



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-38074

54. TÍTULO Derivados de Bengamida, método para su producción y su uso para el tratamiento de cáncer.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL e 07D 223/10, 223/12, A61K31/55, A61P35/00

71. SOLICITANTE Aventis Pharma Deutschland GmbH

DOMICILIO Frankfurt, Alemania

74. APODERADO Luis Patiño Leyra

22. BOGOTÁ, D. C., 21 de Abril de 2006

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

24-05-2006

①

SOLICITUD DE :



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH**

Dirección: Brüningstrasse 50,
65929 Frankfurt, Alemania
Nacionalidad o Domicilio: Frankfurt, Alemania
Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **LUIS PATIÑO LEYVA**

Dirección Cra. 11ª No. 94-76 - Of. 308

Teléfono: 6161948

Fax: 6163976

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☒

Cual

Número 2.930.616 TP 2698

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **HOFFMANN Holger**

Dirección: Ernst-Ludwig-Strasse 5,

Nacionalidad o Domicilio: 64646 Heppenheim, Alemania

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/011244

Fecha Octubre 8 de 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/044803 A1

Fecha Mayo 19 de 2005

⑥ **Título (54) DERIVADOS DE BENGAMIDA, MÉTODO PARA SU PRODUCCIÓN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.**

⑦

Clasificación Internacional (51) C07D 223/10, 223/12, A61C31/55, A61P35/00

⑧

PRIORIDAD:

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Numero de Solicitud

SI ☒ NO ☐

Alemania

Octubre 24, 2003

103 49 669.6

⑨

Comprobante de pago No.

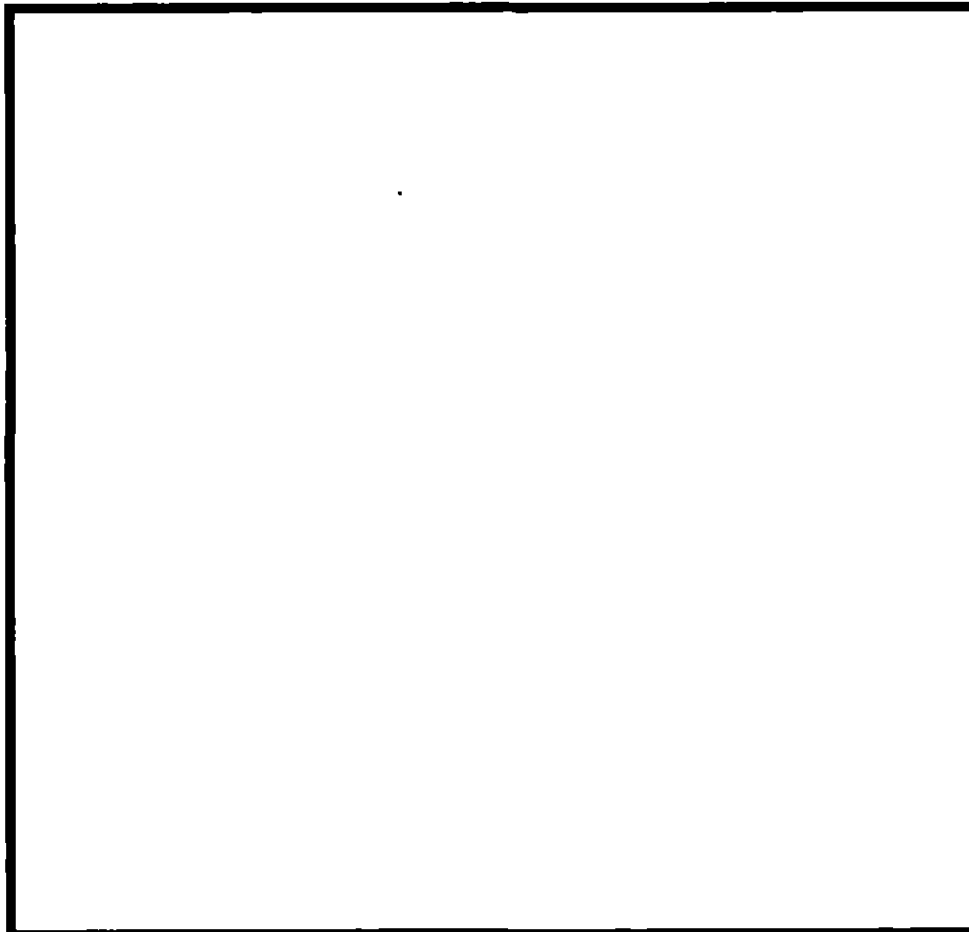
Fecha

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

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. .
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional.

(11) FIGURA CARACTERISTICA



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUIS PATIÑO LEYVA

FIRMA: 

C.C. 2.930.618 Bogotá T.P. 2698

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

Continuación nombre, dirección y domicilio de inventores:

<u>Nombre</u>	<u>Dirección</u>	<u>Domicilio</u>
HAAG-RICHTER Sabine	Hammanstr. 2,	60322 Frankfurt, Alemania
KURZ Michael	Erlenweg 7,	65719 Hofheim, Alemania
TIETGEN Heiko	Karolinger Strasse 19,	55130 Mainz, Alemania

Otros anexos que se acompañan a la solicitud.

Copia del formato PCT/RO/101 correspondiente a la solicitud internacional.

Copia del formato PCT/IB/304 correspondiente a la notificación relativa al envío o transmisión del documento de prioridad.

Copia formato PCT/IB/306 correspondiente a la notificación de un cambio.

Copia formato DSMZ-BP/4 y copia formato DSMZ-BP/9

**G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA**

The undersigned, acting on behalf of and representing of domiciled in, hereby appoint(s) LUIS PATIÑO LEYVA and/or GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO, domiciled in Bogotá D.C., Republic of Colombia, as our true and legal attorney with the necessary powers:

1) To apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial models, as well as their assignments, extensions and changes of name; 2) To prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) To intervene as plaintiff or defendant, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on patent matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to patents.

To this effect, I (we) hereby authorize him to file applications, make descriptions, protests, amendments, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by Law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect my (our) interests, with all other necessary legal faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any action, as well as the faculty of receiving, conciliating, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications, and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed in on this day of of

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

Signature: [Signature]

**G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA**

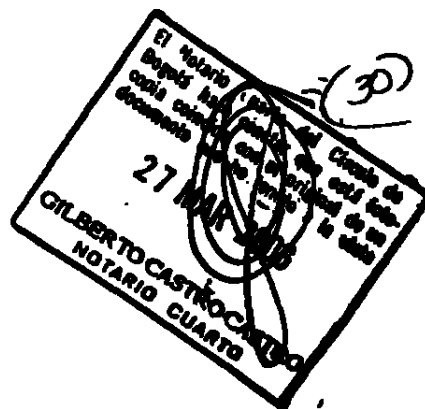
Yo (nosotros), obrando en nombre propio y representación de, con domicilio en, nombro(amos) a LUIS PATIÑO LEYVA y/o GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO, con domicilio en Bogotá D.C., República de Colombia, Cra 11ª No 94-76, Oficina 308, apoderado verdadero y legal, con poder especial, amplio y suficiente:

1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, dibujos y modelos industriales, así como sus trasposos, prórrogas y cambios de nombre; 2) Elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases; 3) Intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal, demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos, u observaciones a cualquier asunto sobre patentes; al ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con patentes.

A este efecto, lo facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la Ley, renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando al descargo respectivo, y en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar, o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de recibir, conciliar, desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en el de de



Nummer 1529/2005 der Urkundenrolle

Der Notar versichert, daß er die Beteiligten nach einer Vorbefassung im Sinne des § 3 Abs. 1 Satz 1 Nr. 7 BeurkG gefragt hat. Die Frage wurde verneint.

The Notary Public confirms, that he has asked the participants, if there has been a prior involvement in the meaning of § 3 section 1 sentence 1 No. 7 BeurkG (Law on Notarisation). This question was answered in the negative.

Die vorstehenden, heute vor mir anerkannten Unterschriften von

It is officially certified that

1. Prokurist Dr. Elmar-Michael Wein, Niedernhausen,
2. Handlungsbevollmächtigter Dieter Breuer, Frankfurt,

wasdan hiermit beglaubigt.
Sie sind mir persönlich bekannt.

have signed this document.
They are personally known to me.

Gleichzeitig wird bestätigt, daß die Personen zu 1) und 2) gemeinsam zeichnungs- und vertretungsberechtigt sind für die

At the same time it is confirmed that the persons 1) and 2) are entitled to jointly sign and represent in legally binding manner the

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH in Frankfurt am Main

laut Eintragung im Handelsregister -HR B 40661-, das vom Notar am 10. Oktober 2005 eingesehen wurde, bzw. lt. vorliegender Vollmacht.

according to the Commercial Register -HR B 40661-, which has been inspected by the Notary Public on October 10, 2005, or according to the letter of authorisation, which I have before me.

Frankfurt am Main, den 01. Dezember 2005

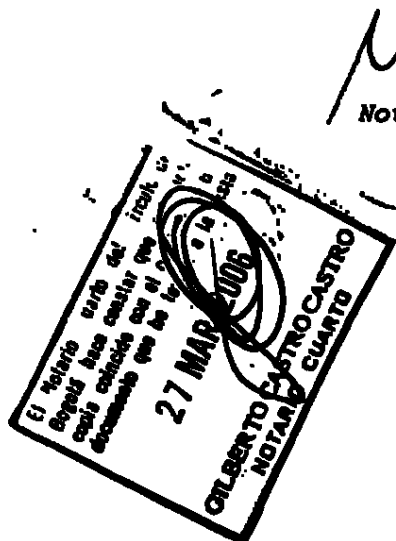


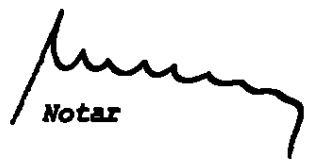

Friedrich, Notar

Kostenrechnung :

Wert : 10.000,-- EUR
Gebühr §§ 141, 32, 45 Kost.O.
Gebühr § 150 Kost.O.
Steuer 16 %

13,50 EUR
13,-- EUR
4,24 EUR
30,74 EUR




Notar



APOSTILLE

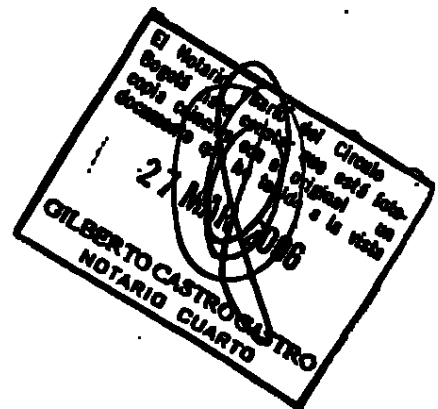
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von Friedrich
3. in seiner Eigenschaft als amtlich bestellter Notar
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des(der)
Notars .

Bestätigt

- | | |
|---|------------------|
| 5. in Frankfurt/Main | 6. am 05.12.05 |
| 7. durch den Herrn Präsidenten des Landgerichts | |
| 8. unter Nr. 91 Ea A 9637 | |
| 9. Siegel/Stempel | 10. Unterschrift |

i.A. Simon



Registro Notarial Número 1529/2005

El suscrito Notario confirma que él preguntó a los participantes acerca de un eventual impedimento en el sentido del Artículo 3 inciso 1 frase 1 numeral 7 de la Ley de Notarización. La pregunta fue contestada negativamente.

