidroxilado en el que no se han protegido de uno a tres de OR^{3A} , OR^{6A} , OR^{16A} y OR^{21A} en la etapa A1 se puede convertir en un derivado que tiene una pluralidad de estructuras de uretano al convertir esos grupos hidroxilo en grupos éster carbónico en la etapa A3 y convertirlos además en grupos carbamoiloxi en la etapa A4.

La etapa A5 es una etapa para producir el compuesto de la fórmula (VA). Esta etapa se lleva a cabo al someter el derivado de uretano de la fórmula (IVA) a un tratamiento de desprotección mencionado posteriormente en un disolvente inerte. La reacción de desprotección para los susodichos ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos varía dependiendo del tipo del grupo protector pero se lleva a cabo mediante un método muy conocido en la química sintética orgánica.

Para el respectivo grupo hidroxilo protegido mediante, por ejemplo, 1-etoxietilo, tetrahidropiraniilo, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropiraniilo, 4-metoxitetrahidrotiopiraniilo o S,S-dióxido de 4-metoxitetrahidrotiopiraniilo, la reacción de desprotección se puede llevar a cabo fácilmente mediante tratamiento con un ácido en un disolvente inerte. Ejemplos del ácido son los susodichos ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos, de los cuales, por ejemplo, se prefiere p-toluenosulfonato de piridinio, ácido p-toluenosulfónico o ácido canforsulfónico. El disolvente usado en la reacción no está específicamente limitado, pero es deseable un disolvente que no reaccione fácilmente con una materia prima. Ejemplos preferidos del mismo son un disolvente alcohólico tal como metanol, etanol, isopropanol o terc-butanol, o una mezcla del alcohol y el susodicho disolvente inerte. La cantidad del ácido usada en la reacción es de 0,5 a 5 equivalentes y es preferiblemente de 1 a 3 equivalentes con respecto al compuesto de la fórmula (IVA). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 10 días y es preferiblemente de 1 día a 4 días. La temperatura de reacción es una temperatura de -78°C hasta el calentamiento bajo reflujo y es preferiblemente de -10°C a 50°C .

Cuando el grupo hidroxilo está protegido por el otro grupo protector tal como terc-butildimetilsililo, trietilsililo, dietilisopropilsililo, trimetilsililo, triisopropilsililo, di-terc-butilmethylsililo o difenilmethylsililo, se puede desproteger mediante el tratamiento de un anión fluoruro o un ácido. Ejemplos del anión fluoruro son fluoruro de tetrabutylamonio, fluoruro de hidrógeno, fluoruro potásico y fluoruro de hidrógeno-piridina. Ejemplos del ácido son los susodichos ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos, de los que un ejemplo preferido es ácido acético, ácido fórmico, ácido trifluoroacético, p-toluenosulfonato de piridinio o ácido canforsulfónico. El disolvente usado en la reacción no está específicamente limitado, pero es deseable un disolvente que no reaccione fácilmente con una materia prima. Ejemplos del mismo son los susodichos disolventes inertes, de los cuales, por ejemplo, se usa preferiblemente tetrahidrofurano, éter dietílico o agua. Las cantidades del anión fluoruro y el ácido usadas en la reacción son de 1 a 5 equivalentes y de 0,5 a 5 equivalentes, preferiblemente de 1 a 4 equivalentes y de 0,5 a 3 equivalentes, respectivamente, con respecto al compuesto de la fórmula (IVA). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 30 horas y es preferiblemente de 1 a 2 horas. La temperatura de reacción es una temperatura de -78°C hasta el calentamiento bajo reflujo y es preferiblemente de -10°C a 50°C .

Mediante una combinación de los diversos métodos de protección para grupos hidroxilo descritos en la etapa A1 y los diversos métodos de desprotección descritos en la etapa A5, los respectivos grupos hidroxilo en la posición 3, la posición 6 y la posición 21 se pueden convertir en derivados de uretano selectivamente. Por ejemplo, un derivado de uretano que tiene un grupo hidroxilo en la posición 6 se puede sintetizar al someter al grupo hidroxilo en la posición 6 del compuesto (IA) en el que R^{3A} , R^{16A} y R^{21A} son grupos trietilsililo a la etapa A3, la etapa A4 y la etapa A5 secuencialmente.

La modificación selectiva del grupo hidroxilo en la posición 3, la posición 6 o la posición 21 que se lleva a cabo mediante una combinación de los procedimientos de protección y desprotección también se puede aplicar a los otros métodos de modificación.

Después de la finalización de la reacción, el producto buscado en la reacción respectiva se aísla de una mezcla de reacción según un procedimiento convencional. Por ejemplo, el compuesto buscado se puede obtener mediante filtración, si está presente materia insoluble, y evaporación del disolvente, o al diluir la mezcla de reacción con un disolvente orgánico tal como acetato de etilo, lavar la capa orgánica con agua, secar sobre sulfato magnésico anhidro y evaporar el disolvente. El compuesto se puede purificar adicionalmente mediante un procedimiento convencional tal como cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o cromatografía de líquidos de alto rendimiento según requiera el caso.

Para ilustrar la utilidad de la presente invención específicamente, se determinaron la actividad supresora de la transcripción de VEGF, la actividad inhibidora del crecimiento sobre células de cáncer de colon humano WiDr, la actividad inhibidora del crecimiento sobre cáncer sólido, la pérdida de peso corporal (toxicidad aguda) y la estabilidad en una solución acuosa del compuesto de la presente invención.

Ejemplo de prueba 1 Construcción de un sistema indicador para cribar un compuesto que suprime la transcripción de VEGF

A fin de preparar un sistema indicador que refleja la transcripción del promotor de VEGF, la secuencia del promotor de VEGF se clonó y se insertó en vector de fosfatasa alcalina (PLAP) secretor para construir el vector indicador.

