

Señora

Alix Carmenza Céspedes de Vergel

Jefe de División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**No. 03-011545- -00009-0000**Fecha: 2009-06-04 16:42:17 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 18

Referencia: Expediente No. 03.011.545

Solicitud de Patente de Invención titulada: "polimorfos de un análogo de
epotilona"

Solicitante: Bristol-Myers Squibb Company

RESPUESTA AL AUTO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA NO. 55
DEL 6 DE MARZO DE 2009, OFICIO NO. 2657 (EXAMEN DE FONDO)

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, doy respuesta al auto emanado por ese Despacho dentro del término legal:

1. Objeciones del Examinador**1.1 De la solicitud de patente****Reivindicaciones**

Manifiesta su Despacho que las reivindicaciones 2 y 5 no se aceptan pues las reivindicaciones no deben hacer referencias a figuras. También se dice que la reivindicación 7 no se acepta por cuanto la composición farmacéutica no esta sustentada en la descripción. Por otro lado se afirma que la reivindicación 16 se refiere a un uso el cual no se considera para protección por patente.

Novedad

Considera su Despacho que la novedad de la presente invención se encontraría afectada por el documento WO 99/02514 (D1). Se dice que el documento del estado de la técnica más cercano es el documento D1 y que la única diferencia serían los procedimientos de las reivindicaciones 8, 9 y 10 que diferirían en algunos aspectos.

Nivel inventivo

Considera su Despacho que el nivel inventivo de las reivindicaciones 8 a 10 de la presente solicitud se verían afectadas por el documento WO 99/42602.

2. Argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud

2.1 Claridad de la solicitud

En respuesta a su objeción con relación a las reivindicaciones 2 y 5 por favor note que se han corregido estas reivindicaciones de tal manera que ellas ya no hacen referencia a las figuras. En su lugar las dichas figuras se han incorporado a las reivindicaciones para responder a su solicitud.

En relación con la reivindicación 7 me permito manifestar que la apreciación de su Despacho es errada por cuanto si existe soporte para la mezcla de las formas A y B en la especificación. Por ejemplo, en la figura 3 se muestra un patrón de difracción de rayos x de una mezcla de las formas A y B.

La reivindicación 16 se ha suprimido en el nuevo capítulo reivindicatorio.

2.2. Novedad y nivel inventivo

En relación a la objeción por novedad el solicitante desea manifestar que el documento de la técnica anterior citado por su Despacho (WO 99/02514), no enseña ninguna de las limitaciones citadas en las reivindicaciones 1 a 7 y 11 a 15. Las reivindicaciones 1 a 7 y 11 a 15 citan dos formas cristalinas de ixabepilona, a saber la forma polimorfa A y la forma polimorfa B (ambas cristalinas), que se reivindican per se en la presente solicitud. Estas dos nuevas formas se caracterizan por sus exclusivas dimensiones de celda, grupos espaciales, densidades y puntos de fusión.

En contraposición, D1 describe la ixabepilona como un aceite incoloro (ejemplo 3 y línea 17, página 50), una forma que difiere significativamente de la forma cristalina. No existe ninguna enseñanza en el documento D1 de que la ixabepilona pudiera existir en dos formas cristalinas y no existe ninguna descripción de cómo se pudieran lograr tales polimorfos,

mucho menos con las características específicas de las formas cristalinas. En razón a que D1 no enseña ni sugiere ninguna característica de las formas cristalinas de ixabepilona tal como se reivindica en la presente invención, las presentes reivindicaciones son novedosas con relación al documento D1. Por lo tanto la afirmación de su despacho de que los polimorfos cristalinos de ixabepilona (análogo de epotilona) no son nuevos carece de sustento porque en ninguna parte del documento D1 se menciona ningún polimorfo.

Con relación a la objeción de nivel inventivo, por favor tenga en cuenta que el documento D2 (WO 99/42602) se relaciona con dos formas cristalinas de epotilona B designadas como modificación A y modificación B. La epotilona B es una lactona mientras que el compuesto de la presente invención es una lactama. Ellas corresponden a diferentes clases de compuestos. Por lo tanto, D2 desde el campo de los ésteres macrocíclicos (lactonas) no le da ningún indicio a la persona experta que estuviera en la búsqueda de nuevas modificaciones de aza-epotilona B, es decir, compuestos del tipo lactama macrocíclica, de seleccionar la exacta modificación de cristalización de la presente invención, es decir, las forma polimórficas A y B reivindicadas del análogo de epotilona.

Además, el proceso de laborar la epotilona B cristalina descrita en D2 difiere significativamente del proceso de hacer ixabepilona cristalina de la presente solicitud. El ejemplo 4 de D2 (página 40) enseña las etapas de obtener epotilona B cristalina en isopropanol, agitando, filtrando y secando.

En contraposición, las reivindicaciones 8 a 10 enseñan un proceso para producir la forma a cristalina con etapas que involucran calentar una suspensión de análogo de ixabepilona en acetyl acetato a cierta temperatura, agregar ciclohexano, enfriar hasta temperatura ambiente para recuperar la forma cristalina, etc. Nada en D2 enseña o sugiere estas etapas y por lo tanto, una persona experta en la técnica no hubiera estado motivado a modificar las enseñanzas de D2 para llegar a la presente invención.

En vista de que su Despacho no hace referencia alguna a los argumentos presentados que prueban sin lugar a dudas la novedad y el nivel inventivo de los polimorfos que, además, como se mencionó en el escrito anterior también ha compartido la Superintendencia (Bajo el expediente 95.023.869 se tramitó la solicitud de patente titulada: "3-[4-(2-aminoetoxy)-benzoil]-2-aril-6-hidroxi[b] tiofeno cristalino" del solicitante Eli Lilly, que trata sobre un polimorfo, a la cual le fue concedido derecho de patente por la Superintendencia de

Industria y Comercio de acuerdo con la resolución 20167 de 24 de agosto de 2000), el solicitante considera como aceptados dichos argumentos lo cual, además, es apenas razonable ante el carácter incontrastable de los mismos.

Como simple reafirmación de los argumentos anteriormente expuestos me permito a continuación transcribir los mismos:

En cuanto a que el polimorfismo es un fenómeno espontáneo que no tendría ninguna actividad inventiva por favor note lo que se menciona en el artículo titulado: "Relevancia del polimorfismo en el área farmacéutica", escrito por: Elizabeth Sánchez G,^{1,2} Helgi Jung C.², Lilián Yépez M.³, Vicente Hernández –Abad.¹

¹ Laboratorio de Investigación Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM;

² Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM

³ Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

"Los diversos polimorfos de una determinada sustancia suelen presentar comportamientos físico-químicos diferentes en propiedades de interés farmacéutico, por ejemplo: la densidad, la dureza, su tendencia higroscópica, la velocidad de solubilización, la estabilidad térmica o el comportamiento en suspensión, **hecho que puede dar lugar a diferencias importantes en la eficacia de un producto farmacéutico.** Además, **puede resultar muy difícil producir un único polimorfo de forma selectiva,** ya que las energías cristalinas varían muy poco entre polimorfos." (resaltado fuera de texto)