Autentico oficialmente las firmas que aparecen anteriormente, las cuales fueron reconocidas en mi presencia el día de hoy como las suyas propias por

1. Apoderado Dr. Elmar-Michael Wein, domicilio Niedernhausen,
2. Apoderado Dieter Breuer, domicilio Frankfurt,

quienes son conocidos personalmente por el suscrito Notario.

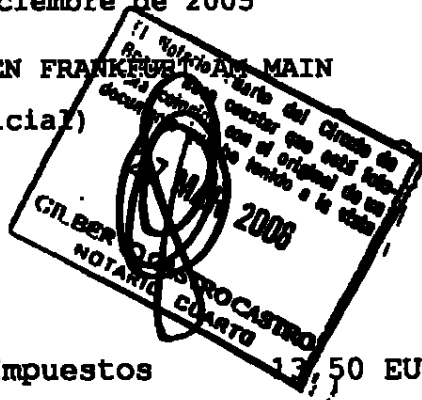
Al mismo tiempo confirmo que las personas señaladas en 1) y 2) se encuentran legalmente autorizados para firmar conjuntamente en nombre y representación de la compañía

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
domiciliada en Frankfurt am Main

según consta en la correspondiente entrada del Registro Comercial HRB 40661 del Juzgado Municipal de Frankfurt am Main que fue revisado por el Notario el día 10 de Octubre de 2005 o según consta en el poder que él ha tenido a la vista.

Frankfurt am Main, 01 de Diciembre de 2005

KLAUS PETER FRIEDRICH, NOTARIO EN FRANKFURT AM MAIN
(Firma y Sello Oficial)



Nota de gastos:

Valor del negocio: 10.000,-- EUROS

Impuesto Artículo 141, 32, 45 Disp. Impuestos

Impuesto Artículo 150 Disposición de Impuestos 13,-- EUROS

I.V.A. 16% 4,24 EUROS

Total: 30,74 EUROS

Klaus Peter Friedrich, Notario (Firma)

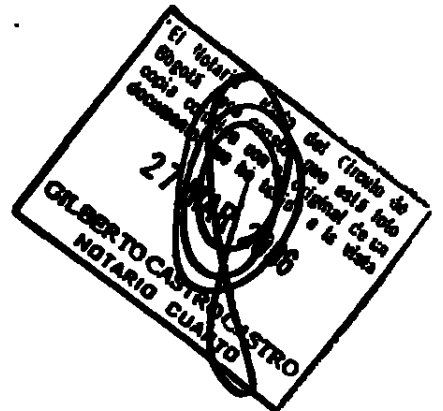
A
X**APOSTILLA**

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: República Federal de Alemania
Este documento público
2. Ha sido firmado por: Friedrich
3. En su calidad de: Notario nombrado oficialmente
4. Y lleva el sello oficial del: Notario

Confirmado

5. En: Frankfurt am Main
6. El día: 05.12.05
7. Por: El Señor Presidente del Tribunal Regional
8. Bajo el No.: 91 Ea A 9637
9. Sello: EL PRESIDENTE DEL TRIBUNAL REGIONAL
EN FRANKFURT AM MAIN
10. Firma: Por encargo: Simon



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Adolf Watzke".

ADOLF WATZKE
Traductor Oficial
Res. 2493 Minjusticia

El Gobierno de la República de Colombia
Bogotá, 27 de Mayo de 2006
27 Mayo 2006
GILBERTO CASTRO CASTRO
NOTARIO CUARTO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

400145
Adolfo Wetzke
CITA FIRMADA EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 DIC 31 P 12:03

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Mai 2005 (19.05.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/044803 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07D 223/10,
223/12, A61K 31/55, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/011244

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Oktober 2004 (08.10.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 49 669.6 24. Oktober 2003 (24.10.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 95929 Frankfurt
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFFMANN, Holger
[DE/DE]; Ernst-Ludwig-Strasse 5, 64646 Heppenheim
(DE). HAAG-RICHTER, Sabine [DE/DE]; Hammanstr.
2, 60322 Frankfurt (DE). KURZ, Michael [DE/DE];
Erlenweg 7, 65719 Hofheim (DE). TIETGEN, Helko
[DE/DE]; Karolinger Strasse 19, 55130 Mainz (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

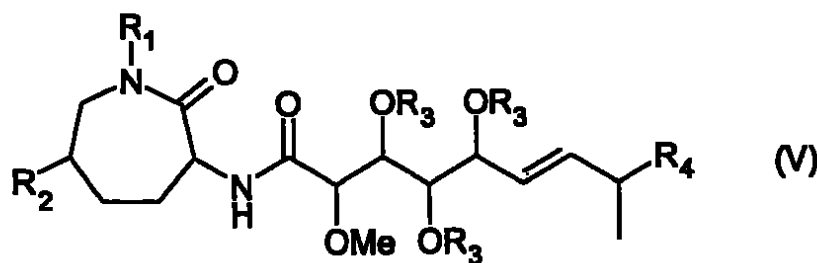
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchebericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: BENGAMIDE DERIVATIVES, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND USE THEREOF FOR THE
TREATMENT OF CANCER

(54) Bezeichnung: BENGAMIDE-DERIVATE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG ZUR
BEHANDLUNG VON KREBSERKRANKUNGEN



ST200611 (DSM15898).

(57) Abstract: The invention relates to
bengamide derivatives which are formed
by the micro-organism *Myxococcus*
virescens ST200611 (DSM 15898), during
fermentation, to the use thereof for the
treatment of cancer, to medicaments
containing bengamide derivatives, to a
method for the production of bengamides
of formula (V), in addition to the
micro-organism *Myxococcus virescens*

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Bengamide-Derivate, die von dem Mikroorganismus *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), während der Fermentation gebildet werden, ihre Verwendung zur Behandlung von Krebserkrankungen, Bengamide-Derivate enthaltende Arzneimittel, ein Verfahren zur Herstellung von Bengamiden der Formel (V), sowie den Mikroorganismus *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM15898).

WO 2005/044803 A1

BENZAMIDE-DERIVATE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG VON KREBSERKRANKUNGEN

Krebs ist eine zumelst tödlich verlaufende Erkrankung von Mensch und Tier, die durch das unkontrollierte Wachsen von körpereigenen Zellen verursacht wird. Krebs ist die

5 Bezeichnung für die Bildung von bösartigen Geschwülsten (Malignome), von Neoplasmen (Tumoren bzw. Carcinoma) oder für die maligne Entartung sowie Reifungsstörung weißer Blutzellen (Leukämie, Blutkrebs). Krebs- oder Tumorzellen entstehen durch Umwandlung körpereigener Zellen. Die Bösartigkeit der Krebszelle drückt sich in der Autonomie des Wachstums aus, das heißt in ihrer Fähigkeit,

10 ungehemmt und ohne Einordnung in den Bauplan der Organe und unter Gewebszerstörung infiltrierend zu wachsen. Ein sicheres Zeichen der Malignität ist die Bildung tumorfermer Absiedlungen (Metastasen) nach hämatogener oder lymphogener Ausbreitung von Tumorzellen. Krebs gehört zu den häufigsten Todesursachen des Menschen und deshalb besteht ein großer Bedarf an Methoden und Mitteln zur

15 Heilung oder Behandlung von malignen Entartungen.

Die Möglichkeit einer Therapie maligner Tumoren umfasst neben der – wenn möglich radikalen – operativen Entfernung des Tumors, die radiologische Therapie mit Röntgenstrahlen, α -, β -, γ -Strahlen, die Immuntherapie und die Chemotherapie. Die

20 Immuntherapie ist derzeit nur in eingeschränktem Maß anwendbar. Unter der Chemotherapie von Tumoren versteht man die Gabe von Zellgiften (Cytostatika) zur Behandlung von Tumoren und von verbliebenen Tumorzellen zumeist nach lokaler chirurgischer Behandlung oder Bestrahlung. Diese Stoffe greifen spezifisch in bestimmte Vorgänge der Zellteilung ein, so dass Gewebe mit hohem Anteil an sich

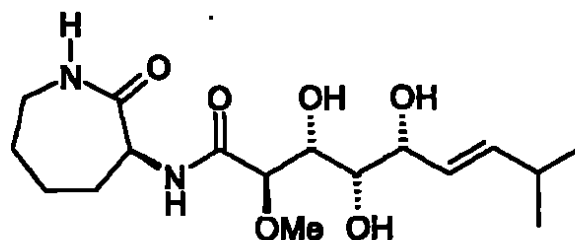
25 teilenden Zellen, wie das rasch wachsende Tumorgewebe, empfindlicher reagieren. Zum Einsatz kommen alkylierende Verbindungen, wie z. B. das Cyclophosphamid, Antimetabolite, wie das Methotrexat, Alkaloide, wie das Vincristin und Antibiotika, wie das Daunomycin oder das Adriamycin. All diese Agenzien haben aber aufgrund von massiven Nebenwirkungen große Nachteile, so dass der Tod der Erkrankten nur

30 hinausgezögert, nicht jedoch abgewendet wird. Zudem treten bei entarteten (Krebs-) Zellen Resistenzen gegen die angewandten Mittel auf, die derzeitigen Medikamente wirken dann nicht mehr cytostatisch, wohl aber toxisch infolge der Nebenwirkungen.

Zudem hat sich gezeigt, dass eine kombinierte bzw. sequentielle Anwendung von Cytostatika die Wirksamkeit eines einzelnen Cytostatikums (Monotherapie) übertrifft und dadurch möglich ist, dass sich die erheblichen Nebeneffekte bei der Polychemotherapie nicht addieren. Aus all diesen Gründen werden neue Chemotherapeutika dringend benötigt und deshalb weltweit gesucht.

Als erste Beispiele der Bengamide wurden die am Caprolactamring dodecanoyl-substituierten Bengamide A und B aus dem Meeresschwamm *Jaspis cf. Coriacea* (Familie *Coppatidae*, Ordnung *Choristida* B *Astrophorida*) isoliert (Adamczewski et al., J. Org. Chem. 1986, 51, 4497-4498) und als biotoxisch gegen eukaryotische Zellen, Nematoden und Bakterien beschrieben.

Beispiele für Bengamide-Derivate, bei denen eine Antitumoraktivität nachgewiesen wurde, sind das Bengamide E



und dessen N-methyliertes Derivat Bengamide F. Bengamide E hemmt die Zellproliferation dadurch, dass die Zellteilung am G1/S Restriktionspunkt und in der G2/M Phase des Zell-Zyklus gestoppt wird. Bengamide B Derivate hemmen die Zellproliferation von MDA-MB-435 Brustkrebszellen (Kinder et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 3692-3699).

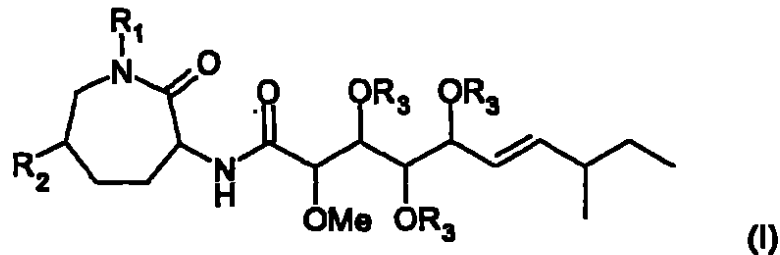
Den bekannten Bengamide-Derivaten ist gemeinsam, dass sie aus Meeresschwämmen der Gattung *Jaspis* sp. oder *Pachastrissa* sp. isoliert wurden (Thale et al., J. Org. Chem. 2001, 66, 1733-1741).