5 A fin de obtener la región promotora de VEGF humano, ADN genómico de VEGF se clonó de una biblioteca de fagos. Cebadores de PCR que tenían las secuencias descritas en los Números de Secuencia 1 y 2 se diseñaron basándose en ADNc de VEGF (número de registro del GenBank: X62568) y se obtuvo un fragmento que tenía aproximadamente 340 pb llevando a cabo PCR. Una biblioteca de fagos genómica humana (Human genomic library, Clontech Co.) se cribó usando esto como una sonda para obtener ADN genómico de VEGF. El ADN se digirió mediante EcoRI, y los fragmentos resultantes se insertaron en el sitio EcoRI de pUC18. Finalmente, se obtuvo
10 pUC18-VEGFA que contenía aproximadamente 5,4 kb de región de flanco 5' de VEGF. El pUC18-VEGFA se digirió mediante KpnI/NheI, la región promotora de VEGF de aproximadamente 2,3 kb obtenida se insertó en el sitio de multiclonación KpnI/NheI del vector de fosfatasa alcalina (PLAP) secretor (Goto y cols., Mol. Pharmacol., 49, 860-873, 1996), y así, se construyó el vector VEGF-PLAP.

15 El susodicho vector VEGF-PLAP se transfectó en las células U251 cultivadas en el medio de Eagle modificado de DULBECCO (DMEM; fabricado por SIGMA Co., Ltd.) que contiene 10% de suero de ternero fetal, y las células se cultivaron en presencia de 1 mg/ml de G418 (Merck Co.) para establecer un clon estable resistente a G418 (células U251/1-8).

20 Se confirmó que las células U251/1-8 secretaban PLAP bajo condición hipóxica (incubadora de O₂ al 2%) de la misma manera que en el informe (Cell. Mol. Biol. Res. 40, 35-39, 1994) y era un sistema indicador que reflejaba la transcripción desde el promotor de VEGF. El cribado del compuesto que suprime la producción de VEGF que se inducía por estimulación hipóxica se llevó a cabo posteriormente usando el clon.

25 Ejemplo de prueba 2 Actividades supresoras de la transcripción de VEGF de diversos análogos y derivados de 11107

30 A fin de eliminar la influencia de fosfatasas alcalinas en suero, células U251/1-8 se enjuagaron dos veces con la cantidad adecuada de PBS (solución salina tamponada con fosfato), se diluyeron en el medio DMEM que contenía 10% de suero en el que la fosfatasa alcalina se inactivó mediante el tratamiento de 65°C durante 20 min., y se distribuyeron en placas de 96 pocillos en 4×10^4 células/180 µl.

35 Después de cultivar a 37°C durante la noche en una incubadora de CO₂ (CO₂ al 5%), se añadieron 20 µl de la susodicha solución de incubación que contenía el compuesto de prueba diluido con una sucesión triple, y a continuación se incubaron en una incubadora hipóxica (CO₂ al 2%) durante 18 horas. Con respecto a la actividad de PLAP en los sobrenadantes de cultivo, se añadieron 10 µl de los sobrenadantes a 50 µl de solución tamponadora de Na₂CO₃-NaHCO₃ 0,28 M (pH 10,0, MgSO₄ 8,0 mM) y finalmente se añadieron 50 µl de sustrato de fosfatasa alcalina (LUMISTEIN, Genomescience Co.). Después de reaccionar durante una hora, la actividad de fosfatasa alcalina de la PLAP se midió al detectar la luminiscencia química mediante un lector de microplacas (Perkin-Elmer Co.). La
40 actividad de PLAP bajo normoxia se fijó como 0%, la actividad de PLAP de la célula que se trataba bajo hipoxia se fijó como 100%, y la concentración que suprimía la actividad de PLAP en 50% se fijó como el valor de IC₅₀ de PLAP. Se midió que el valor de IC₅₀ del compuesto de la presente invención era 1,9 nM. El compuesto de la presente invención mostraba una fuerte actividad supresora de la transcripción de VEGF.

Ejemplo de prueba 3 Actividades inhibitoras del crecimiento sobre células de cáncer de colon humano WiDr

45 Células de cáncer de colon humano WiDr cultivadas en medio de Eagle modificado de DULBECCO (DMEM; fabricado por SIGMA Co., Ltd.) que contenía 10% de suero de ternero fetal, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) se distribuyeron en placas de 96 pocillos en 2×10^3 células/pocillo. Después de cultivar durante la noche en una incubadora de CO₂, se añadieron 20 µl de la susodicha solución de incubación que contenía el compuesto de prueba diluido con una sucesión triple, seguido por incubación. Después de tres días, se
50 añadieron 50 µl de solución de 3,3 mg/ml de MTT, seguido por cultivar durante una hora más. A continuación, el formazano formado mediante la reducción por la acción de células vivas se extrajo con 100 µl de DMSO, se determinó la absorbancia (A540/A660) y se fijó como el índice del número de células vivas.

55 Se determinaron las concentraciones del compuesto de la presente invención a la que el crecimiento de las células de cáncer de colon humano WiDr se inhibía 50%. El valor de IC₅₀ del compuesto de la presente invención era 0,7 nM. El compuesto de la presente invención mostraba fuertes actividades inhibitoras del crecimiento sobre células de cáncer de colon humano WiDr.