"El polimorfismo puede dotar de nuevas herramientas en el desarrollo de medicamentos, y aún cuando **no se puede predecir qué compuestos presentarán polimorfismo,** se ha observado que, en algunos grupos de fármacos, este fenómeno es muy frecuente, como es el caso de los barbituratos (70% de las moléculas de este tipo presentan polimorfismo), de las sulfonamidas (60%) y de los esteroides (23%). **El polimorfismo ha contribuido significativamente en el desarrollo de nuevos productos en la industria farmacéutica,** química y alimenticia, y **continúa proponiendo desafíos a los investigadores en el desarrollo de fármacos y medicamentos,** lo que se convierte en una herramienta única en la ingeniería de sólidos ya que, mediante la manipulación de las estructuras cristalinas y sus propiedades, se puede diseñar un "traje a la medida", empleando las oportunidades que

ofrecen al presentar distintas propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas y, de esta manera, resolviendo los desafíos en cuanto al desarrollo del producto así como cumplimiento a las expectativas regulativas.” (resaltados fuera de texto)

Como se podrá notar estas expertas en temas farmacéuticos parecen diferir de manera notoria de la afirmación de su Despacho y muy por el contrario lo que hacen es destacar la importancia del polimorfismo en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos dejando en muy en claro que **“no se puede predecir qué compuestos presentarán polimorfismo”** lo cual indica de manera clara que los polimorfos no sólo son nuevos sino que poseen nivel inventivo.

En cuanto a que un polimorfo sólo sería nuevo si diera origen a un sistema cristalino distinto, esto, hasta donde la ciencia lo conoce actualmente, estaría más allá de las leyes de la fisicoquímica. Se suele decir en el argot popular que “no hay peor ciego que el que no quiere ver”. La discusión que ha rodeado el patentamiento de los polimorfos es una discusión de carácter político y para nada técnico. Las afirmaciones arriba señaladas por las expertas son claras y contundentes. La importancia de los polimorfos en el área farmacéutica se destaca aún más en el siguiente párrafo del mismo artículo de las autoras antes mencionadas: “Las propiedades que se afectan con los cambios en la cristalinidad sirven como una herramienta para modificar las características físicas de las sustancias activas, lo que representa una alternativa atractiva para la investigación farmacéutica en pro de la mejora de los atributos de calidad de los medicamentos”. Me parece que las aclaraciones adicionales sobran.

Se dice, también, que la diferencia en los valores de difracción de RX no implica ventajas técnicas de uno frente a otro y que la obtención de formas “cristalinas” y caracterizadas por RX no resuelve ningún problema técnico. La autora Dra. Sofia Papathoma (Examinadora de patentes (Patent Examiner in Doctorate) de la Oficina Europea de Patentes explica en su presentación: “Patenting Polymorphs at the European Patent office”, en cuanto a la claridad de una solicitud de patente que verse sobre polimorfos lo siguiente:

“Most suitable for defining a polymorph in a claim are its physicochemical parameters, e.g. those determined by:

- Single crystal X-ray diffraction

6
195

- X-ray powder diffraction (XRPD)
- IR- or RAMAN spectroscopy
- ¹³C-NMR spectroscopy
- Thermal methods: TGA, DTA, DSC"

Y adicionalmente agrega lo siguiente: "In most cases, polymorphs are defined in a claim by parameter values, which relate to the physical data used for defining their crystal structure".

Estimo que con las anteriores consideraciones de la doctora Papathoma queda respondida su afirmación.

Adicionalmente en el artículo titulado "Polimorfismo Farmacéutico" escrito por: África Martín Islán^A y Esther Molina Montes^B (^aLicenciada en Farmacia. Becaria Predoctoral del CSIC y Experta en Polimorfismo de fármacos. ^bLicenciada en Farmacia y en Tecnología de los Alimentos) escrito en la Revista Ámbito Farmacéutico, Vol 25, Número 8, Septiembre de 2006, de OFFARM (Organización Española), se establece lo siguiente:

"Como cada polimorfo presenta propiedades fisicoquímicas características (solubilidad, estabilidad, higroscopicidad), se comporta de forma diferente durante los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación (conocido como proceso LADME). En ocasiones, estas diferencias producen alteraciones importantes en la eficacia del tratamiento. Desde un punto de vista biofarmacéutico y para activos poco solubles, la velocidad de disolución de cada polimorfo será el factor limitante de la absorción y la solubilidad dependerá en cada caso de las energías reticulares del edificio cristalino por la distinta entalpía y punto de fusión que presentan. La utilización de un polimorfo que tenga una adecuada solubilidad proporciona valores sanguíneos suficientes para obtener la acción terapéutica, menos que otra forma menos soluble, al disolverse lentamente y en menor proporción, puede dar lugar a concentraciones sanguíneas insuficientes para lograr una eficacia farmacológica. La elección de una forma cristalina que se disuelva con una alta velocidad alcanzará una concentración plasmática elevada en un intervalo de tiempo pequeño, y tendrá una concentración mayor a la terapéutica (sobre dosificación) y, consecuentemente provocará toxicidad en el paciente."

"Un polimorfo puede presentar algunas propiedades indeseables respecto a sus otras formas posibles, que pueden imposibilitar la adecuada preparación industrial de los medicamentos.

Aspectos como el grado de solubilidad, fluidez, compresibilidad e higroscopicidad puede imposibilitar operaciones tecnológicas de compresibilidad, pulverización/molienda, liofilización, secado, etc.”

De lo anterior es claro que de un polimorfo no necesariamente se derivan resultados positivos sino que estos pueden ser negativos lo que reafirma aún más el hecho que estos polimorfos deben investigarse y que de ninguna manera es obvio que exista un polimorfo y, aún conociendo su existencia, que este tenga las características que se buscan porque incluso podrán ser negativas. Por lo tanto los polimorfos desarrollados no solo son nuevos sino que poseen nivel inventivo.

3. Modificación de las reivindicaciones

Presento junto con este escrito un Capítulo Reivindicatorio Modificado con el objeto de responder a las objeciones formales planteadas.

Para que la anterior modificación surta efecto, adjunto el formulario de modificación voluntaria a solicitud pendiente y la tarifa establecida por ese Despacho para este trámite.

En virtud de lo anterior, solicito que se acepten las razones expuestas en el presente documento y en consecuencia, se otorgue el privilegio de patente de invención para el invento que se tramita en este expediente.

Atentamente,

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ

C.C.No.79.143.366 de Usaquén

T.P.20.281

Anexos:

Capítulo reivindicatorio modificado
Formulario de modificación
Recibo

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE

☐

Corrección de Error Material

☒

Modificación de una solicitud

②

SOLICITANTE

Nombre: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Dirección: P.o. Box 4000, Princeton, New Jersey 08543-4000, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6o.

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 79.143.366

TP 20.281

④

Numero de expediente

03.011.545

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada

Presento a su despacho nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por

15 reivindicaciones para subsanar las observaciones hechas en el examen de fondo.

⑥

Comprobante de Pago No.