Es wurde nun gefunden, dass der Mikroorganismus-Stamm *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), neuartige Bengamide-Derivate zu bilden vermag, die die Zellproliferation in geringen Konzentrationen hemmen und demzufolge für die

3

Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebserkrankungen geeignet sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel (I),



wobei

- 5 R_1 H oder (C₁-C₆)-Alkyl,
 R_2 H oder OH, und
 R_3 H oder -C(=O)-(C₁-C₆)-Alkyl bedeutet,
 oder ein physiologisch verträgliches Salz einer Verbindung der Formel (I).
- 10 Unabhängig voneinander ist R_1 vorzugsweise H oder Methyl, und R_3 vorzugsweise H.

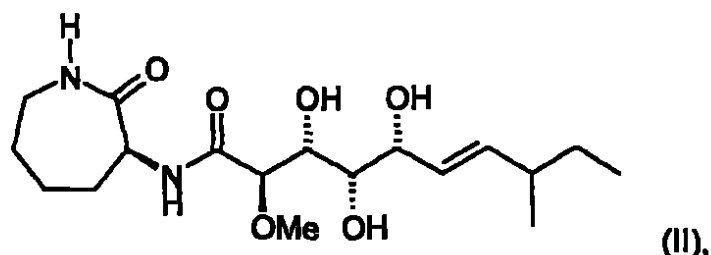
Bevorzugt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (I), worin

- R_1 H oder Methyl,
 R_2 H oder OH, und
 15 R_3 H bedeutet.

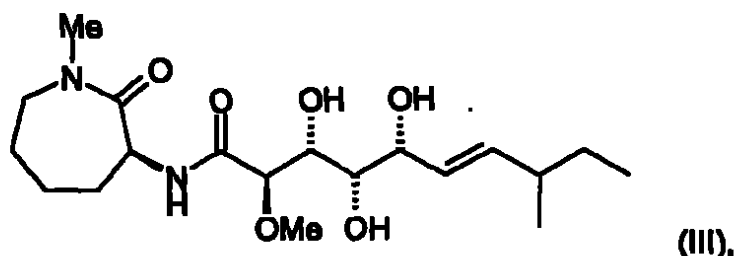
(C₁-C₆)-Alkyl bedeutet eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 6 Kohlenstoffatomen, beispielsweise Methyl (Me), Ethyl, n-Propyl, Iso-Propyl, tert-Butyl oder n-Hexyl, vorzugsweise Methyl.

20

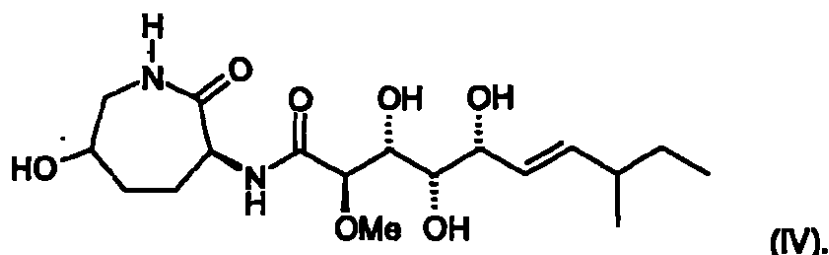
Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel (I) gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (II),



eine Verbindung der Formel (III)



und eine Verbindung der Formel (IV)

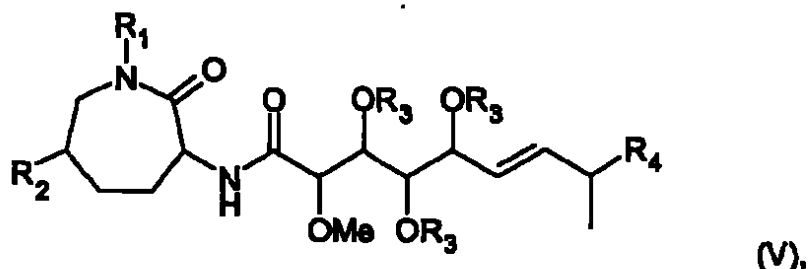


5

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin alle offensichtlichen chemischen Äquivalenten der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I). Solche Äquivalente sind Verbindungen, die einen geringfügigen chemischen Unterschied aufweisen, und die gleiche pharmakologische Wirkung haben oder sich unter milden Bedingungen in die erfindungsgemäßen Verbindungen umwandeln. Zu den genannten Äquivalenten gehören z.B. auch Salze, Reduktionsprodukte, Oxidationsprodukte, Ester, Ether, Acetale oder Amide der Verbindungen der Formel (I) sowie Äquivalente die der Fachmann mit Standardmethoden herstellen kann, darüber hinaus alle optische Antipoden, Diastereomere und alle stereoisomeren Formen.

15

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (V),



wobei

20 R₁ H oder (C₁-C₆)-Alkyl,

R₂ H oder OH,

R₃ H oder -C(=O)-(C₁-C₆)-Alkyl, und

R₄ Methyl oder Ethyl bedeutet,

oder eines physiologisch verträglichen Salzes einer Verbindung der Formel (V),

5

dadurch gekennzeichnet, dass

1. der Stamm *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) oder einer seiner Varianten und/oder Mutanten unter geeigneten Bedingungen in einem Kulturmedium fermentiert wird, bis sich eine oder mehrere der Verbindungen der Formel (V) in dem Kulturmedium anhäuft,
 - 10 2. eine Verbindung der Formel (V) aus dem Kulturmedium isoliert wird, und
 3. die Verbindung der Formel (V) gegebenenfalls derivatisiert und/oder gegebenenfalls in ein physiologisch verträgliches Salz umgewandelt wird.
- 15 Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (V), wobei R₄ gleich Ethyl ist. Das Produkt eines solchen Verfahrens entspricht einer Verbindung der Formel (I) wie oben beschrieben.

- Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer
- 20 Verbindung der Formel (V), wobei unabhängig voneinander R₁ H oder Methyl, R₃ H, und R₄ Ethyl bedeutet.

- Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (II), einer Verbindung der Formel (III), einer Verbindung der Formel (IV), sowie
- 25 der Bengamide-Derivate E und F.

- Chiralitätszentren in den Verbindungen der (I) und (V) können, wenn nicht anders angegeben, in der R- oder in der S-Konfiguration vorliegen. Die Erfindung betrifft sowohl die optisch reinen Verbindungen als auch Stereoisomerengemische wie
- 30 Enantiomerengemische und Diastereomerengemische.

Unter physiologisch verträglichen Salzen von Verbindungen der Formel (I) und (V)

- versteht man sowohl deren organische als auch anorganische Salze, wie sie in Remington's Pharmaceutical Sciences (17. Auflage, Seite 1418 (1985)) beschrieben sind. Aufgrund der physikalischen und chemischen Stabilität und der Löslichkeit sind für saure Gruppen unter anderem Natrium-, Kalium-, Calcium- und Ammoniumsalze bevorzugt; für basische Gruppen sind unter anderem Salze der Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder von Carbonsäuren oder Sulfonsäuren, wie z.B. Essigsäure, Zitronensäure, Benzoesäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Weinsäure und p-Toluolsulfonsäure bevorzugt.
- 10 Das Kulturmedium ist eine Nährlösung oder ein Festmedium mit mindestens einer üblichen Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie den üblichen anorganischen Salzen. Wird dem Kulturmedium Hydroxylysin zugesetzt, produziert der Stamm *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) durch Verdau von Hydroxylysin eine Verbindung der Formel (V), in der R₂ gleich OH ist.
- 15 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (V) wie oben beschrieben, wobei R₂ gleich OH ist, und wobei das Kulturmedium in Schritt 1 Hydroxylysin enthält.
- 20 Das erfindungsgemäße Verfahren kann für die Fermentation im Labormaßstab (Milliliter- bis Litermaßstab) und für den industriellen Maßstab (Kubikmetermaßstab) eingesetzt werden.
- 25 Als Kohlenstoffquellen für die Fermentation eignen sich assimilierbare Kohlenhydrate und Zuckeralkohole, wie Glukose, Laktose, Saccharose oder D-Mannit sowie kohlenhydrathaltige Naturprodukte, wie z.B. Malzextrakt oder Hefextrakt. Stickstoffhaltige Nährstoffe sind beispielsweise Aminosäuren; Peptide und Proteine sowie deren Abbauprodukte, beispielsweise Casein, Peptone oder Tryptone; Fleischextrakte; Hefeextrakte; Gluten; gemahlene Samen, beispielsweise von Mais, Weizen, Bohnen, Soja oder der Baumwollpflanze; Destillationsrückstände der Alkoholherstellung; Fleischmehle; Hefeextrakte; Ammoniumsalze; Nitrate.
- 30 Vorzugsweise ist die Stickstoffquelle ein oder mehrere synthetisch bzw. biosynthetisch

gewonnene Peptide. Anorganische Salze sind beispielsweise Chloride, Carbonate, Sulfate oder Phosphate der Alkali- oder Erdalkalimetalle, Eisen, Zink, Kobalt und Mangan enthalten. Spurenelemente sind beispielsweise Kobalt und Mangan.

- 5 Geeignete Bedingungen für die Bildung der erfindungsgemäßen Bengamide sind wie folgt: Die Bildung der erfindungsgemäßen Bengamide verläuft bevorzugt in einem Kulturmedium, die 0.05 bis 5 %, bevorzugt 0.1 bis 2.5% Hefextrakt; 0.2 bis 5.0%, bevorzugt 0,1 bis 2 % Casitone; 0.02 bis 1.0%, bevorzugt 0.05 bis 0.5 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.02 bis 1.5%, bevorzugt 0.05 bis 0.7% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ sowie 0.00001% bis
- 10 0.001% Cyanocobalamin enthält. Die Angaben in Prozent sind jeweils bezogen auf das Gewicht der gesamten Nährlösung.

- Die Kultivierung des Mikroorganismus erfolgt aerob, also beispielsweise submers unter Schütteln oder Rühren in Schüttelkolben oder Fermentern oder auf Festmedium,
- 15 gegebenenfalls unter Einführen von Luft oder Sauerstoff. Sie kann in einem Temperaturbereich von etwa 18 bis 35°C, vorzugsweise bei etwa 20 bis 32°C, insbesondere bei 27 bis 30°C durchgeführt werden. Der pH-Bereich sollte zwischen 4 und 10 liegen, vorzugsweise zwischen 6.5 und 7.5. Man kultiviert den Mikroorganismus unter diesen Bedingungen im allgemeinen über einen Zeitraum von
- 20 2 bis 10 Tagen, vorzugsweise 72 bis 168 Stunden. Vorteilhaft kultiviert man in mehreren Stufen, d. h. man stellt zunächst eine oder mehrere Vorkulturen in einem flüssigen Nährmedium her, die dann in das eigentliche Produktionsmedium, die Hauptkultur, beispielsweise im Volumenverhältnis 1:10 bis 1:100, überimpft werden. Die Vorkultur erhält man z. B., indem man den Stamm in Form von vegetativen Zellen
- 25 oder Fruchtkörpern in eine Nährlösung überimpft und etwa 20 bis 120 Stunden, bevorzugt 48 bis 96 Stunden, wachsen lässt. Vegetative Zellen und/oder Fruchtkörper können beispielsweise erhalten werden, indem man den Stamm etwa 1 bis 15 Tage, bevorzugt 4 bis 10 Tage, auf einem festen oder flüssigen Nährboden, beispielsweise Hefeagar wachsen lässt.