Ejemplo de prueba 4 Actividades inhibitoras del crecimiento de tumores sólidos

A fin de estudiar la actividades inhibitoras de tumores sólidos del compuesto de la presente invención in vivo, células de cáncer de colon humano WiDr se implantaron subcutáneamente en los costados de ratones atímicos. Se trasplantaron a los lados corporales subcutáneos de los ratones. Los animales se agruparon de modo que el promedio de los volúmenes de los grupos respectivos se hiciera uniforme, cuando alcanzaba aproximadamente 100 mm³. Un grupo de control estaba constituido por 10 ratones y los grupos con administración de 11107D estaban constituido por 5 ratones. Los derivados se administraron para los grupos con administración durante 5 días consecutivos mediante inyección intravenosa a fin de que fuera cualquiera de 0,625 mg, 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg y 10 mg/kg/día, y un vehículo se administró al grupo de control. Se midieron los volúmenes de tumor el Día 15, y se determinaron las relaciones de volúmenes de tumor relativos (T/C%) fijando el volumen del tumor del grupo de control como 100%. La T/C% del compuesto de la presente invención era 20 con una dosis de 5,0 mg/kg. Se midieron los pesos corporales el Día 1, el Día 5, el Día 8, el Día 12 y el Día 15 (o 16), y las variaciones relativas de peso corporal se determinaron fijando el peso corporal el Día 1 como 100%. Las relaciones de pesos corporales relativos en el día en el que el peso corporal alcanzaba el mínimo se definieron como las relaciones de pesos relativos mínimas y se muestran en la tabla posterior.

Dosis (mg/kg)	Actividades inhibitoras del crecimiento en el modelo de tumor sólido humano WiDr (T/C%)	las relaciones de pesos relativos mínimas
5,0	20	0,90

El compuesto de la presente invención mostraba actividades inhibitoras del crecimiento en el modelo de tumor de colon humano WiDr incluso en una dosis sin pérdida de peso notable también in vivo.

Ejemplo de prueba 5 Estabilidad en una solución acuosa

El compuesto de la presente invención se disolvió en DMSO en concentraciones de 10 a 20 mM, y estas se diluyeron aproximadamente 500 veces con solución tamponadora de Britton-Robinson de pH 7. Cada una de las soluciones como soluciones de muestra se incubó a 25°C durante 24 horas.

Las soluciones de muestra se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento antes y después de la incubación, y las relaciones residuales de las sustancias probadas en las soluciones de muestra se determinaron a partir de las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos.

Ejemplo	Área del pico (mAU x s)		Las relaciones residuales (%)
	inicial	después de 24 horas	
11107D	3994	3817	95,6
Compuesto reivindicado	5291	5024	95,0

Los resultados muestran que después de 24 horas el contenido del compuesto de la presente invención seguía siendo 95%, indicando que es estable en una solución acuosa.

Como es evidente a partir de los Ejemplos de prueba farmacológicos anteriores, el compuesto de la presente invención suprime especialmente la producción de VEGF al variar la expresión génica y se espera que se use como un agente antitumoral, en particular, como un agente de tratamiento para un cáncer sólido, un supresor de metástasis de carcinomas, así como un agente para tratar la retinopatía diabética, la artritis reumatoide y el anginoma. Además, como es evidente a partir de la prueba de toxicidad del Ejemplo de prueba 4, el compuesto de la presente invención muestra buenas actividades inhibitoras del crecimiento en el modelo de tumor de colon humano WiDr en tal dosis de modo que no provoca una pérdida de peso notable de los ratones probados y es un compuesto seguro. Según esto, es eficaz como un agente para prevenir o tratar una enfermedad contra la que es eficaz el control de la expresión génica, una enfermedad contra la que es eficaz una actividad supresora de la producción de VEGF y una enfermedad contra la que es eficaz una actividad inhibitora de la angiogénesis. La "prevención o el tratamiento" indica bien prevenir o bien tratar, o ambos. Más específicamente, el compuesto de la presente invención es eficaz como un agente antitumoral y en particular como un agente antitumoral y un supresor de metástasis de carcinomas para un cáncer sólido. Como el cáncer sólido, por ejemplo, se pueden proponer cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, tumor cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de útero, cáncer del cuello uterino, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de tiroides, cáncer testicular, carcinoma coriónico, osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos y cáncer ovárico, de los que se prefiere un cáncer tal como cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello o cáncer ovárico. Además, también es eficaz como un agente antitumoral para la leucemia. Además, también es eficaz como un agente para tratar un

hematoma. Por otra parte, también es eficaz como un agente para tratar la retinopatía diabética, la artritis reumatoide y los hematomas, lo que se basa en la acción supresora de la producción de VEGF. Además, también es eficaz como un agente para tratar enfermedades inflamatorias que consisten en osteoartritis, psoriasis y reacción de hipersensibilidad prolongada, y aterosclerosis.

5 Cuando el compuesto se prepara como una inyección, se añaden al fármaco principal un regulador del pH, un tampón, un estabilizante, un solubilizante y similares, si es necesario, para preparar una inyección subcutánea, intramuscular, intraarticular o intravenosa según un procedimiento convencional.

10 Cuando el compuesto se administra como un agente preventivo o terapéutico para diversas enfermedades, se puede administrar oralmente como comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, jarabes y similares, y se puede administrar parenteralmente como un aerosol, un supositorio, una inyección, una preparación externa o un gotero. La dosis varía notablemente según la gravedad del síntoma, la edad, el tipo de enfermedad hepática, etc., y de aproximadamente 1 mg a 100 mg al día para un adulto se administran en general en una o varias veces.

15 Se usan excipientes convencionales en la producción de productos farmacéuticos, y los productos farmacéuticos se preparan mediante un método convencional. A saber, cuando se prepara una formulación sólida para uso oral, se añade una carga al fármaco principal y, si es necesario, se añade a esto un aglutinante, un desintegrante, un lubricante, un colorante, un agente saborizante y similares, y a continuación se preparan comprimidos, comprimidos revestidos, gránulos, polvos, cápsulas y similares. No es necesario decir que se puede efectuar un revestimiento con azúcar, un revestimiento con gelatina o un revestimiento adecuado sobre el comprimido y el gránulo, si es necesario.