09-24,237

Fecha

MARZO-27-2009

⑦

Anexos

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

⑧

NOMBRE ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA

C.C. 79.143.366

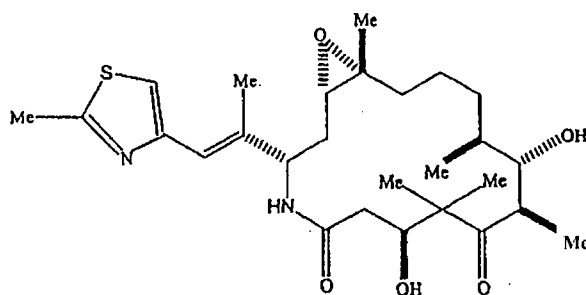
T.P. 20.281

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

2000-F03

Reivindicamos:

1. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula:



1

que comprende la Forma A caracterizada por:

parámetros de célula unitaria iguales a lo siguiente:

Dimensiones de Célula

$$a = 14,152(6) \text{ \AA}$$

$$b = 30,72(2) \text{ \AA}$$

$$c = 6,212(3) \text{ \AA}$$

$$\text{Volumen} = 2\,701(4) \text{ \AA}^3$$

Espacio grupo

$P2_12_12_1$

Ortorhómbico

Moléculas/célula unitaria

4

Densidad (calculada)(g/cm³)

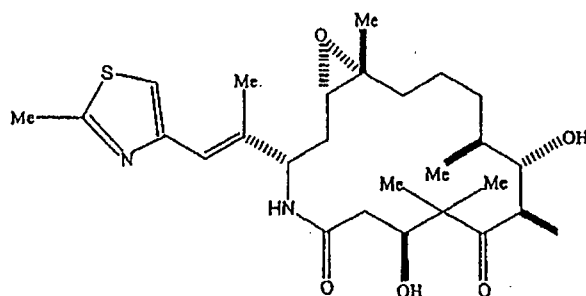
1.247

Punto de Fusión

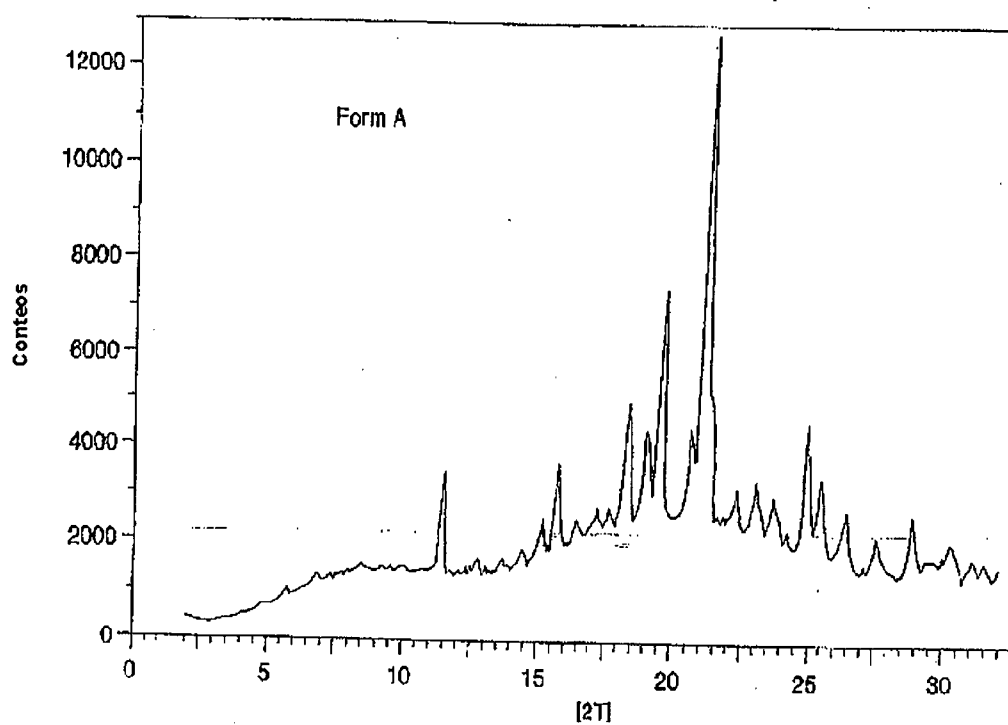
182-185°C (descomposición)

picos característicos en el patrón de difracción de rayos x en polvo a valores de dos teta (CuK α λ =1,5406 Å a 22°C: 5,69, 6,76, 8,38, 11,43, 12,74, 13,62, 14,35, 15,09, 15,66, 16,43, 17,16, 17,66, 18,31, 19,03, 19,54, 20,57, 21,06, 21,29, 22,31, 23,02, 23,66, 24,18, 14,98, 25,50, 26,23, 26,23, 26,46, 27,59, 28,89, 29,58, 30,32, 31,08 y 31,52.

2. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula

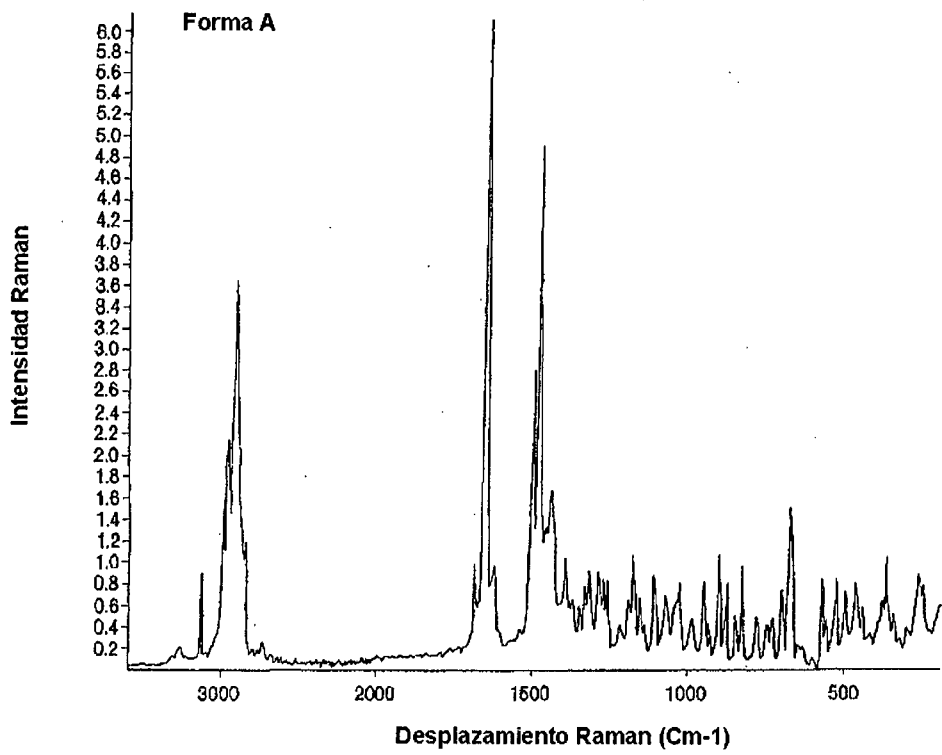


que comprende la forma A caracterizada por una difracción de rayos x en polvo como se muestra a continuación.