30

Die Isolierung bzw. Aufreinigung eines Bengamide-Derivates der Formel (V) aus dem Kulturmedium erfolgt nach bekannten Methoden unter Berücksichtigung der

chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der Naturstoffe. Zum Testen der Konzentration der jeweiligen Bengamide-Derivate im Kulturmedium oder in den einzelnen Isolierungsstufen wurde HPLC verwendet, wobei die Menge der gebildeten Substanz zweckmäßig mit einer Eichlösung verglichen wurde.

5

Zur Isolierung werden die Kulturbrühe oder die Kultur samt Festmedium lyophilisiert, anschließend werden die Bengamide-Derivate vom Lyophilisat mit einem organischen Lösungsmittel, beispielsweise Methanol oder 2-Propanol extrahiert. Die organische Lösungsmittelphase enthält die erfindungsgemäßen Naturstoffe, sie wird

10 gegebenfalls im Vakuum konzentriert und weiter aufgereinigt.

Die weitere Aufreinigung einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Verbindungen erfolgt durch Chromatographie an geeigneten Materialien, vorzugsweise z. B. an Molekularsieben, an Kieselgel, Aluminiumoxid, an Ionenaustauschern oder an

15 Adsorberharzen bzw. an Umkehrphasen (reversed phase, RP). Mit Hilfe dieser Chromatographie werden die Bengamide-Derivate getrennt. Die Chromatographie der Bengamide-Derivate erfolgt mit gepufferten wässrigen Lösungen oder Gemischen von wässrigen und organischen Lösungen.

20 Unter Gemischen von wässrigen oder organischen Lösungen versteht man alle mit Wasser mischbaren organischen Lösemittel, vorzugsweise Methanol, 2-Propanol und Acetonitril, in einer Konzentration von 5 bis 95 % Lösemittel, vorzugsweise 5 bis 40 % Lösemittel oder auch alle gepufferten wässrigen Lösungen, die mit organischen Lösemitteln mischbar sind. Die zu verwendenden Puffer sind die gleichen wie oben
25 angegeben.

30 Die Trennung der Bengamide-Derivate aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität erfolgt mit Hilfe der Reversed Phase Chromatographie, beispielsweise an MCI® (Adsorberharz von Mitsubishi, Japan) oder Amberlite XAD® (TOSOHAAAS), oder an weiteren hydrophoben Materialien, wie zum Beispiel an RP-8- oder RP-18-Phasen. Außerdem kann die Trennung mit Hilfe der Normalphasen-Chromatographie, zum Beispiel an Kieselgel, Aluminiumoxid und ähnlichen erfolgen.

Die Chromatographie der Bengamide-Derivate erfolgt mit gepufferten, basischen oder angesäuerten wässrigen Lösungen oder Gemischen von wässrigen Lösungen mit Alkoholen oder anderen, mit Wasser mischbaren organischen Lösemitteln. Als organisches Lösemittel wird vorzugsweise Acetonitril und Methanol verwendet.

5

Unter gepufferten, basischen oder angesäuerten wässrigen Lösungen versteht man z.B. Wasser, Phosphatpuffer, Ammoniumacetat, Citratpuffer in einer Konzentration von bis zu 0,5 M sowie Ameisensäure, Essigsäure, Trifluoressigsäure, Ammoniak, Triethylamin oder allen handelsüblichen, dem Fachmann bekannten Säuren und

10 Basen, vorzugsweise in einer Konzentration von bis zu 1 %. Bei gepufferten wässrigen Lösungen wird 0,1 % Ammoniumacetat besonders bevorzugt.

Chromatographiert wurde mit einem Gradienten, der mit 100 % Wasser begann und mit 100 % Lösemittel endete, vorzugsweise wurde ein linearer Gradient von 5 bis 95 %

15 Acetonitril gefahren.

Alternativ kann auch eine Gelchromatographie oder die Chromatographie an hydrophoben Phasen erfolgen. Die Gelchromatographie wird an Polyacrylamid- oder Mischpolymergelen durchgeführt, wie z.B. Biogel-P 20 (Biorad) oder Fractogel
20 TSK HW 400 (Merck, Deutschland). Die Reihenfolge der vorgenannten Chromatographien ist umkehrbar.

Sofem Bengamide als Diastereomere vorliegen, können diese über bekannte Methoden getrennt werden, beispielsweise durch Trennung über eine chirale Säule.

25

Die Derivatisierung der OH-Gruppen in der Seitenkette der Verbindungen der Formeln (I) bzw. (V) (R_3 jeweils gleich H) zu einer Acylgruppe (R_4 jeweils gleich $-C(=O)-(C_1-C_6)\text{-Alkyl}$) erfolgt nach ansich bekannten Methoden (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4th Edition, 1992), beispielsweise durch
30 Umsetzung mit einem Säureanhydrid. Die Umsetzung mit Acetanhydrid zu einer Verbindung der Formel (I) bzw. (V), in der $R_3 -C(=O)-CH_3$ bedeutet, beschreibt beispielsweise Adamczeski et al., J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 647-654.

Die Alkylierung der NH-Gruppe im Caprolactamring einer Verbindung der Formel (I) oder (V) (R_1 jeweils gleich H) erfolgt ebenfalls nach ansich bekannten Methoden (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4th Edition, 1992), beispielsweise durch Reaktion mit Me_2CO_3 oder Me_2SO_4 zur Herstellung der entsprechenden N-methylierten Derivate, oder durch Reaktion mit (C₁-C₆)-Alkylbromid in Gegenwart einer Base.

Ein Isolat des Mikroorganismenstammes *Myxococcus virescens* ST200611 wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Deutschland, nach den Regeln des Budapester Vertrages am 11.09.2003 unter der folgenden Nummer hinterlegt: DSM 15898.

Die vegetativen Zellen des Stammes DSM 15898 haben die für *Myxococcus virescens* charakteristische Stäbchenform. Auf festen Nährböden bildet *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) orange-gelbe Fruchtkörper, welche runde Myxosporen enthalten.

Anstelle des Stammes *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) können auch dessen Mutanten und/oder Varianten eingesetzt werden, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Verbindungen synthetisieren.

Eine Mutante ist ein Mikroorganismus, in dem ein oder mehrere Gene des Genoms modifiziert wurden, wobei das Gen oder die Gene funktionell und vererbbar erhalten bleiben, die für die Fähigkeit des Organismus verantwortlich sind, die erfinderische Verbindung zu produzieren.

Solche Mutanten können in an sich bekannter Weise durch physikalische Mittel, beispielsweise Bestrahlung, wie mit Ultraviolett- oder Röntgenstrahlen, oder chemische Mutagene, wie beispielsweise Ethylmethansulfonat (EMS); 2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon (MOB) oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) erzeugt werden, oder wie von Brock et al. in "Biology of Microorganism", Prentice Hall,

Seite 238-247 (1984) beschrieben.

Eine Variante ist ein Phenotyp des Mikroorganismus. Mikroorganismen haben die Fähigkeit, sich an ihre Umgebung anzupassen und zeigen daher ausgeprägte physiologische Flexibilität. Bei der phenotypischen Anpassung sind alle Zellen des Mikroorganismus involviert, wobei die Art der Veränderung nicht genetisch konditioniert ist und unter veränderten Bedingungen reversibel ist (H. Stolp, *Microbial ecology: organisms, habitats, activities*. Cambridge University Press, Cambridge, GB, Seite 180, 1988).

10

Das Screening nach Mutanten und/oder Varianten, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Verbindungen synthetisieren, erfolgt nach folgendem Schema:

- Lyophilisierung des Fermentationsmediums;
- Extraktion des Lyophilisats mit einem organischen Lösungsmittel
- 15 - Extraktion der Verbindung aus dem Kulturfiltrat mit Festphasen
- Analytik mittels HPLC, DC oder durch Testen der biologischen Wirksamkeit.

Die beschriebenen Fermentationsbedingungen gelten für *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) sowie für Mutanten und/oder Varianten davon.

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung des Mikroorganismus *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) oder einer Mutante und/oder Variante zur Herstellung einer Verbindung der Formel (V), insbesondere einer Verbindung der Formel (IV), oder eines physiologisch verträglichen Salzes davon, wie oben beschrieben.

25

Zum Nachweis der Hemmung der Zellproliferation bedient man sich eines Testes, der auf der Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration beruht. Verwendet werden können bekannte Tumor-Zelllinien wie beispielsweise Hep-G2 und Colo205. In diesem Test dient der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen dabei in einer Luciferasereaktion als Maß für die Zahl lebender Zellen.

30

Die Verbindungen der Formel (II)-(VI) wurden in einer Einzeldosis von 0.3 – 40 μ M im Test eingesetzt und eine Dosisabhängigkeit als TC50-Wert angegeben, wobei (IIA) und (IIB) jeweils eine Diastereomer der Verbindung der Formel (II) bedeuten:

Tabelle 1: Wirksamkeit der Bengamide im Zellproliferationstest als TC50-Wert in μ M		
Verbindung	Hep-G2	Colo 205
(II)	16	27
(IIA)	17	33
(IIB)	6	10
(III)	9	15
(IV)	>40	42
Bengamide E	36	46
Bengamide F	27	33

5

Gegenstand der Erfindung ist daher ferner die Verwendung der Verbindung der Formel (I) oder eines physiologisch verträglichen Salzes derselben als Arzneimittel in der Human- oder Tiermedizin, insbesondere zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebserkrankungen. Vorzugsweise betrifft die Erfindung die Verwendung einer Verbindung der Formel (I) oder eines physiologisch verträglichen Salzes zur Behandlung von Brustkrebs, Darmkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs, Gehirntumoren, Ovarialtumoren, Speiseröhrenkrebs, Nierenkrebs, Muskelzellkarzinom, insbesondere Kopf- und Nackenmuskelkarzinom.

10

15

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel mit einem Gehalt an mindestens einer Verbindung der Formel (I) oder eines physiologisch verträglichen Salzes davon, wobei die Verbindung oder die Verbindungen der Formel (I) als solche in Substanz verabreicht werden kann oder bevorzugt in Mischung mit einem oder mehreren der üblichen pharmakologisch geeigneten Träger- oder Hilfsstoffen vorliegen.

20

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind im festen Zustand und in Lösungen im

pH-Bereich zwischen 2 und 9, insbesondere 5 und 7, stabil und lassen sich damit in übliche galenische Zubereitungen einarbeiten.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können oral oder parenteral verabreicht werden, aber auch eine rektale Anwendung ist prinzipiell möglich. Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Tabletten, Dragees, (Mikro-)Kapseln, Zäpfchen, Sirupe, Emulsionen, Suspensionen, Aerosole, Tropfen oder injizierbare Lösungen in Ampullenform sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung üblicherweise pharmakologisch geeignete Träger- oder Hilfsstoffe wie Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel oder Lösungsvermittler Verwendung finden, beispielsweise Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Vitamine, Cellulose und ihre Derivate, tierische oder pflanzliche Öle, Polyethylenglykole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser, Alkohole, Glycerin und mehrwertige Alkohole.

Gegebenenfalls können die Dosierungseinheiten für die orale Verabreichung mikroverkapselt werden, um die Abgabe zu verzögern oder über einen längeren Zeitraum auszudehnen, wie beispielsweise durch Überziehen oder Einbetten des Wirkstoffs in Teilchenform in geeignete Polymere, Wachse oder dergleichen.

Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine bestimmte Dosis einer oder mehrerer Verbindungen der Bengamide-Derivate der Formel (I) enthält. Bei festen Dosierungseinheiten wie Tabletten, Kapseln und Suppositorien kann diese Dosis bis zu etwa 500 mg, bevorzugt jedoch etwa 0.1 bis 200 mg, und bei Injektionslösungen in Ampullenform bis zu etwa 200 mg, vorzugsweise aber etwa 0.5 bis 100 mg, pro Tag betragen.

Die zu verabreichende Tagesdosis ist abhängig vom Körpergewicht, Alter, Geschlecht und Zustand des Säugers. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Tagesdosen angebracht sein. Die Verabreichung der Tagesdosis kann

sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber in mehreren kleineren Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden dadurch hergestellt, dass man ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) optional mit einem oder mehreren der üblichen Träger- oder Hilfsstoffe sowie in eine geeignete Darreichungsform bringt.
- 10 Die folgenden Beispiele sollen der näheren Erläuterung der Erfindung dienen, ohne die Breite der Erfindung in irgendeiner Weise zu begrenzen.

Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, beziehen sich Prozentangaben auf das Gewicht, und Mischungsverhältnisse bei Flüssigkeiten auf das Volumen.

15

Beispiel 1: Einlagerung bei -135°C von *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898)

- 20 Eine Agarplatte (1% frische Bäckerhefe, 1% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM HEPES, 0.00005% Cyanocobalamin, 1.5% Agar, pH 7.2) wird mit dem Stamm *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), beimpft und ca. 7 Tage bei 30°C inkubiert. Die Zellen dieser Oberflächenkultur werden mit einem sterilen Spatel von der Agaroberfläche gekratzt, in 0.5 ml Castonemedium (1% Castone (Difco), 0.15% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0) resuspendiert und bei -135°C gelagert.

25

Beispiel 2: Herstellung einer Vorkultur im Erlenmeyerkolben von *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898)

- 30 100 ml Nährlösung (1% frische Bäckerhefe, 1% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM HEPES, 0.00005% Cyanocobalamin, pH 7.2) in einem sterilen 300 ml Erlenmeyerkolben werden mit dem Stamm *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), beimpft und 4 Tage bei 30°C und 180 UpM auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. 5 ml

dieser Vorkultur werden anschließend für die Herstellung der Hauptkulturen verwendet.

Beispiel 3: Herstellung einer flüssigen Hauptkultur *Myxococcus virescens* ST200611
5 (DSM 15898)

Ein steriler 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml der folgenden Nährlösung (0.5% Hefeextrakt, 0.5% Casitone, 0.1% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00005% Cyanocobalamin, pH 7.4) wird mit 5 ml einer Vorkultur (s. Beispiel 2) oder einer auf
10 einer frischen Agarplatte gewachsenen Kultur (1% frische Bäckerhefe, 1% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 20mM HEPES, 0.00005% Cyanocobalamin, pH 7.2, zusätzlich 1.5% Agar) beimpft und auf einer Schüttelmaschine bei 180 UpM und 30° C inkubiert. Die maximale Produktion der erfindungsgemäßen Bengamide ist nach 72-96 Stunden erreicht. Zum Animpfen von 10 bis 200 L Fermentern genügt eine 72-96 Stunden alte
15 Submerskultur (Animpfmenge ca. 5–10%) aus der gleichen Nährlösung wie in Beispiel 2 beschrieben.

Beispiel 4: Herstellung einer flüssigen Hauptkultur *Myxococcus virescens* ST200611
(DSM 15898) unter Verfütterung von Hydroxylysin zur Produktion des Bengamid-
20 Derivates (IV)

Ein steriler 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml der folgenden Nährlösung (0.5% Hefeextrakt, 0.5% Casitone, 0.1% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00005% Cyanocobalamin, sowie 1 mM Hydroxylysin pH 7.4) wird mit 5 ml einer Vorkultur aus
25 Beispiel 2 oder einer auf einer frischen Agarplatte gewachsenen Kultur (1% frische Bäckerhefe, 1% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM HEPES, 0.00005% Cyanocobalamin, pH 7.2, zusätzlich 1.5% Agar) beimpft und auf einer Schüttelmaschine bei 180 UpM und 30°C inkubiert. Die maximale Produktion des Bengamide Derivates (IV) ist nach 72-96 Stunden erreicht. Die Analytik erfolgte mittel HPLC-MS. Zum Animpfen von 10 bis 200
30 L Fermentern genügt eine 72-96 Stunden alte Submerskultur (Animpfmenge ca. 5–10%) aus der gleichen Nährlösung wie in Beispiel 2 beschrieben.

Beispiel 5: Herstellung von Bengamid-Derivaten im Fermenter

Die 10 L und 30 L Fermenter wurden unter folgenden Bedingungen betrieben:

5	Inokulum:	ca. 5%	ca. 9%
	Fermenter:	30 L	10 L
	Nährmedium:	siehe Beispiel 2	siehe Beispiel 2
	Inkubationstemperatur:	30°C	30°C
	Rührergeschwindigkeit:	112 UpM	150 UpM
10	Belüftung:	8 L/Min	4 L/min
	pH Regulierung:	ab pH 7.8 auf pH 7.5	ab pH 8.1 auf pH 7.5
	pO ₂ Regulierung:	keine	keine

Die pH Regulierung wurde immer mit 10% KOH, bzw. 10% H₂SO₄ durchgeführt.

- 15 Durch wiederholte Zugabe von Clerol FBA 265 (Cognis Deutschland GmbH) kann die Schaumbildung unterdrückt werden. Das Produktionsmaximum wird nach ca. 72 bis 96 Stunden erreicht.

- 20 **Beispiel 6: Isolierung der Bengamide-Derivate (II) und (III), sowie der Bengamide E und F aus den Schüttelkulturen von *Myxococcus virascens* ST200611 (DSM 15898)**

- Nach Beendigung der Fermentation *Myxococcus virascens* ST200611 (DSM 15898) wurde die Kulturbrühe aus Beispiel 3 (30 L Kulturbrühe) mitsamt der Biomasse lyophilisiert und das Lyophilisat mit Methanol (2 x 5 L) extrahiert. Der Methanolextrakt
- 25 wurde am Vakuum auf 1.2 L reduziert und anschließend auf eine vorbereitete Säule aufgetragen, die mit ca. 1.5 Liter CHP-20P Material (MCI® Gel, 75-150µ, Mitsubishi Chemical Corporation) gefüllt war. Eluiert wurde mit 95% Methanol. Der Säulendurchfluss (120 ml/min) wurde aufgefangen und im Vakuum auf ein Volumen 1.5 L reduziert.

30

- Beispiel 7: Vortrennung der Bengamide-Derivate (II) und (III), sowie der Bengamide E und F durch RP-18 Chromatographie**

1.5 L der nach Beispiel 6 gewonnenen Lösung wurde auf eine Phenomenex Luna® 10 µm C18 (2) Säule (Größe: 50 mm x 250 mm) mit Vorsäule Luna® 10 µm C18 (2) (Dimension: 21.2 mm x 60 mm) aufgetragen und mit einem Gradienten von 5% bis 95% Acetonitril in Wasser über 60 min eluiert (0.1 % Ammoniumacetat, pH 4.6 eingestellt mit Essigsäure). Der Durchfluss betrug 150 ml/min, die Fraktionsgröße 200 ml. Bengamide befanden sich in den Fraktionen 5-9, 10-11 und 12-14.

Beispiel 8: Reinigung der Bengamide-Derivate (II) und (III), sowie der Bengamide E und F

10

Die einzelnen Fraktionen aus Beispiel 7 wurden lyophilisiert und nochmals mittels HPLC an einer Phenomenex Luna® 10 µm C18 (2) Säule (Dimension: 21 mm x 250 mm) mit Vorsäule XTerra® Prep MS C18 10 µm (Waters, Dimension: 19 x 10 mm) aufgereinigt. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 5% nach 40% Acetonitril in Wasser über 40 min (mit Zusatz von 0.1% Ammoniumacetat, pH 8.8 eingestellt mit Triethylamin). Der Säulendurchfluss (50 ml/min) wurde fraktioniert aufgefangen (je 7,5 ml Fraktionen). Fraktion 5-9 aus Beispiel 7 enthielt die Verbindung der Formel (III) und ergab nach Chromatographie und Lyophilisieren 86 mg Bengamid E (Reinheit > 95%). Die Fraktion 10-11 aus Beispiel 7 ergab nach Chromatographie 145 mg Bengamid (II) (Reinheit > 95%, Diastereomeren-Gemisch 70/30) und 5 mg Bengamid F (Reinheit > 95%). Aus der Fraktion 12-14 aus Beispiel 7 wurden 35 mg Bengamid (III) (Reinheit > 95%) als Diastereomeren-Gemisch im Verhältnis 75:25 erhalten. Bei den Diastereomeren handelt es sich jeweils um die entsprechenden C-16 Epimere.

25 Beispiel 9: Isolierung des Hydroxy-Bengamides (IV) aus den Schüttelkulturen von *Myxococcus virescens* ST200811 (DSM 15898)

Nach Beendigung der Fermentation *Myxococcus virescens* ST200811 (DSM 15898) wurde die Kulturbrühe aus Beispiel 5 (10 L Kulturbrühe) mitsamt der Biomasse lyophilisiert und das Lyophilisat mit Methanol (2 x 3 L) extrahiert. Der Methanolextrakt wurde am Vakuum auf 400 ml reduziert und anschließend auf eine vorbereitete Säule aufgetragen, die mit 0.6 Liter CHP-20P (MCI Gel, 75-150 µm, Mitsubishi Chemical

30

Corporation) Material gefüllt war. Eluiert wurde mit 5% bis 95% Methanol in Wasser. Der Säulendurchfluss (100 ml/min) wurde über 60 min fraktioniert aufgefangen (0.5 min pro Fraktion). Die das gewünschte Derivat enthaltenden Fraktionen (Fraktion 45-109) wurden zusammengefasst und im Vakuum auf ein Volumen von 700 ml reduziert.

5

Beispiel 10: Vorreinigung des Hydroxy-Bengamides (IV) durch RP-18 Chromatographie

Die Lösung aus Beispiel 9 wurde anschließend auf eine Phenomenex Luna® 10µ C18 (2) Säule (Größe: 50 mm x 250 mm) mit Vorsäule Phenomenex Luna® 10µ C18 (2) (Dimension: 21.2 mm x 60 mm) aufgetragen und mit einem Gradienten von 5% bis 40% Acetonitril in Wasser über 60 min eluiert (0.1% Ammoniumacetat, pH 8.8 eingestellt mit Triethylamin). Der Durchfluss betrug 150 ml/min, die Fraktionsgröße 225 ml. Fraktion 22 enthielt das gewünschte Bengamide-Derivat.