20 Según la presente invención, el compuesto de la presente invención suprime, en particular, la producción de VEGF al variar la expresión génica y muestra excelentes actividades antitumorales en modelos de tumores sólidos in vivo. Además, el compuesto de la presente invención es estable en una solución acuosa y puede proporcionar, por ejemplo, un agente para tratar el cáncer, en particular, un agente para tratar un cáncer sólido, un supresor de metástasis de carcinomas, un agente para tratar la retinopatía diabética, la artritis reumatoide y el angioma.

30 Ejemplos

La presente invención se ilustrará con más detalle posteriormente.

Los símbolos usados en las fórmulas estructurales químicas en los Ejemplos se ilustrarán posteriormente.

DEIPS: grupo dietilisopropilsililo

35 Et: grupo etilo

EE: grupo 1-etoxietilo

Me: grupo metilo

TES: grupo trietilsililo

Ejemplo 1 Fermentación de la cepa Mer-11107 y purificación de 11107D

40 Un asa del cultivo inclinado (ISP-2) de cepa Mer-11107 se inoculó en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml que contenía 50 ml de medio de siembra (2% de glicerina, 2% de glucosa, 2% de harina de soja (ESUSAN-MEAT fabricada por Ajinomoto Co. Ltd.), 0,5% de extracto de levadura, 0,25% de cloruro sódico, 0,32% de carbonato cálcico, 0,0005% de sulfato de cobre, 0,0005% de cloruro de manganeso, 0,0005% de sulfato de cinc, pH 7,4), y se cultivó a 28°C durante tres días en un agitador para dar el primer cultivo de siembra. El cultivo de siembra (0,6 ml) se inoculó en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml que contenía 60 ml del medio de producción (5% de almidón soluble, 0,5% de licor de maceración de maíz, 0,5% de levadura seca, 0,5% de harina de gluten, 0,1% de carbonato cálcico) y se fermentó a 28°C durante cuatro días en un agitador giratorio para dar un caldo de cultivo de fermentación.

50 El caldo de cultivo (10 l) se extrajo con 1-butanol (10 l), a continuación, la capa de butanol así adquirida se evaporó hasta sequedad para dar 100 g de fracción activa en bruto. La fracción activa en bruto se aplicó sobre Sephadex LH-20 (1.500 ml; fabricada por Pharmacia Co. Ltd.), y se eluyó con tetrahidrofurano-metanol (1:1) como un disolvente. Una fracción eluida de 540 ml a 660 ml se concentró hasta sequedad, para dar un residuo (660 mg). El residuo resultante se disolvió en una mezcla de acetato de etilo y metanol (9:1; v/v) y se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (WAKO GEL C-200, 50 g). La columna se eluyó con una mezcla (2 l) que consistía en n-hexano y acetato de etilo (1:9, v/v), las fracciones eluidas de 1.440 ml a 1.566 ml se recogieron, se evaporaron para dar 15 mg de una fracción activa en bruto.

- 5 La fracción activa en bruto obtenida se sometió a cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) preparativa bajo la siguiente condición de HPLC preparativa (A), y las fracciones eluidas en el tiempo de retención de 17 minutos se recogieron. Después de retirar el acetonitrilo, las fracciones respectivas se desalaron mediante HPLC bajo la siguiente condición de HPLC preparativa (B) para dar 11107D (Tiempo de retención: 36 minutos, 1,8 mg).

Condiciones de HPLC preparativa A:

Columna: YMC-PACK ODS-AM F20 mm × 250 mm (fabricada por YMC Co.)

Caudal: 10 ml/min.

Detección: 240 nm

- 10 Eluyente: acetonitrilo/dihidrogenofosfato potásico acuoso al 0,15% (pH 3,5) (de 2:8 a 8:2, v/v, de 0 a 50 min., gradiente lineal)

Condiciones de HPLC preparativa B:

Columna: YMC-PACK ODS-AM F20 mm × 250 mm (fabricada por YMC Co.)

Caudal: 10 ml/min.

- 15 Detección: 240 nm

Eluyente: metanol/agua (de 2:8 a 10:0, v/v, de 0 a 40 min., gradiente lineal)

Ejemplo 2 Propiedades fisicoquímicas de 11107D

Las propiedades fisicoquímicas de 11107D se muestran posteriormente. La estructura de 11107D se determinó según se muestra posteriormente.

- 20 1. Apariencia: polvo incoloro

2. Peso molecular: 552, ESI-MS m/z 551 (M-H)⁻, 575 (M+Na)⁺

3. Fórmula molecular: C₃₀H₄₈O₉

4. Solubilidad: soluble en dimetilsulfóxido, piridina, metanol y acetona, y ligeramente soluble en agua

5. Reacción cromática: positiva para yodo y ácido sulfúrico

- 25 6. Espectro de absorción ultravioleta (metanol, valer máximo) nm: 239 (ε 33100)

7. Espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm⁻¹: 3417, 2967, 1732, 1714, 1455, 1372, 1248, 1176

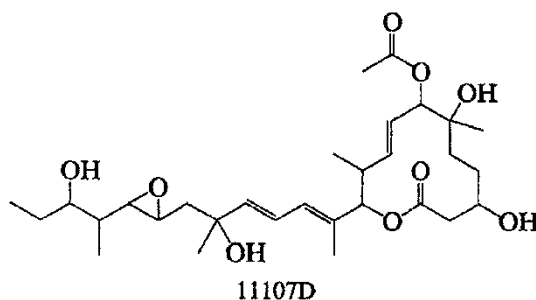
8. Espectro de ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) : δ ppm (integral, multiplicidad, constante de acoplamiento J (Hz)):