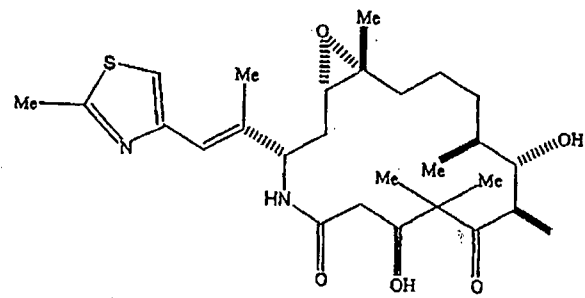


200

y un espectro Raman como se muestra a continuación



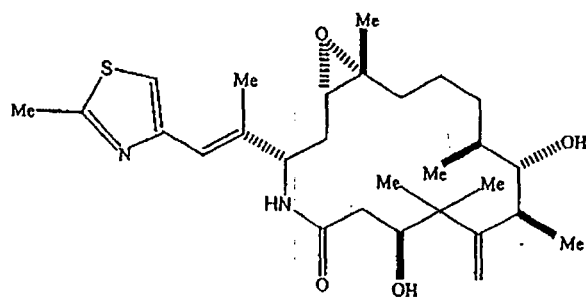
3. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula



que comprende la forma A caracterizado por una solubilidad de 0,1254, una solubilidad en una solución acuosa al 3% de polisorbato 80 de 0,2511, un punto de fusión con descomposición entre 182 – 185° C y un calor de solución de 20,6 kJ/mol.

4. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula

201

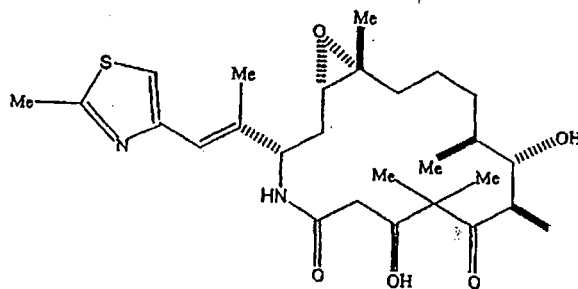


Que comprende la forma B caracterizada por:
parámetros de célula unitaria iguales a lo siguiente:

Dimensiones de Célula	a= 16,675 (2) Å b=28,083(4) Å c=6,054(1) Å Volumen =2835(1) Å ³
Espacio grupo	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ Ortorhómbico
Moléculas/célula unitaria	4
Densidad (calculada) (g/cm ³)	1,187
Punto de fusión	191-199°C descomposición y

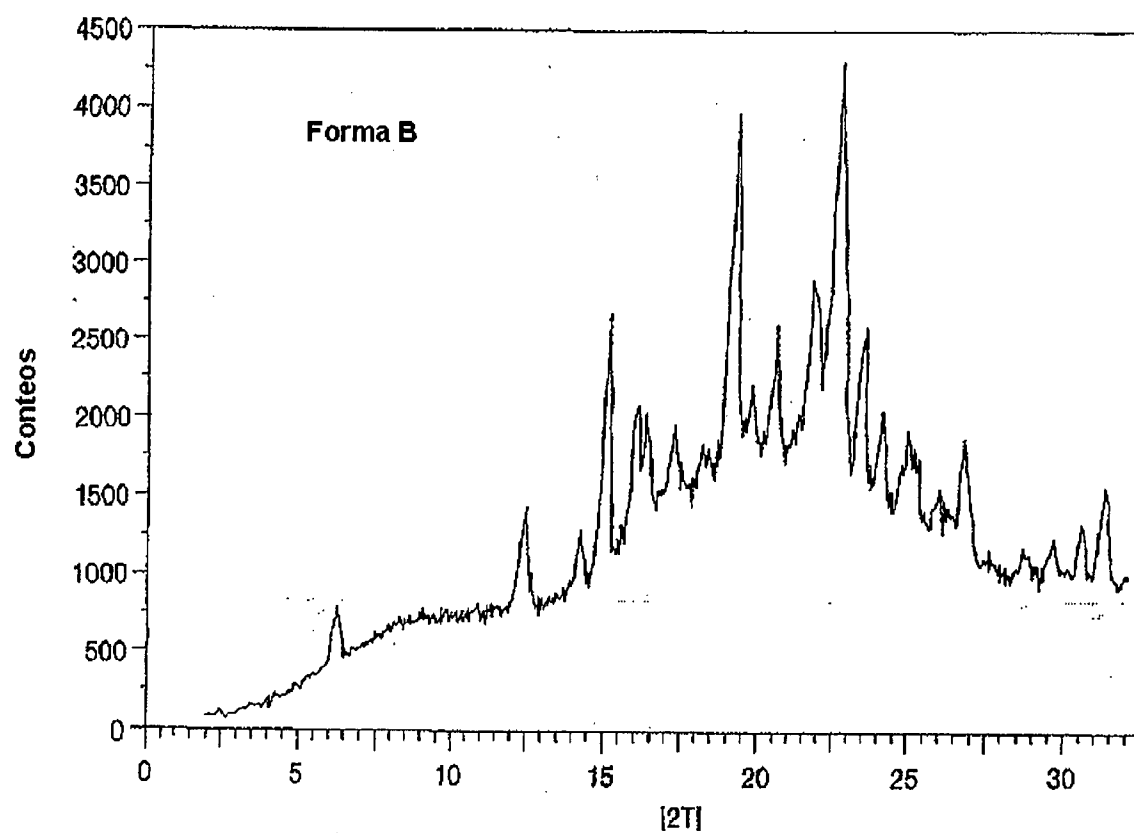
picos característicos en el patrón de difracción de rayos x en polvo a valores de dos teta (CuKα λ=1,5406 Å a 22°C): 6,17, 10,72, 12,33, 14,17, 14,93, 15,88, 16,17, 17,11, 17,98, 19,01, 19,61, 20,38, 21,55, 21,73, 22,48, 23,34, 23,93, 24,78, 25,15, 25,90, 26,63, 27,59, 28,66, 29,55, 30,49 y 31,22.

5. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula

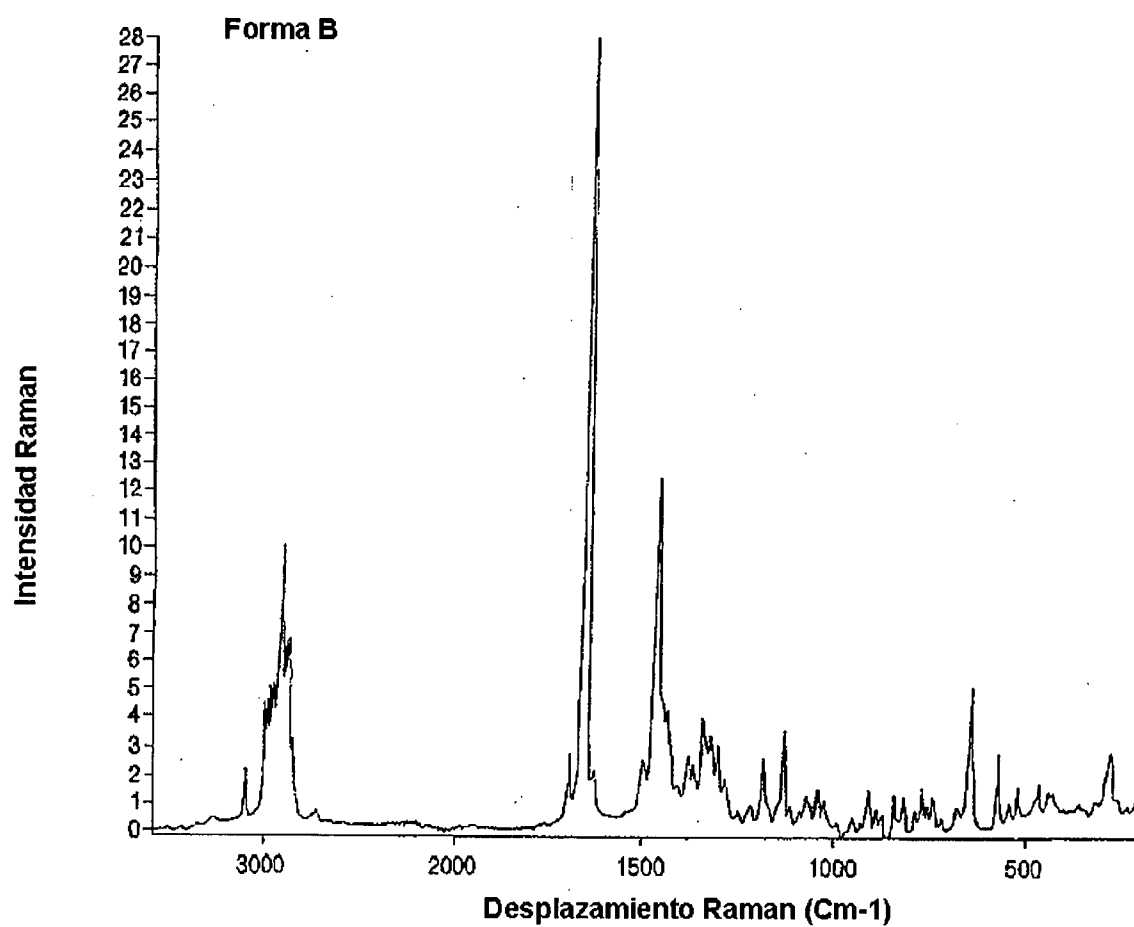


que comprende la Forma B caracterizada por difracción de rayos x en polvo como se muestra a continuación:

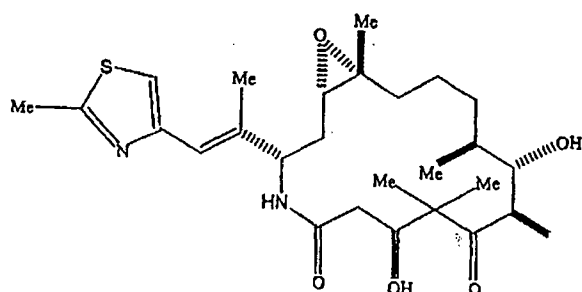
13
202



y un espectro Raman como se muestra a continuación.

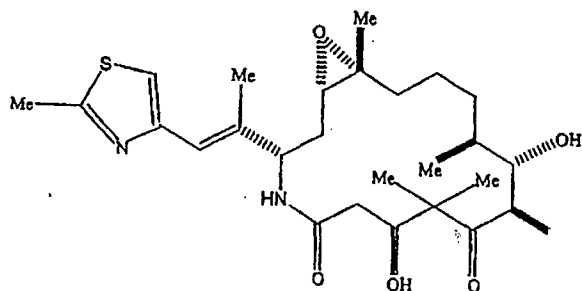


6. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula



que comprende la Forma B caracterizada por una solubilidad en agua de 0,1907, una solubilidad en una solución acuosa al 3% de polisorbato 80 de 0,5799, un punto de fusión con descomposición entre 191-199° C y un calor de solución de 9,86 kJ/mol.

7. Una composición farmacéutica que comprende un análogo de epotilona representado por la fórmula I:



En donde dicho análogo de epotilona comprende una mezcla del polimorfo cristalino de la Forma A y el polimorfo cristalino de la forma B, en donde la forma A se caracteriza como en las reivindicaciones 1, 2 y/o 3, y la Forma B se caracteriza como en las reivindicaciones 4, 5 y/o 6.

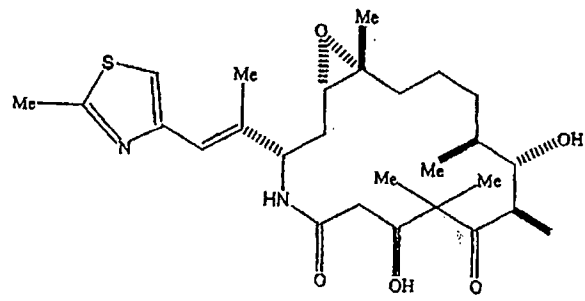
8. Un proceso para producir un polimorfo cristalino que es la Forma A del análogo de epotilona representado por la fórmula I en las reivindicaciones 1, 2 o 3, que comprende calentar un precipitado de dicho análogo representado por la fórmula I en desde 8 a 16 mL de acetato de etilo por gramo de dicho análogo a 75°C manteniendo la temperatura durante una hora,

agregando una cantidad de ciclohexano en una relación con respecto a la cantidad de acetato de etilo de desde 1:2 a 2:2, permitiendo que la mezcla se enfríe a temperatura ambiente, manteniendo la mezcla con agitación desde 12 a 96 horas, enfriándola adicionalmente a 5°C durante dos horas y recuperando la Forma A cristalina de allí.

9. Un proceso para producir un polimorfo cristalino que es la Forma A del análogo de epotilona representado por la fórmula I en las reivindicaciones 1, 2 o 3, que comprende calentar un precipitado de dicho análogo representado por la fórmula I en desde 8 a 16 mL de acetato de etilo por gramo de dicho análogo a 75°C, agregando cristales semilla a éste, manteniendo la mezcla durante 30 minutos, agregando una cantidad de ciclohexano en una relación con respecto a la cantidad de acetato de etilo de desde 1:2 a 2:2, mientras se mantiene la mezcla a 70°C, enfriando la mezcla a temperatura ambiente, manteniendo la mezcla con agitación durante 18 horas, enfriándola adicionalmente a 5°C durante dos horas y recuperando de allí la Forma A cristalina.