15

Beispiel 11: Reinigung des Hydroxy-Bengamides (IV)

Fraktion 22 aus Beispiel 10 wurde lyophilisiert und nochmals mittels HPLC an einer Phenomenex Luna® 10 µm C18 (2) Säule (Dimension: 21 mm x 250 mm) mit Vorsäule Waters XTerra® Prep MS C18 10 µm (Dimension: 19 x 10 mm) aufgereinigt. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 5 % nach 95% Acetonitril in Wasser über 60 min (mit Zusatz von 0.1% Ammoniumacetat, pH 4.6 eingestellt mit Essigsäure). Der Säulendurchfluss (50 ml/min) wurde fraktioniert aufgefangen (je 7,5 ml Fraktionen). Die Bengamide-haltigen Fraktionen (Fraktion 26-28) wurden vereinigt, entsalzt und gefriergetrocknet. Dabei wurden 7 mg Bengamide (IV) als Diastereomeren-Gemisch im Verhältnis 75:25 erhalten.

25

Beispiel 12: Charakterisierung der Verbindung der Formel (II)

30 Summenformel: C₁₈H₃₂N₂O₆
Molekulargewicht: 372,47
Diastereomeren-Gemisch: 75:25

19

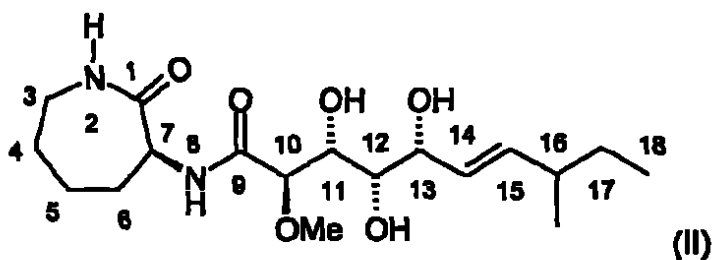


Tabelle 2: NMR-chemische Verschiebungen von Bengamide (II), Diastereomergemisch, c = 3 mg/ml in DMSO, 300 K.

Position	¹ H	¹³ C
1	-	173.99
2	7.91	-
3	3.19/3.06	40.56
4	1.74/1.20	28.75
5	1.87/1.64	27.55
6	1.87/1.36	30.72
7	4.39	51.27
8	7.76	-
9	-	169.61
10	3.69	81.60
10-OMe	3.25	57.32
11	3.58	70.72
11-OH	4.46	-
12	3.33	72.80
12-OH	4.36	-
13	3.97	72.46
13-OH	4.56	-
14	5.37	129.05
15	5.48	136.57
16	1.99	37.41
16-Me	0.93	19.90
17	1.26	29.15
18	0.81	11.58

Beispiel 13: Charakterisierung der Verbindung der Formel (III)Summenformel: $C_{19}H_{34}N_2O_6$

Molekulargewicht: 386,49

5 Diastereomeren-Gemisch: 75/25

Tabelle 3: NMR-chemische Verschiebungen von Bengamide (III), Diastereomerengemisch, c = 3 mg/ml in DMSO, 300 K.		
Position	^1H	^{13}C
1	-	171.95
2	2.91	35.28
3	3.61/3.21	49.20
4	1.71/1.31	26.13
5	1.82/1.67	27.11
6	1.84/1.32	30.80
7	4.55	51.14
8	7.84	-
9	-	169.54
10	3.69	81.55
10-OMe	3.25	57.28
11	3.57	70.69
11-OH	4.45	-
12	3.33	72.77
12-OH	4.37	-
13	3.97	72.47
13-OH	4.56	-
14	5.37	129.04
15	5.48	136.58
16	1.99	37.41
16-Me	0.93	19.89
17	1.26	29.15
18	0.81	11.58

Beispiel 14: Charakterisierung der Verbindung der Formel (IV)**Summenformel: C₁₈H₃₂N₂O₇****Molekulargewicht: 388,46****5 Diastereomeren-Gemisch: 75/25****Tabelle 4: NMR-chemische Verschiebungen von Bengamide (IV), Diastereomerengemisch, c = 3.1 mg/ml in DMSO, 300 K.**

Position	¹ H	¹³ C
1	-	173.45
2	7.55	-
3	3.35/3.02	45.05
4	3.74	63.48
4-OH	4.60	-
5	1.81/1.75	34.28
6	1.68/1.64	24.25
7	4.32	51.18
8	7.77	-
9	-	169.63
10	3.70	81.59
10-OMe	3.26	57.30
11	3.58	70.73
11-OH	4.47	-
12	3.34	72.82
12-OH	4.38	-
13	3.97	72.47
13-OH	4.56	-
14	5.37	129.06
15	5.48	136.57
16	1.99	37.41
16-Me	0.93	19.90
17	1.26	29.15

18	0.81	11.58
----	------	-------

Beispiel 15: Charakterisierung von Bengamide E

Summenformel: $C_{17}H_{30}N_2O_6$

5 Molekulargewicht: 358,44

Tabelle 5: NMR-chemische Verschiebungen von Bengamide E, c = 3 mg/ml in DMSO, 300 K.

Position	^1H	^{13}C
1	-	174.01
2	7.91	-
3	3.19/3.06	40.56
4	1.74/1.20	28.75
5	1.87/1.64	27.56
6	1.87/1.36	30.72
7	4.39	51.27
8	7.78	-
9	-	169.60
10	3.69	81.61
10-OMe	3.25	57.30
11	3.56	70.74
11-OH	4.49	-
12	3.33	72.78
12-OH	4.38	-
13	3.96	72.38
13-OH	4.57	-
14	5.38	127.68
15	5.58	137.85
16	2.24	30.08
17	0.95	22.27
18	0.95	22.17

Beispiel 16: Charakterisierung von Bengamide FSummenformel: $C_{18}H_{32}N_2O_8$

Molekulargewicht: 372,47

Tabelle 6: NMR-chemische Verschiebungen von Bengamide F, c = 3 mg/ml in DMSO, 300 K.	
Position	^1H
1	-
2	2.91
3	3.62/3.21
4	1.69/1.33
5	1.84/1.69
6	1.84/1.33
7	4.56
8	7.84
9	-
10	3.70
10-OMe	3.25
11	3.57
12	3.33
13	3.97
14	5.38
15	5.59
16	2.25
17	0.95
18	0.95

5

Beispiel 17: Trennung der Diastereomeren von Verbindung (II)

Die Trennung des Diastereomergemischs der Verbindung der Formel (II) aus Beispiel 8 erfolgte an einer chiralen Säule (AD/H, Daicel, 20 x 200mm, 0,5 ml Fluss,

Laufmittel: Acetonitril:Methanol 4:1 + 0,1 % NH₄Ac). Die optische Reinheit wurde auf einer analytischen AD/H-Säule (Daicel) kontrolliert (4,6 x 250mm, 30°C, Laufmittel: Acetonitril:Methanol 4:1 + 0,1% NH₄Ac, 0,75 ml Fluss, Rt Peak1: 9,9 min Rt Peak2: 10,9 min).

5

Tabelle 7: NMR-chemische Verschiebungen der Diastereomere von Bengamide (II), c = 3 mg/ml in DMSO, 300 K.				
	¹ H (A)	¹ H (B)	¹³ C (A)	¹³ C (B)
1	-	-	173.99	173.99
2	7.91	7.91	-	-
3	3.19/3.06	3.19/3.06	40.56	40.56
4	1.74/1.20	1.74/1.20	28.75	28.75
5	1.87/1.64	1.87/1.64	27.55	27.55
6	1.87/1.36	1.87/1.36	30.72	30.72
7	4.39	4.39	51.27	51.27
8	7.78	7.78	-	-
9	-	-	169.61	169.61
10	3.69	3.69	81.60	81.60
10-OMe	3.25	3.25	57.32	57.32
11	3.58	3.58	70.72	70.77
11-OH	4.46	4.47	-	-
12	3.33	3.33	72.80	72.85
12-OH	4.36	4.36	-	-
13	3.97	3.97	72.46	72.37
13-OH	4.56	4.56	-	-
14	5.37	5.38	129.05	129.01
15	5.48	5.49	136.57	136.44
16	1.99	1.99	37.41	37.28
16-Me	0.93	0.92	19.90	19.86
17	1.26	1.26	29.15	29.06
18	0.81	0.82	11.58	11.48

Beispiel 18: Zell-Proliferationsmessungen an verschiedenen Tumorzelllinien

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden die Tumorzelllinien Hep-G2 (ATCC No. HB-8065) und COLO 205 (ATCC No. CCL-222) verwendet. Die Zelllinien wurden mit 1000 Zellen/well [Hep-G2] beziehungsweise 3500 Zellen/well [Colo205] in Zellkulturmedium ausgesät und 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Medium für Hep-G2: Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F12-Mix (Gibco); NEAA (10% ; non essential amino acids, Gibco), Natrium-Pyruvat (1%, Gibco), L-Glutamin (1%, Gibco), fetales Kälberserum (5%; PAA)].

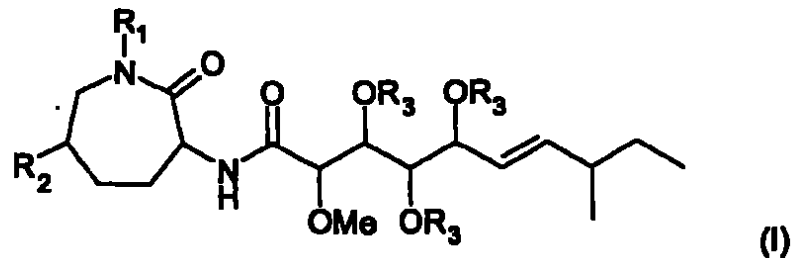
Medium für COLO 205: RPMI 1640 (Gibco), L-Glutamin (1%, Gibco), HEPES (1%, Gibco), fetales Kälberserum (10%; PAA).

Nach 4 Stunden wurden die Verbindungen (II), (III), (IV) und die Bengamide E und F, gelöst in DMSO/Zellkulturmedium, in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die intrazelluläre ATP-Gehaltsbestimmung erfolgte unter Verwendung des Testreagens CellTiterGlo (Promega).

Die Ergebnisse der Zellproliferationstests sind in Tabelle 1 beschrieben.

Ansprüche

1. Verbindung der Formel (I),



5 wobei

R_1 H oder (C₁-C₆)-Alkyl,

R_2 H oder OH, und

R_3 H oder -C(=O)-(C₁-C₆)-Alkyl bedeutet,
oder ein physiologisch verträgliches Salz davon.

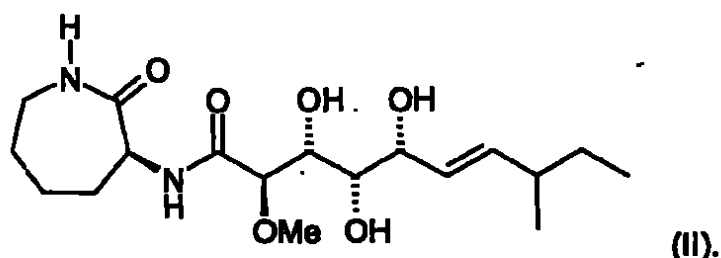
10

2. Verbindung gemäß Anspruch 1, wobei R_1 H oder Methyl bedeutet.

3. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei R_3 H bedeutet.

- 15 4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei R_1 H oder Methyl, R_2 H oder OH, und R_3 H bedeutet.