0,93 (3H, d, J=7,0Hz), 0,95 (3H, d, J=6,8Hz), 0,98 (3H, t, J=8,0Hz),

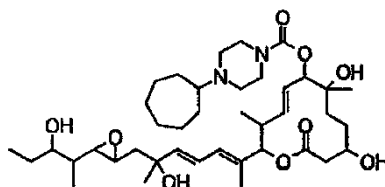
- 30 1,23 (3H, s), 1,30 (1H, m), 1,36-1,66 (9H, m), 1,70 (1H, dd, J=6,4, 14,2Hz), 1,82 (3H, d, J=1,0Hz), 1,90 (1H, dd, J=6,4, 14,2Hz), 2,10 (3H, s), 2,52 (2H, m), 2,62 (1H, m), 2,72 (1H, dd, J=2,4, 8,3Hz), 2,94 (1H, dt, J=2,4, 5,7Hz), 3,55 (1H, dt, J=8,3, 4,4Hz), 3,82 (1H, m), 5,10 (1H, d, J=9,8Hz), 5,11 (1H, d, J=10,8Hz), 5,60 (1H, dd, J=9,8, 15,2Hz), 5,74 (1H, dd, J=8,3, 15,2 Hz), 5,92 (1H, d, J=15,2Hz), 6,18 (1H, d, J=10,8Hz), 6,57 (1H, dd, J=10,8, 15,2Hz)

9. Espectro de ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) : δ ppm (multiplicidad): 10,52 (q), 10,82 (q), 11,98 (q), 16,84 (q), 21,07 (q), 24,21 (q), 28,62 (t), 28,79 (q), 30,46 (t), 37,53 (t), 40,10 (t), 41,80 (d), 42,58 (d), 45,97 (t), 55,99 (d), 62,53 (d),

70,42 (d), 73,09 (s), 74,11 (s), 75,30 (d), 80,31 (d), 84,19 (d), 123,64 (d), 127,10 (d), 131,76 (d), 133,81 (s), 141,61 (d), 143,22 (d), 171,75 (s), 172,18 (s)

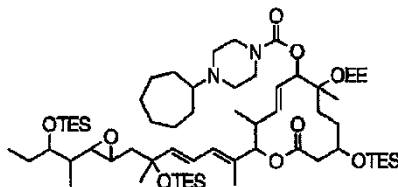


5 Ejemplo 3 (8E,12E,14E)-7-((4-Cicloheptilpiperacin-1-il)carbonil)oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido



Primera etapa

(8E,12E,14E)-7-((4-Cicloheptilpiperacin-1-il)carbonil)oxi-6-(1-etoxietoxi)-6,10,12,16,20-pentametil-3,16,21-tris(trietilsiloxi)-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido (Compuesto 45-1)



10

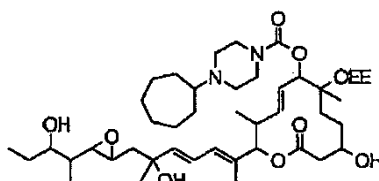
Se añadieron secuencialmente gota a gota 1-cicloheptilpiperacina (462 mg, 2,51 mmol) y trietilamina (513 mg, 5,02 mmol) a una solución del Compuesto 46-4 (8E,12E,14E)-6-(1-etoxietoxi)-6,10,12,16,20-pentametil-7-(4-nitrophenoxi)carboxi-3,16,21-tris(trietilsiloxi)-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido (1,368 g, 1,254 mmol) obtenido en la cuarta etapa del Ejemplo 46 en tetrahidrofurano (20 ml). A continuación, se añadió a esto tetrahidrofurano (8 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa de bicarbonato sódico y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Kanto silica gel 60N, 40 - 50 µm; acetato de etilo-hexano, 1:9 a 1:4 a 1:3) para dar el compuesto del epígrafe (1,455 g, 99%) como un aceite incoloro.

15

20

Segunda etapa

(8E,12E,14E)-7-((4-Cicloheptilpiperacin-1-il)carbonil)oxi-6-(1-etoxietoxi)-3,16,21-trihidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido (Compuesto 45-2)



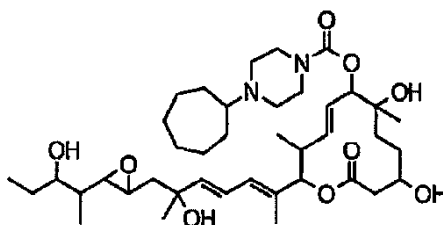
25

Una solución de Compuesto 45-1 (8E,12E,14E)-7-((4-cicloheptilpiperacina-1-il)carbonil)oxi-6-(1-etoxietoxi)-6,10,12,16,20-pentametil-3,16,21-tris(trietilsiloxi)-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido (1,454 g, 1,254 mmol) obtenido en la primera etapa en tetrahidrofurano (30 ml) se enfrió hasta 5°C, se añadió gota a gota a esto fluoruro de tetrabutilamonio (solución en tetrahidrofurano 1,0 M, 4,5 ml, 4,5 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió adicionalmente gota a gota fluoruro de tetrabutilamonio (solución en tetrahidrofurano 1,0 M, 0,52 ml, 0,52 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa de bicarbonato sódico y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Fuji Silysia, NH Silica gel, malla 200 - 350; acetato de etilo-hexano, 1:1 a 4:1 a 9:1 a 1:0) para dar el compuesto del epígrafe (965 mg, 97%) como un aceite incoloro.