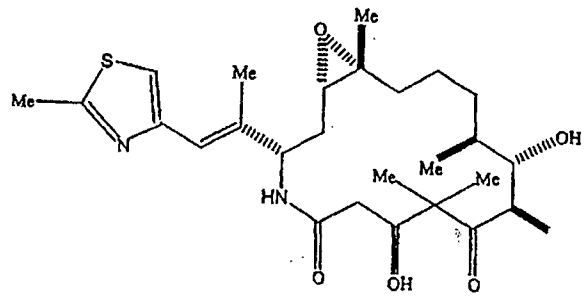
10. Un proceso para producir un polimorfo cristalino que es la Forma A del análogo de epotilona representado por la fórmula I en las reivindicaciones 1, 2 o 3, que comprende calentar un precipitado de dicho análogo representado por la fórmula I en desde 8 a 16 mL de acetato de etilo por gramo de dicho análogo a 75°C, durante por lo menos una hora hasta que se forma una solución, enfriando dicha solución a 50°C durante dos horas, agregando allí dichos cristales de semilla cuando la temperatura alcanza 60°C, enfriando la solución a 30°C durante tres horas, reduciendo adicionalmente la temperatura de la solución a -10°C durante tres horas durante una hora de las cuales una cantidad de ciclohexano se agrega allí gota a gota, en una relación con respecto a la cantidad de acetato de etilo de desde 1:2 a 2:2, manteniendo la mezcla resultante a -10°C durante una hora y recuperando de allí la Forma A cristalina.

11. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula



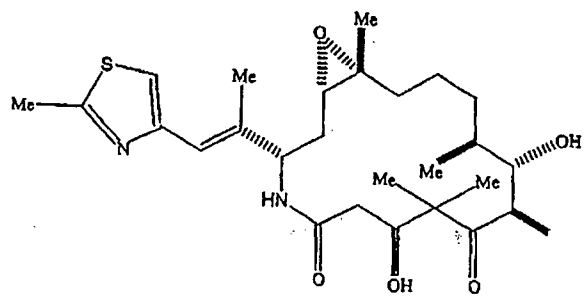
dicho polimorfo cristalino esta libre de material amorfo.

12. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula



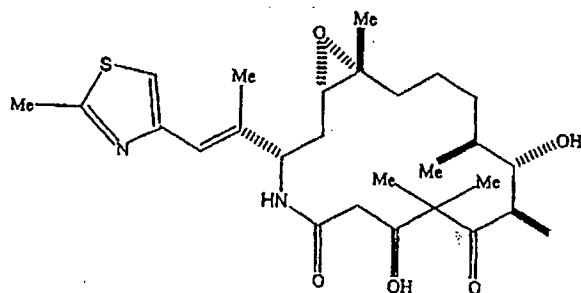
dicho polimorfo cristalino tiene una pureza de por lo menos 98,2 %.

13. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula



dicho polimorfo cristalino tiene una pureza de por lo menos 99,2 %.

14. Un polimorfo cristalino de un análogo de epotilona representado por la fórmula



dicho polimorfo cristalino tiene una pureza de por lo menos 99,4 %.

15. Una composición farmacéutica la cual comprende como ingrediente activo una cantidad efectiva de un polimorfo cristalino tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13 o 14.

18
207

2009/005

2009/005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 24,237
FECHA : MARZO 27 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-011545-00009-0000

Fecha: 2009-06-04 16:42:17 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 18

===== CONSIGNACION =====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Tr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	RECIBO DE CAJA			23790	27/03/2009	65,162,000.00

===== CONCEPTO =====

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
5	05-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	111,000.00
		TOTAL :	111,000.00

SON: CIENTO ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12P 17/18, C07D 493/04, B01D 15/08	A2	(11) International Publication Number: WO 99/42602 (43) International Publication Date: 26 August 1999 (26.08.99)
(21) International Application Number: PCT/EP99/01025 (22) International Filing Date: 17 February 1999 (17.02.99) (30) Priority Data: 396/98 19 February 1998 (19.02.98) CH 1007/98 5 May 1998 (05.05.98) CH (71) Applicant (for all designated States except AT): NOVARTIS AG [CH/CH]; Schwarzwaldallee 215, D-4058 Basel (CH). (71) Applicant (for AT only): NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT MBH [AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1235 Vienna (AT). (72) Inventors: HOFMANN, Hans; Bottmingerstrasse 31, CH-4107 Ettingen (CH). MAHNKE, Marion; Birkenweg 1, D-79585 Steinen (DE). MEMMERT, Klaus; Erlenweg 11, D-79540 Lörrach (DE). PETERSEN, Frank; Eimeldingerweg 8, D-79576 Weil am Rhein (DE). SCHUPP, Thomas; Fröschmattweg 5, CH-4313 Möhlin (CH). KÜSTERS, Ernst; Gallenweilerweg 1, D-79427 Eschbach (DE). MUTZ, Michael; Schlüsselstrasse 30, D-79104 Freiburg (DE).		(74) Agent: BECKER, Konrad; Novartis AG, Corporate Intellectual Property, Patent & Trademark Dept., CH-4002 Basel (CH). (81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
(54) Title: FERMENTATIVE PREPARATION PROCESS FOR CYTOSTATICS AND CRYSTAL FORMS THEREOF (57) Abstract The invention relates to a process for concentrating epothilones in culture media, a process for the production of epothilones, a process for separating epothilones A and B and a strain obtained by mutagenesis for the production of epothilones, as well as aspects related thereto. Crystal forms of epothilone B are also described.		

FERMENTATIVE PREPARATION PROCESS FOR CYTOSTATICS AND CRYSTAL FORMS THEREOF

The invention relates to a new biotechnological preparation process that can be used on an industrial scale for the production of epothilones, especially a process for concentrating these compounds in the culture medium, as well as a new strain for the fermentative preparation of these compounds. The invention also relates to new crystal forms of epothilones, especially epothilone B, obtainable by the new processes, their usage in the production of pharmaceutical preparations, new pharmaceutical preparations comprising these new crystal forms and/or the use of these compounds in the treatment of proliferative diseases such as tumours, or in the production of pharmaceutical formulations which are suitable for this treatment.

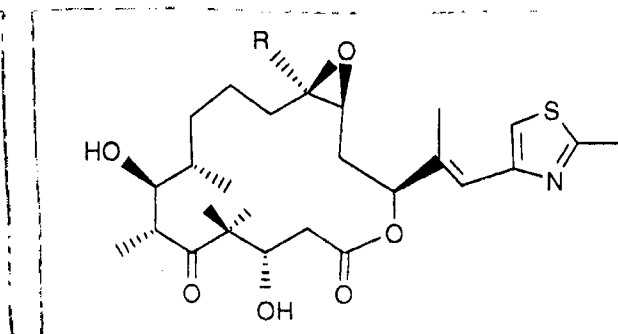
Background to the invention:

Of the existing cytotoxic active ingredients for treating tumours, Taxol® (Paclitaxel; Bristol-Myers Squibb), a microtubuli-stabilising agent, plays an important role and has remarkable commercial success. However, Taxol has a number of disadvantages. In particular, its very poor solubility in water is a problem. It therefore became necessary to administer Taxol® in a formulation with Cremophor EL® (polyoxyethylated castor oil; BASF, Ludwigshafen, Germany). Cremophor EL® has severe side effects; for example it causes allergies which in at least one case have led even to the death of a patient.