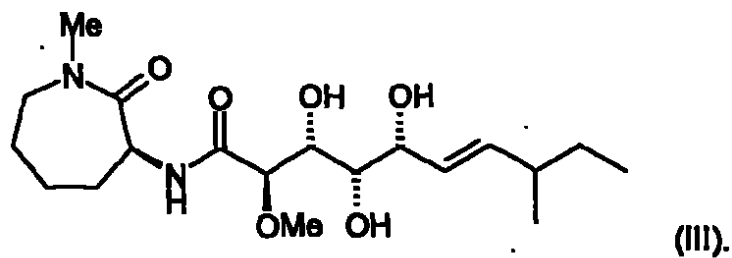
5. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (II)



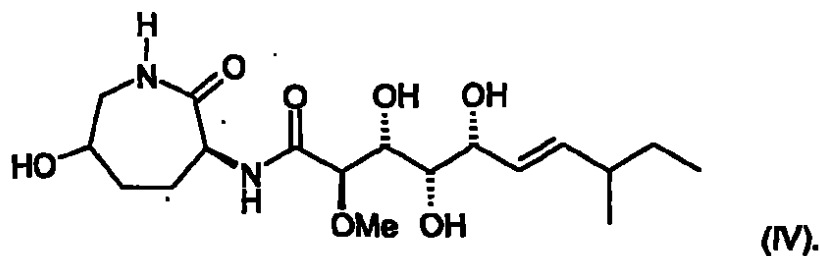
20

6. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (III)

27



7. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch eine Verbindung der Formel (IV)

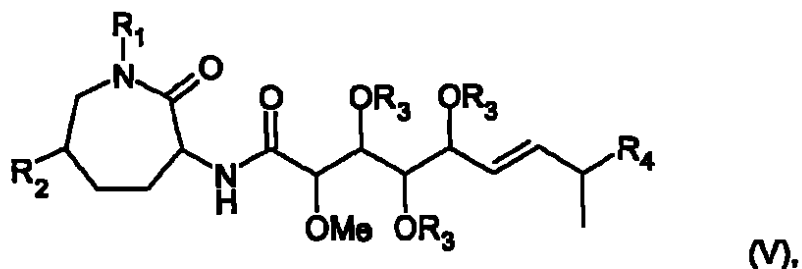


8. Verwendung einer Verbindung der Formel (I) oder eines physiologisch verträglichen Salzes davon gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Arzneimittels.

9. Verwendung einer Verbindung der Formel (I) oder eines physiologisch verträglichen Salzes davon gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebserkrankungen.

10. Arzneimittel mit einem Gehalt an mindestens einer Verbindung der Formel (I) oder eines physiologisch verträglichen Salzes davon gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

11. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (V),



wobei

R₁ H oder (C₁-C₆)-Alkyl,

R₂ H oder OH,

R₃ H oder -C(=O)-(C₁-C₆)-Alkyl, und

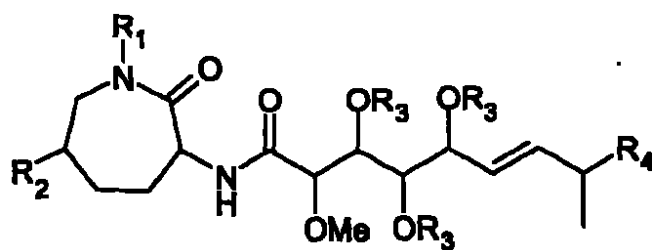
5 R₄ Methyl oder Ethyl bedeutet,

oder eines physiologisch verträglichen Salzes einer Verbindung der Formel (V),

dadurch gekennzeichnet, dass

- 10 1. der Stamm *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) oder einer seiner Varianten und/oder Mutanten unter geeigneten Bedingungen in einem Kulturmedium fermentiert wird, bis sich eine oder mehrere der Verbindungen der Formel (V) in dem Kulturmedium anhäuft,
 2. eine Verbindung der Formel (V) aus dem Kulturmedium isoliert wird, und
 - 15 3. die Verbindung der Formel (V) gegebenenfalls derivatisiert und/oder in ein physiologisch verträgliches Salz umgewandelt wird.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei R₄ gleich Ethyl ist.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, wobei unabhängig
- 20 voneinander R₁ H oder Methyl, R₃ H, und R₄ Ethyl bedeuten.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei R₂ gleich OH ist, und wobei das Kulturmedium Hydroxytyrosin enthält.
- 25 15. Mikroorganismus *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898).
16. Verwendung des Mikroorganismus *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) oder einer Mutante und/oder Variante davon zur Herstellung einer Verbindung der Formel (V)

29



(V).

wobei

R₁ H oder (C₁-C₆)-Alkyl,R₂ H oder OH,5 R₃ H oder -C(=O)-(C₁-C₆)-Alkyl, undR₄ Methyl oder Ethyl bedeutet,

oder eines physiologisch verträglichen Salzes davon.

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2004/011244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D223/10 C07D223/12 A61K31/55 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/85697 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ; NOVARTIS AG (CH); BAIR KENNETH WALTER () 15 November 2001 (2001-11-15) page 37; claims 1,19,37	1-10
Y	J.ORG.CHEM., vol. 66, 2001, pages 1733-1741, XP002310387 the whole document	1-10
Y	J.MED.CHEM., vol. 44, 2001, pages 3692-3699, XP002310388 table 1; compounds 3-6	1-10
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2005

Date of mailing of the international search report

21/01/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentium 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Schuemacher, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/011244

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, vol. 62, 1999, pages 1691-1693, XP002310389 the whole document	1-10
P,X	JP 2004 262793 A (NOYAKU BIO TECHNOLOGY KAIHATSU GIJUTSU KENKYU KUMIAI, JAPAN) 24 September 2004 (2004-09-24) compound 1	1-7

9/15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP2004/011244

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0185697	A	15-11-2001	AU 9520601 A 20-11-2001
			BR 0110641 A 18-03-2003
			CA 2405892 A1 15-11-2001
			CN 1429213 T 09-07-2003
			WO 0185697 A1 15-11-2001
			EP 1282604 A1 12-02-2003
			JP 2003532711 T 05-11-2003
JP 2004262793	A	24-09-2004	NONE

25
26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/011244

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07D223/10 C07D223/12 A61K31/55 A61P35/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Forschender Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 01/85697 A (NOVARTIS ERFINDE VERWALT GMBH ; NOVARTIS AG (CH); BAIR KENNETH WALTER ()) 15. November 2001 (2001-11-15) Seite 37; Ansprüche 1,19,37	1-10
Y	J.ORG.CHEM., Bd. 66, 2001, Seiten 1733-1741, XP002310387 das ganze Dokument	1-10
Y	J.MED.CHEM., Bd. 44, 2001, Seiten 3692-3699, XP002310388 Tabelle 1; Verbindungen 3-6	1-10
	—/—	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteste Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgefüllt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung betrachtet wird und diese Verbindung für einen Fachmann selbstlegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Januar 2005

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

21/01/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentamt 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Schuemacher, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abkürzzeichen
PCT/EP2004/011244

C.(Fortsetzung) ALS WESSENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, Bd. 62, 1999, Seiten 1691-1693, XP002310389 das ganze Dokument	1-10
P,X	JP 2004 262793 A (NOYAKU BIO TECHNOLOGY KAIHATSU GIJUTSU KENKYU KUMIAI, JAPAN) 24. September 2004 (2004-09-24) Verbindung 1	1-7

90
27

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/011244

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0185697 A	15-11-2001	AU 9520601 A	20-11-2001
		BR 0110641 A	18-03-2003
		CA 2405892 A1	15-11-2001
		CN 1429213 T	09-07-2003
		WO 0185697 A1	15-11-2001
		EP 1282604 A1	12-02-2003
		JP 2003532711 T	05-11-2003
JP 2004262793 A	24-09-2004	KEINE	

27
28

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE
COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional
OMPI

(43) Fecha de Publicación Internacional
19 de mayo de 2005 (19.05.2005)
PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/044803 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07D 223/10
(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2004/011244
(22) Fecha de Presentación Internacional: 8 octubre 2004 (08.10.2004)
(25) Idioma de Presentación: Alemán
(26) Idioma de Publicación: Alemán
(30) Datos de Prioridad:
103 49 669.6 24 octubre 2003 (24.10.2003) DE

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto US: **AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH** (Alemania/Alemania); Brüningsstrasse 50, 65929 Frankfurt, Alemania.

(72) Inventores: y

(75) Inventores/Solicitantes (sólo US): **HOFFMANN Holger** (DE/DE); Ernst-Ludwig-Strasse 5, 64646 Heppenheim (Alemania), **HAAG-RICHTER Sabine** (DE/DE); Hammanstr. 2, 60322 Frankfurt (Alemania), **KURZ Michael** (DE/DE); Erlenweg 7, 65719 Hofheim (Alemania), **TIETGEN Helko** (DE/DE); Karolinger Strasse 19, 55130 Mainz (Alemania).

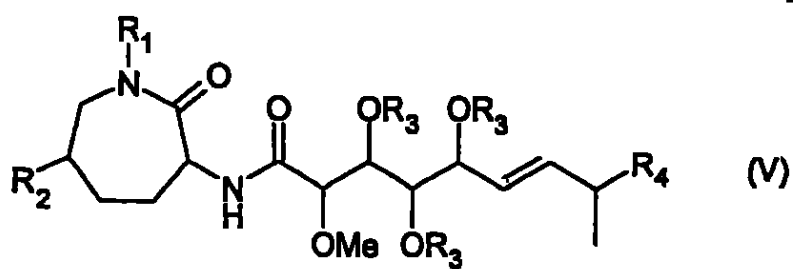
(81) Estados Designados (a menos que se indique de otra forma, para cada clase de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique de otra forma, para cada clase de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

Con Reporte de Búsqueda Internacional.

(54) Título: **DERIVADOS DE BENGAMIDA, MÉTODO PARA SU PRODUCCIÓN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.**



(57) Resumen : La invención se refiere a derivados de bengamida formados, durante la fermentación, por el microorganismo *Myxococcus Virescens* ST 200611 (DSM 15898), a su uso para tratar cáncer, a medicamentos que contienen derivados de bengamida, a un método para preparar bengamidad de la fórmula (V), y al microorganismo *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898).

DERIVADOS DE BENGAMIDA, MÉTODO PARA SU PRODUCCIÓN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

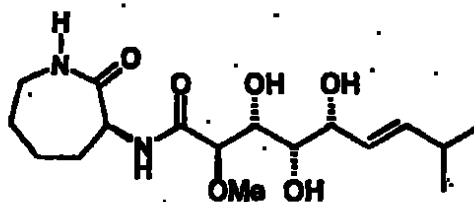
El cáncer es una enfermedad que afecta a seres humanos y animales que, en su mayor parte, es mortal y que está causada por el crecimiento incontrolado de células endógenas. Cáncer es el término que designa la formación de tumores malignos (malignomas) y de neoplasias (tumores o carcinomas), o la degeneración maligna y la maduración alterada de leucocitos (leucemia, cáncer de la sangre). Las células cancerosas o las células tumorales surgen como consecuencia de la transformación de células endógenas. El carácter maligno de la célula cancerosa se expresa por la autonomía de su crecimiento, es decir, la capacidad de la célula para crecer de manera no inhibida y sin ajustarse a la estructura de los órganos, así como para crecer a modo de infiltración, destruyendo, de esta forma, el tejido. La formación de diseminaciones (metástasis) a distancia del tumor, después de que se hayan diseminado células tumorales a través de la sangre o la linfa, es un signo seguro de malignidad. El cáncer es una de las causas más frecuentes de muerte en el ser humano y existe, por consiguiente, una elevada necesidad de métodos y medios para curar o tratar las degeneraciones malignas.