ESI-MS m/z 791 (M+H)⁺

Tercera etapa

(8E,12E,14E)-7-((4-Cicloheptilpiperacina-1-il)carbonil)oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido (Compuesto 45)



Se añadió p-toluenosulfonato de piridinio (459 mg, 1,827 mmol) a una solución de Compuesto 45-2 (8E,12E,14E)-7-((4-cicloheptilpiperacina-1-il)carbonil)oxi-6-(1-etoxietoxi)-3,16,21-trihidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido (964 mg, 1,218 mmol) obtenido en la segunda etapa en una mezcla de tetrahidrofurano:2-metil-2-propanol=1:1 (22 ml) y la mezcla de reacción se removió a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa de bicarbonato sódico y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Fuji Silysia, NH Silica gel, malla 200 a 350; acetato de etilo-hexano-metanol, 2:1:0 a 4:1:0 a 99:0:1 a 98:0:1 a 97:0:1) y la fracción en bruto se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gel de sílice Kanto 60N, 40 - 50 µm; metanol-diclorometano, 1:29 a 1:19 a 1:17 a 1:14 a 1:9) para dar el compuesto del epígrafe (866 mg, 99%) como un aceite incoloro.

Espectro de ¹H-NMR (CD₃OD, 400MHz) δ (ppm): 0,89 (3H, d, J=6,8Hz), 0,90 (3H, d, J=6,8Hz), 0,94 (3H, t, J=7,2Hz), 1,10-1,77 (24H, m), 1,77 (3H, s an), 1,79-1,90 (3H, m), 2,42-2,74 (9H, m), 2,85-2,92 (1H, m), 3,36-3,70 (5H, m), 3,72-3,84 (1H, m), 4,92 (1H, d, J=10,0Hz), 5,06 (1H, d, J=10,8Hz), 5,57 (1H, dd, J=9,6, 15,2Hz), 5,71 (1H, dd, J=10,0, 15,2Hz), 5,87 (1H, d, J=15,2Hz), 6,13 (1H, d, J=11,2Hz), 6,52 (1H, dd, J=11,2, 15,2Hz); ESI-MS m/z 719 (M+H)⁺.

Ejemplos de formulación

Ejemplos de formulación del compuesto de la presente invención se ilustrarán posteriormente, pero la formulación del compuesto de la presente invención no se limita a estos Ejemplos de formulación.

Ejemplo de formulación 1

Compuesto of Ejemplo 3	0,6 (partes)
Tensioactivo no iónico	2,4
Solución isotónica de cloruro sódico	97

se calentaron, se mezclaron y se cargaron en una ampolla, la ampolla se esterilizó para producir una inyección.

Ejemplo de referencia 2

- Un asa del cultivo inclinado [0,5% de almidón soluble, 0,5% de glucosa, 0,1% de extracto de carne de pescado (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,1% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.), 0,2% de NZ-case (fabricado por Humko Sheffield Chemical Co.), 0,2% de cloruro sódico, 0,1% de carbonato cálcico y 1,6% de agar (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)] de la cepa de *Streptomyces* sp. AB-1704 (FERM P-18999) aislada del suelo se inoculó en un tubo de ensayo de 65 ml que contenía 7 ml de un medio de siembra [2,0% de almidón soluble, 1,0% de glucosa, 0,5% de polipeptona (fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) y 0,1% de carbonato cálcico] y se cultivó a 28°C durante tres días en una incubadora agitada para dar un cultivo de siembra.
- Además, 0,5 ml del cultivo de siembra se inocularon en un tubo de ensayo de 65 ml que contenía 7 ml de un medio de producción [2,0% de almidón soluble, 1,0% de glucosa, 0,5% de polipeptona (fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) y 0,1% de carbonato cálcico] y se cultivó a 28°C durante tres días en una incubadora agitada.
- Posteriormente, se preparó una solución de 25 mg/ml de la sustancia 11107B de sustrato (el compuesto del Ejemplo A4 del documento WO 02/060890) en etanol y se añadieron 0,2 ml de la solución al cultivo. Después de la adición, se agitó a 28°C durante 48 horas para llevar a cabo la reacción de conversión.
- Después de la reacción, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC bajo la siguiente condición de HPLC analítica (a) para verificar que se formaba la sustancia 11107D en la mezcla de reacción.

Condición de HPLC analítica (a)

Columna: CAPCELL PAK C18 SG120 ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm (fabricada por SHISEIDO Co.)

Temperatura: 40°C

Caudal: 1 ml/min.

- Detección: 240 nm

Eluyente: acetonitrilo/dihidrogenofosfato potásico al 0,15% (pH 3,5) (3:7 a 5:5, v/v, 0 a 18 minutos, gradiente lineal), acetonitrilo/dihidrogenofosfato potásico al 0,15% (pH 3,5) (5:5 a 85:15, v/v, 18 a 22 minutos, gradiente lineal)

Tiempo de retención: sustancia 11107D 9,9 min., sustancia 11107B 19,4 min.