Although the Taxan class of microtubuli-stabilising anti-cancer agents has been commended as "perhaps the most important addition to the pharmaceutical armoury against cancer in the last decade" (see Rowinsky E.K., Ann. rev. Med. 48, 353-374 (1997)), and despite the commercial success of Taxol®, these compounds still do not appear to represent a really great breakthrough in the chemotherapy of cancer. Treatment with Taxol® is linked with a series of significant side effects, and a few primary classes of compact tumours, namely colon and prostate tumours, respond to this compound only to a small extent (see Rowinsky E.K., *inter alia*). In addition, the efficacy of Taxol can be impaired and even completely neutralised by acquired resistance mechanisms, especially those based on the overexpression of phosphoproteins, which act as efflux pumps for active ingredients, such as "Multidrug Resistance" due to overexpression of the multidrug transport glycoprotein "P-glycoprotein".

210

Epothilones A and B represent a new class of microtubuli-stabilising cytotoxic active ingredients (see Gerth, K. et al., J. Antibiot. 49, 560-3 (1966)) of the formulae:



wherein R signifies hydrogen (epothilone A) or methyl (epothilone B).

These compounds have the following advantages over Taxol®:

- a) They have better water-solubility and are thus more easily accessible for formulations.
- b) It has been reported that, in cell culture experiments, they are also active against the proliferation of cells, which, owing to the activity of the P-glycoprotein efflux pump making them "multidrug resistant", show resistance to treatment with other chemotherapy agents including Taxol® (see Bolag, D. M., et al., "Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a Taxol-like mechanism of action", Cancer Research 55, 2325-33 (1995)). And
- c) it could be shown that they are still very effective *in vitro* against a Taxol®-resistant ovarian carcinoma cell line with modified β -tubulin (see Kowalski, R. J., et al., J. Biol. Chem. 272(4), 2534-2541 (1997)).

Pharmaceutical application of the epothilones, for example for tumour treatment, is possible in an analogous manner to that described for Taxol, see for example US 5.641.803; US 5.496.804; US 5.565.478).

In order to be able to use the epothilones on a larger scale for pharmaceutical purposes, however, it is necessary to obtain appropriate amounts of these compounds.

2M

substances), whereby a complex-forming component which is soluble in the culture medium is added to the medium.

A further aspect relates to the corresponding culture medium, which comprises a corresponding complex-forming component and microorganisms, especially myxobacteria, in particular of the genus *Sorangium*, which are suitable for producing epothilones, especially epothilone A and/or B.

A further aspect of the invention relates to a process for the production of epothilones, especially epothilone A and/or B, especially the two pure compounds, in particular epothilone B, which is characterised in that the epothilones are obtained by working up a culture medium for the biotechnological preparation of these compounds, which comprises as producers of natural substances microorganisms, especially myxobacteria, that produce these compounds, and to which a complex-forming component that is soluble in the culture medium is added, and the subsequent purification and, if desired, separation of the epothilones, for example epothilone A and B.

A fourth aspect of the invention relates to a method of separating epothilones, especially epothilones A and B from one another, which is characterised by chromatography on a reversed-phase column with an eluant comprising a lower alkyl cyanide.

A further aspect of the invention relates to a strain of *Sorangium cellulosum* obtained by mutagenesis, which under otherwise identical conditions, produces more epothilones than *Sorangium cellulosum* Soce90.

A further aspect also relates to new crystal forms of epothilone B:

The general terms used hereinabove and hereinbelow preferably have the meanings given hereinbelow:

Where reference is made hereinabove and hereinbelow to documents, these are incorporated insofar as is necessary.

Mitsubishi Chemical Co., Milan] (preferably in a ratio of centrifugate: resin volume of ca. 10:1 to 100:1, preferably about 50:1) and stirred in an agitator. In this step, the epothilones are transferred from the cyclodextrin to the resin. After a period of contact of ca. 1 hour, the resin is separated by centrifugation or filtration. Adsorption of the epothilones onto the resin may also be effected in a chromatography column, by placing the resin in the column and running the centrifugate over the resin. After adsorption, the resin is washed with water. Desorption of the epothilones from the resin is effected with isopropanol. The isopropanol phase is then freed of isopropanol preferably by the addition of water in particular in a circulating evaporator, and the resulting water phase is extracted with ethyl acetate. The epothilones are transferred from the water phase to the ethyl acetate phase. Then the ethyl acetate extract is concentrated to dryness, using a rotary evaporator. An initial concentration of the epothilones is then achieved by means of molecular filtration (e.g. Sephadex LH-20 [Pharmacia, Uppsala, Sweden] with methanol as eluant). The peak fractions from the molecular filtration contain epothilone A and B and have a total epothilone content of > 10%. Separation of these peak fractions, which contain epothilone A and B in a mixture, into the individual components, then follows by means of chromatography on a "reversed-phase", e.g. RP-18 phase (phase which is modified by alkyl radicals containing 18 carbon atoms per chain), with an appropriate eluant, preferably one containing a nitrile such as acetonitrile (this gives better separation than for example alcohols such as methanol). Epothilone A elutes before epothilone B. The peak fractions with epothilone B may still contain small portions of epothilone A, which can be removed by further separation on RP-18. Finally, the epothilone A fraction is crystallised directly from ethyl-acetate:toluene = 2:3, and the epothilone B fraction from methanol or ethyl acetate.

Preferred embodiment of the invention

The invention preferably relates to a process for the concentration of epothilones, especially epothilone A and/or B, in particular epothilone B, in a culture medium for the biotechnological preparation of this (these) compound(s), which contains a microorganism which is suitable for this preparation, especially a *Sorangium* strain, especially of the type *Sorangium Cellulosum Soce90*, or a mutant arising therefrom, in particular the strain having reference BCE 33/10, water and other usual appropriate constituents of culture media, whereby a cyclodextrin or a cyclodextrin derivative, or a mixture of two or more of these compounds is added to the medium, especially one or more, preferably one or two or more

cyclodextrin, a cyclodextrin derivative or a mixture of two or more cyclodextrins and/or cyclodextrin derivatives; the centrifugate is mixed with a resin, especially a polystyrene resin, or is run through a column filled with such a resin; if necessary, the resin is washed with water; the epothilone(s) is or are desorbed from the resin using a polar solvent, especially an alcohol, primarily a lower alkanol such as isopropanol; if necessary, concentrated by means of prior, simultaneous or subsequent addition of water; an organic solvent which is immiscible with water, for example an ester, such as ethyl acetate, is added, and the epothilone(s) is or are transferred to the organic phase, for example by agitating or stirring; where necessary, the organic phase is concentrated; the epothilones from the organic solution obtained are concentrated through a molecular sieve for compounds of low molecular weight; and then the fractions containing the epothilones, especially epothilone A and/or B undergo separation by a reversed-phase column, preferably eluting with an eluant containing a nitrile, such as acetonitrile (or instead, an eluant containing an alcohol, such as methanol); whereby epothilones A and B are extracted separately, and if desired, can be further concentrated by recrystallisation.