Ejemplo de referencia 3

- Un asa del cultivo inclinado (medio en agar de levadura-malta) de la cepa A-1545 (FERM P-18944) aislada del suelo se inoculó en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml que contenía 20 ml de un medio de siembra [2,4% de almidón soluble, 0,1% de glucosa, 0,5% de harina de soja (ESUSAN-MEAT fabricada por Ajinomoto Co., Ltd.), 0,3% de extracto de ternero (fabricado por Difco), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Difco), 0,5% de tripton-peptona (fabricado por Difco) y 0,4% de carbonato cálcico] y se cultivó a 28°C durante tres días en una incubadora agitada para dar un cultivo de siembra.
- Además, 0,6 ml del cultivo de siembra se inocularon en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml que contenía 60 ml de un medio de producción [2% de almidón soluble, 2% de glucosa, 2% de harina de soja (ESUSAN-MEAT fabricada por Ajinomoto Co., Ltd.), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.), 0,25% de cloruro sódico, 0,32% de carbonato cálcico, 0,0005% de sulfato de cobre, 0,0005% de cloruro de manganeso, 0,0005% de sulfato de cinc, pH 7,4 antes de la esterilización] y se cultivó a 28°C durante cuatro días en una incubadora agitada. Cada 2 ml del cultivo resultante se distribuyeron en tubos de ensayo de 15 ml. Posteriormente, se preparó una solución de 20 mg/ml de la sustancia 11107B de sustrato en dimetilsulfóxido y se añadieron 0,05 ml de la solución. Después de la adición, se agitó a 28°C durante 23 horas para llevar a cabo la conversión. Después de la reacción, la mezcla de reacción se analizó mediante HPLC bajo la siguiente condición de HPLC analítica (b) para verificar que se formaba la sustancia 11107D en la mezcla de reacción.

Condición de HPLC analítica (b)

Columna: CAPCELL PAK C18 SG120 ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm (fabricada por SHISEIDO Co.)

Temperatura: 40°C

Caudal: 1 ml/min.

Detección: 240 nm

Eluyente: acetonitrilo/agua (50:50, v/v) isocrático

Tiempo de retención: sustancia 11107B 7,2 min., sustancia 11107D 3,6 min.

5 Ejemplo de referencia 4

Un asa del cultivo inclinado [0,5% de almidón soluble, 0,5% de glucosa, 0,1% de extracto de carne de pescado (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,1% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.), 0,2% de NZ-case (fabricado por Humko Sheffield Chemical Co.), 0,2% de cloruro sódico, 0,1% de carbonato cálcico y 1,6% de agar (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)] de cepa de *Streptomyces* sp. AB-1704 (FERM P-18999) aislada del suelo se inoculó en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml de un medio de siembra [2,0% de almidón soluble, 1,0% de glucosa, 0,5% de polipeptona (fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) y 0,1% de carbonato cálcico] y se cultivó a 28°C durante tres días en una incubadora agitada para dar un cultivo de siembra. Además, cada 2 ml del cultivo de siembra se inocularon en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml (150 matraces) que contenía cada uno 100 ml de un medio de producción [2,0% de almidón soluble, 1,0% de glucosa, 0,5% de polipeptona (fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.) y 0,1% de carbonato cálcico] y se cultivó a 28°C durante dos días en una incubadora agitada.

Se preparó una solución de 20 mg/ml de la sustancia 11107B de sustrato en etanol, y cada 0,44 ml de la solución se añadieron al cultivo (100 ml/matraz de Erlenmeyer de 500 ml, 150 matraces). Después de la adición, se agitó a 28°C durante 9 horas para llevar a cabo la conversión. Después de la finalización de la reacción, los cultivos se recogieron y se separaron en el sobrenadante de cultivo y la torta micelar mediante centrifugación a 2.700 rpm durante 10 minutos. La torta micelar se extrajo con 5 l de metanol y se filtró para dar el extracto de metanol. Este extracto de metanol se evaporó para retirar el metanol, se combinó con el sobrenadante de cultivo y se extrajo con 10 l de acetato de etilo. La solución de acetato de etilo resultante se evaporó para dar 2.090 mg de una fracción activa en bruto. La fracción activa en bruto se disolvió en 4 ml de una mezcla de tetrahidrofurano-metanol (1:1, v/v) y 6 ml de una solución acuosa al 50% de acetonitrilo, se sometió a cromatografía en columna ODS (fabricada por YMC Co., ODS-AM 120-S50 ϕ 3,6 cm x 43 cm) y se eluyó con una solución acuosa al 40% de acetonitrilo. Una fracción eluida de 336 ml a 408 ml se concentró hasta sequedad bajo presión reducida para dar 560 mg de un residuo. Además, el residuo se disolvió en 10 ml de una solución acuosa al 50% de metanol, se sometió a cromatografía en columna ODS (fabricada por YMC Co., ODS-AM 120-S50 ϕ 3,6 cm x 40 cm) y se eluyó con una solución acuosa al 50% de metanol. Una fracción eluida de 1.344 ml a 1.824 ml se concentró hasta sequedad bajo presión reducida para dar 252 mg de sustancia 11107D.

Ejemplo de referencia 5

Un asa del cultivo inclinado (medio de levadura-malta-agar) de la cepa A-1544 (FERM P-18943) se inoculó en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml que contenía 25 ml de un medio de siembra [2% de almidón soluble, 2% de glucosa, 2% de harina de soja (ESUSAN-MEAT fabricada por Ajinomoto Co., Ltd.), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Difco), 0,25% de cloruro sódico y 0,32% de carbonato cálcico, pH 7,4 antes de la esterilización] y se cultivó a 28°C durante dos días en una incubadora agitada para dar un cultivo de siembra. Cada 0,75 ml del cultivo se distribuyeron en tubos para suero de 2 ml (fabricados por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) y se añadió una cantidad igual de una solución acuosa al 40% de glicerol. Después de remover, se congeló a -70°C para dar un cultivo de siembra congelado. El cultivo de siembra congelado se fundió, se inocularon 0,25 ml del mismo en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml que contenía 25 ml de un medio de siembra [2% de almidón soluble, 2% de glucosa, 2% de harina de soja (ESUSAN-MEAT fabricada por Ajinomoto Co., Ltd.), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.), 0,25% de cloruro sódico y 0,32% de carbonato cálcico, pH 7,4 antes de la esterilización] y se cultivó a 28°C durante dos días en una incubadora agitada para dar un cultivo de siembra. Además, el cultivo de siembra (0,5 ml) se inoculó en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml de medio de producción [2% de almidón soluble, 2% de glucosa, 2% de harina de soja (ESUSAN-MEAT fabricada por Ajinomoto Co., Ltd.), 0,5% de extracto de levadura (fabricado por Oriental Yeast Co., Ltd.), 0,25% de cloruro sódico y 0,32% de carbonato cálcico, pH 7,4 antes de la esterilización] y se cultivó a 28°C durante tres días en una incubadora agitada.

Cada uno de los cultivos resultantes (100 ml/matraz de Erlenmeyer de 500 ml, 10 matraces) se sometió a centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos para recoger las células, y las células se suspendieron en 100 ml de una solución tamponadora de fosfato 50 mM (pH 6,0). Posteriormente, se preparó una solución de 100 mg/ml de la sustancia 11107B de sustrato en dimetilsulfóxido, y se añadieron cada uno de 0,5 ml de la solución. Después de la adición, se agitó a 28°C durante 24 horas para llevar a cabo la conversión. Después de la finalización de la reacción,

las mezclas de reacción se recogieron y se separaron en el sobrenadante y la torta micelar mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se extrajo con 1 l de acetato de etilo. La torta micelar se extrajo con 500 ml de metanol y a continuación se filtró para dar un extracto de metanol. El extracto de metanol se evaporó para retirar el metanol y se extrajo con 1 l de acetato de etilo. Cada una de las capas de acetato de etilo se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico anhidro y las capas combinadas se evaporaron para dar 937 mg de una fracción activa en bruto. La fracción activa en bruto se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (Kiesel gel 60, 50 g) y se eluyó con 1.200 ml de una mezcla de acetato de etilo y n-hexano (90:10; v/v) para dar 234 mg de una fracción activa. La fracción activa resultante se sometió a cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) preparativa bajo las siguiente condición de HPLC preparativa (C), y el eluato resultante se analizó mediante HPLC bajo la siguiente condición de HPLC analítica (c). El disolvente se retiró de la fracción que contenía la sustancia 11107D así obtenida, para dar 80 mg de la sustancia 11107D.

Condición de HPLC preparativa (C)

Columna: CAPCELL PAK C18 UG120 ϕ 30 x 250 mm (fabricada por SHISEIDO Co.)

Caudal: 20 ml/min.

15 Detección: 240 nm

Eluyente: acetonitrilo/agua (30:70, v/v) isocrático

Condición de HPLC analítica (c)

Columna: CAPCELL PAK C18 SG120 ϕ 4.6 mm x 250 mm (fabricada por SHISEIDO Co.)

Temperatura: 40°C

20 Caudal: 1 ml/min.

Detección: 240 nm

Eluyente: acetonitrilo/agua (35:65, v/v) isocrático

Tiempo de retención: sustancia 11107D 7,8 min.

Ejemplo de referencia 6

25 Cada uno de los cultivos de la cepa A-1545 (FERM P-18944) (100 ml/matraz de Erlenmeyer de 500 ml, 10 matraces) obtenidos mediante un método similar al descrito para el Ejemplo de referencia 9 se sometió a centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos para recoger las células, y las células se suspendieron en 100 ml de una solución tamponadora de fosfato 50 mM (pH 6,0). Posteriormente, se preparó una solución de 100 mg/ml del sustrato 11107B en dimetilsulfóxido, y se añadió cada 1 ml de la solución. Después de la adición, se agitó a 28°C durante 24 horas para llevar a cabo la conversión. Después de la finalización de la reacción, las mezclas de reacción se recogieron y se separaron en el sobrenadante y la torta micelar mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se extrajo con 1 l de acetato de etilo. La torta micelar se extrajo con 500 ml de acetona y a continuación se filtró para dar un extracto de acetona. El extracto de acetona se evaporó para retirar la acetona y se extrajo con 1 l de acetato de etilo. Cada una de las capas de acetato de etilo se lavó con agua, se secó y se deshidrató sobre sulfato sódico anhidro y las capas combinadas se evaporaron para dar 945 mg de una fracción activa en bruto. La fracción activa en bruto se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (Kiesel gel 60, 50 g), se eluyó con 100 ml de una mezcla de acetato de etilo y n-hexano (50:50; v/v), 200 ml de una mezcla de acetato de etilo y n-hexano (75:25; v/v) y 600 ml de una mezcla de acetato de etilo y n-hexano (90:10; v/v), para dar 463 mg de una fracción activa. La fracción activa obtenida se sometió a cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) preparativa bajo la condición de HPLC preparativa (C) descrita en el Ejemplo 4, el eluato resultante se analizó mediante HPLC bajo la condición de HPLC analítica descrita en el Ejemplo 4. El disolvente se retiró de la fracción que contenía la sustancia 11107D así obtenida, para dar 304 mg de sustancia 11107D.

REIVINDICACIONES

1. (8E,12E,14E)-7-((4-Cicloheptilpiperacín-1-il)carbonil)oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido.
- 5 2. Un medicamento que comprende el compuesto según la reivindicación 1, una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un hidrato de ellos como un ingrediente activo.
3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 1, una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un hidrato de ellos como un ingrediente activo.
- 10 4. El medicamento según la reivindicación 2, que es un agente terapéutico para tratar un cáncer sólido.
5. El medicamento según la reivindicación 4, en el que el cáncer sólido es cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de colon o melanoma.
- 15 6. Uso del compuesto según la reivindicación 1, una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un hidrato de ellos, para la preparación de un medicamento para tratar cánceres sólidos.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el cáncer sólido es cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de colon o melanoma.
- 20 8. El compuesto según la reivindicación 1, una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un hidrato de ellos para el uso en un método para tratar cánceres sólidos.
- 25 9. El compuesto para el uso según la reivindicación 8, en el que el cáncer sólido es cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de colon o melanoma.