A further preferred aspect of the invention relates to a method of separating epothilones, especially epothilones A and B from one another, which is characterised by chromatography on a reversed-phase column with an eluant containing a lower alkyl cyanide, chromatography being carried out on a column material, especially an RP-18 material, which is charged with hydrocarbon chains, such as those containing 18 carbon atoms, and employing an eluant containing a nitrile, especially a lower alkyl nitrile, in particular acetonitrile, especially a mixture of nitrile/water, in particular a mixture of acetonitrile/water, preferably in a ratio of nitrile to water of ca. 1:99 to 99:1, primarily 1:9 to 9:1, e.g. between 2:8 and 7:3, e.g. 3:7 or 4:6. This separation may follow on to a filtration with a molecular sieve, or is preferably effected directly using the residue after adsorption of the epothilones from the culture medium containing a complex-forming component onto a resin. One advantage of separation with an eluant containing a lower alkyl cyanide over that using alcohols, such as methanol, is the better separation of epothilones A and B.

The invention relates preferably to a process for the preparation of epothilones, which a) comprises a process for the concentration of epothilones, especially epothilone A and/or B, in particular epothilone B, in a culture medium for the biotechnological preparation of this (these) compound(s), which contains a microorganism which is suitable for this preparation,

214

The invention relates in particular to the individual process steps named in the examples or any combination thereof, the culture media named therein, crystal forms and the strain described therein.

The invention also relates to new crystal forms of epothilone B, especially a crystal form of epothilone B described as modification B and in particular described as modification A.

The crystal forms can be distinguished in particular by their X-ray diagrams. X-ray diagrams taken with a diffractometer and using Cu-K α_1 -radiation are preferably used to characterise solids of organic compounds. X-ray diffraction diagrams are used particularly successfully to determine the crystal modification of a substance. To characterise the existing crystal modification A and crystal modification B of epothilone B, the measurements are made at an angle range (2θ) of 2° and 35° with samples of substance that are kept at room temperature.

The X-ray diffraction diagram thus determined (reflection lines and intensities of the most important lines) from crystal modification A (modification A) of epothilone B is characterised by the following table.

2θ	Intensity
7.7	very strong
10.6	weak
13.6	average
14.4	average
15.5	average
16.4	weak
16.8	weak
17.1	weak
17.3	weak
17.7	weak
18.5	weak
20.7	strong
21.2	strong

21.9	weak
22.4	weak
23.3	strong
25.9	average
31.2	weak
32.0	average

The invention also relates in particular to a new crystal form of epothilones B, which is characterised by a melting point of more than 120 °C, especially between 120 °C and 128 °C, in particular 124-125 °C. Surprisingly, this value is considerably higher than the values previously described in literature. The invention relates especially to a crystal form of epothilone B, which is characterised by the X-ray diffraction diagram of the crystal form A and a melting point of above 120 °C, especially between 120 °C and 128 °C, for example between 124 °C and 125 °C.

The X-ray diffraction diagram thus determined (reflection lines and intensities of the most important lines) from crystal modification B (modification B) of epothilone B is characterised by the following table.

2θ	Intensity
6.9	very strong
8.0	weak
8.3	average
10.8	strong
11.5	average
12.4	weak
13.1	strong
15.5	weak
16.2	weak
16.7	average
18.1	average
18.6	average
20.4	weak

20.9	strong
21.3	weak
21.5	very weak
22.5	average
24.2	weak
25.1	average

The new crystal forms are especially stable, in particular crystal form A is to be regarded as the one which is more thermodynamically stable, and they are therefore suitable as active ingredients for solid forms of administration, for storing in solid form or as intermediates (with particularly good storability) in the preparation of solid or liquid forms of administration.

The invention also relates to the use of the new crystal forms, especially crystal form B, but primarily crystal form A (all referred to hereinafter as active ingredient) in the production of pharmaceutical preparations, new pharmaceutical preparations which contain these new crystal forms, and/or their use in the treatment of proliferative diseases, such as tumours. In the following, where pharmaceutical preparations or compositions which comprise or contain the active ingredient are mentioned, in the case of liquid compositions or compositions which no longer contain the crystal form as such, this is always understood to mean also the pharmaceutical preparations obtainable using the crystal forms (for example infusion solutions obtained using crystal forms A or B of epothilone B), even if they no longer contain the respective crystal form (for example because they exist in solution).

The invention also relates especially to the use of a new crystal form of epothilone B, especially the crystal form B or in particular crystal form A, in the production of pharmaceutical preparations, characterised by mixing a new crystal form of epothilone B with one or more carriers.

The invention also relates to a method of treating warm-blooded animals suffering from a proliferative disease, characterised by administering a dose of epothilone B which is effective for treating said disease in one or the new crystal forms to a warm-blooded animal requiring such treatment, also including in particular the treatment with those preparations that are produced using one of the new crystal forms; and/or the use of a new crystal form of epothilone B in such a treatment.

217

To determine the amounts of epothilone A and epothilone B formed in this culture, the following procedure is followed. The 50 ml culture solution is filtered through a nylon sieve (150 μm pore size), and the polystyrene resin Amberlite XAD16 retained on the sieve is rinsed with a little water and subsequently added together with the filter to a 50 ml centrifuge tube (Falcon Labware, Becton Dickinson AG Immengasse 7, 4056 Basle). 10 ml of isopropanol (>99%) are added to the tube with the filter. Afterwards, the well-sealed tube is shaken for 1 hour at 180 rpm in order to dissolve the epothilone A and B, which is bonded to the resin, in the isopropanol. Subsequently, 1.5 ml of the liquid is centrifuged, and ca. 0.8 ml of the supernatant is added using a pipette to a HPLC tube. The HPLC analysis of these samples is effected as described below under HPLC analysis in the product analysis section. The HPLC analysis determines which culture contains the highest content of epothilone B. From the above-described sector plate of the corresponding colony (the plates have been stored at 4°C in the meantime), cells from ca. 1 cm^2 of agar area are transferred by a plastic loop to 10 ml of G52 medium in a 50 ml Erlenmeyer flask and are incubated for 7 days at 180 rpm in an agitator at 30°C. 5 ml of this culture are transferred to 50 ml of G52 medium (in a 200 ml Erlenmeyer flask) and incubated at 180 rpm for 3 days in an agitator at 30°C.

Second and third UV mutation step and selection: The procedure is exactly the same as described above for the first UV mutation step, whereby the selected culture of the best colony from the first UV mutation is used for the second mutagenesis. For the third mutagenesis, the culture of the best colony from the second mutagenesis is used accordingly. The best colony after this third cycle of UV mutation steps, followed by selection of the resulting strains for improved epothilone B production, corresponds to mutant BCE33/10.

Preservation of the strain

10 ml of a 3 day old culture in G52 medium (50 ml medium in a 200 ml Erlenmeyer flask, 30°C and 180 rpm) are transferred to 50 ml of 23B3 medium (in a 200 ml Erlenmeyer flask) and incubated for 3 days at 180 rpm in an agitator at 30°C. 1 ml portions of this culture are removed in a form which is as homogeneous as possible (prior to each removal the culture is shaken by hand in the Erlenmeyer flask) together with the polystyrene resin Amberlite XAD16 (polystyrene adsorption resin, Rohm & Haas, Frankfurt, Germany), then filled into