Aparte de la eliminación quirúrgica, a ser posible, radical, del tumor, las posibilidades para tratar tumores malignos incluyen radioterapia, utilizando rayos X, rayos α , rayos β y rayos γ , inmunoterapia y quimioterapia. En la actualidad, la inmunoterapia sólo se puede emplear en un grado limitado. Por quimioterapia de tumores se entiende la administración de venenos celulares (agentes citostáticos) para tratar tumores y las células tumorales que permanecen habitualmente después del tratamiento quirúrgico local o la irradiación. Estas sustancias interfieren de manera específica con ciertos procesos de división celular, lo que significa que los tejidos que contienen una elevada proporción de células en división, tales como los tejidos tumorales de rápido crecimiento, reaccionan de forma más sensible. Los agentes citostáticos que se utilizan son compuestos alquilantes tales como ciclofosfamida, antimetabolitos tales como metotrexate, alcaloides tales como vincristina, y antibióticos tales como daunomicina o adriamicina. Sin embargo, debido a los masivos efectos secundarios, todos estos agentes presentan graves inconvenientes, de modo que sólo se retrasa, pero no se evita la muerte del paciente afectado. Además, las células degeneradas (cancerosas) desarrollan resistencias a los agentes que se utilizan; aunque los medicamentos que se emplean en ese momento ya no exhiben efecto citostático, siguen siendo tóxicos

como consecuencia de los efectos secundarios. Adicionalmente, se ha observado que la eficacia alcanzada mediante el uso de agentes citostáticos en combinación o de forma secuencial es superior a la que se logra con el uso de un único agente citostático (monoterapia) y, por lo tanto, es posible que los efectos secundarios sustanciales no sean aditivos en relación con la poliquimioterapia. Por todas estas razones, se necesitan urgentemente nuevos agentes quimioterapéuticos y se les investiga, por consiguiente, en todo el mundo.

Los primeros ejemplos de bengamidas fueron las bengamidas A y B, que están sustituidas con dodecanolio en el anillo de caprolactama, y que se aíslan de la esponja marina *Jaspis cf. Coriacea* (familia *Coppatiidae*, orden *Choristida* B *Astrophorida*) (Adamczewski et al., *J. Org. Chem.* 1986, 51, 4497-4498), y que se ha comunicado que resultan biotóxicas para células eucariotas, nematodos y bacterias.

Bengamida E

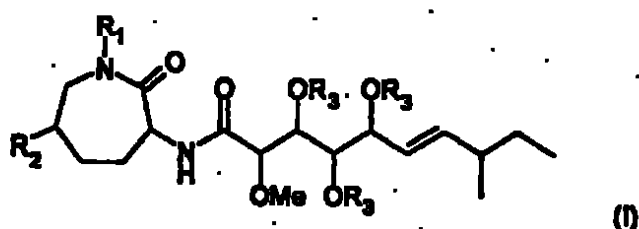


y su derivado N-metilado, bengamida F, son ejemplos de derivados de bengamida que han demostrado poseer actividad antitumoral. Bengamida E inhibe la proliferación celular al detener la división celular en el punto de restricción G1/S y en la fase G2/M del ciclo celular. Los derivados de bengamida B inhiben la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-435 (Kinder et al., *J. Med. Chem.* 2001, 44, 3692-3699).

Una característica común de los derivados de bengamida conocidos es que se les ha aislado de esponjas marinas del género *Jaspis* sp. o *Pachastrissa* sp. (Thale et al., *J. Org. Chem.* 2001, 66, 1733-1741).

Se ha encontrado ahora que la cepa de microorganismos *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) es capaz de formar nuevos derivados de bengamida que inhiben la proliferación celular a bajas concentraciones y que, por lo tanto, son adecuados para ser utilizados en el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades oncológicas.

La presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I),



en la que

R_1 es H o alquilo-(C_1-C_6),

R_2 es H u OH, y

5 R_3 es H o $-C(=O)$ -alquilo-(C_1-C_6),

o a una sal fisiológicamente aceptable de un compuesto de la fórmula (I).

De forma independiente entre sí, R_1 es, preferentemente, H o metilo, y R_3 es, preferentemente, H.

La invención se refiere, preferentemente, a un compuesto de la fórmula (I) en la

10 que

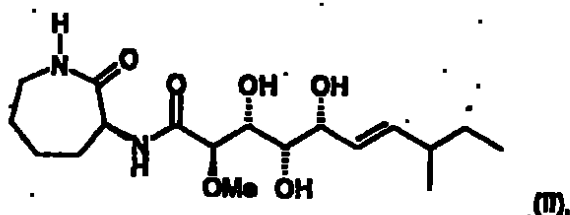
R_1 es H o metilo,

R_2 es H u OH, y

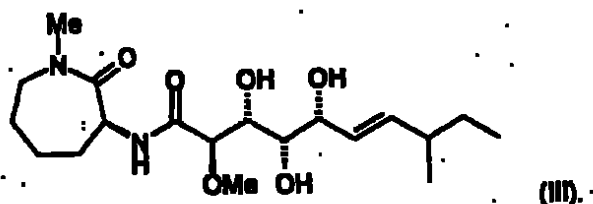
R_3 es H.

Alquilo-(C_1-C_6) es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene hasta 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo (Me), etilo, n-propilo, isopropilo, terc-butilo o n-hexilo, preferentemente, metilo.

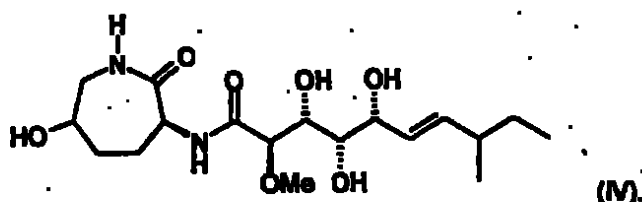
Adicionalmente, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I) que se distingue por un compuesto de la fórmula (II)



20 un compuesto de la fórmula (III)

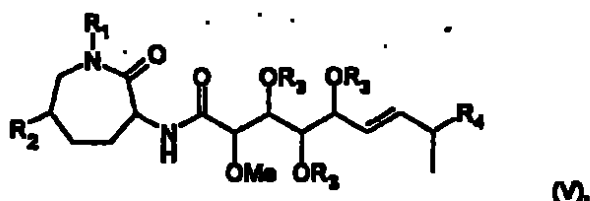


y un compuesto de la fórmula (IV)



La presente invención se refiere, además, a todos los equivalentes químicos evidentes de los compuestos de la fórmula (I) según la invención. Estos equivalentes son compuestos que exhiben sólo una ligera diferencia química y poseen el mismo efecto farmacológico, o que se convierten en los compuestos según la invención bajo condiciones suaves. Dichos equivalentes incluyen también, por ejemplo, sales, productos de reducción, productos de oxidación, ésteres, éteres, acetales o amidas de los compuestos de la fórmula (I), así como equivalentes que el experto puede preparar usando métodos convencionales y, adicionalmente, todas las antípodas ópticas y diastereoisómeros y todas las formas estereoisómeras.

La invención se refiere también a un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula (V)



en la que

R_1 es H o alquilo-(C_1-C_6),

R_2 es H u OH,

R_3 es H o $-C(=O)$ -alquilo-(C_1-C_6), y

R_4 es metilo o etilo,

o una sal fisiológicamente aceptable de un compuesto de la fórmula (V), que comprende

1. la fermentación de la cepa *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), o una de sus variantes y/o mutantes, bajo condiciones adecuadas en un medio de cultivo hasta que se acumule uno o más de los compuestos de la fórmula (V) en el medio de cultivo,
2. aislamiento de un compuesto de la fórmula (V) desde el medio de cultivo, y

23
34

3. derivatización del compuesto de la fórmula (V), cuando sea apropiada, y/o, cuando resulte adecuado, conversión en una sal fisiológicamente aceptable.

5 La invención se refiere, preferentemente, a un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula (V) en el que R_4 es etilo. El producto de dicho procedimiento corresponde a un compuesto de la fórmula (I) anteriormente descrito.

La invención se refiere, de manera particularmente preferida, a un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula (V) en el que, de forma independiente entre sí, R_1 es H o metilo, R_3 es H y R_4 es etilo.

10 Además, la invención se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula (II), un compuesto de la fórmula (III) y un compuesto de la fórmula (IV), así como los derivados de bengamida E y F.

15 A menos que se indique lo contrario, los centros quirales en los compuestos de las fórmulas (I) y (V) pueden encontrarse presentes en configuración R o en configuración S. La invención se refiere tanto a los compuestos ópticamente puros como a las mezclas estereoisómeras tales como mezclas enantiómeras y mezclas diastereoisómeras.

20 Como sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de las fórmulas (I) y (V) se entienden tanto sus sales orgánicas como sus sales inorgánicas, como se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (17ª edición, página 1418 (1985)). Debido a su estabilidad física y química y a su solubilidad, se prefieren las sales de sodio, potasio, calcio y amonio, entre otras, para grupos ácidos; se prefieren las sales del ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o de ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido 25 fumárico, ácido tartárico y ácido p-toluenosulfónico, entre otras, para grupos básicos.

30 El medio de cultivo es una solución de nutrientes o un medio sólido que contiene al menos una fuente habitual de carbono y una fuente de nitrógeno, así como sales inorgánicas habituales. Si se agrega hidroxilisina al medio de cultivo, la cepa de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) produce un compuesto de la fórmula (V) en el que R_2 es OH como consecuencia de la digestión de hidroxilisina.

Por lo tanto, una parte del objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula (V), anteriormente descrita, en el que R_2 es OH y en el que el medio de cultivo en la etapa 1 contiene hidroxilisina.

El procedimiento según la invención se puede utilizar para fermentar a escala de laboratorio (escala de mililitro a litro), y para fermentar a escala industrial (escala de metro cúbico).

Fuentes de carbono adecuadas para la fermentación son hidratos de carbono y alcoholes sacáricos asimilables tales como glucosa, lactosa, sacarosa o D-manitol, así como productos naturales que contienen hidratos de carbono tales como extracto de malta o extracto de levadura. Ejemplos de nutrientes que contienen nitrógeno son aminoácidos, péptidos y proteínas, así como sus productos de degradación, por ejemplo, caseína, peptonas o triptonas; extractos de carne; extractos de levadura; gluten; semillas trituradas, por ejemplo, de maíz, trigo, habas, soja o de la planta del algodón; residuos de destilación de la producción de alcohol; harinas de carne; extractos de levadura; sales de amonio; nitratos. Se prefiere que la fuente de nitrógeno sea uno o múltiples péptidos obtenidos por síntesis o biosíntesis. Ejemplos de sales inorgánicas son cloruros, carbonatos, sulfatos o fosfatos de metales alcalinos, metales alcalino-térreos, hierro, cinc, cobalto y manganeso. Ejemplos de elementos traza son cobalto y manganeso.

Condiciones adecuadas para formar bengamidas según la invención son las siguientes: las bengamidas según la invención se forman, preferentemente, en un medio de cultivo que contiene 0,05 a 5%, preferentemente, 0,1 a 2,5% de extracto de levadura; 0,2 a 5,0%, preferentemente, 0,1 a 2% de casitona; 0,02 a 1,0%, preferentemente, 0,05 a 0,5% de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,02 a 1,5%, preferentemente, 0,05 a 0,7% de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, y 0,00001% a 0,001% de cianocobalamina. Los valores porcentuales indicados están basados, en todos los casos, en el peso de la solución de nutrientes total.

El microorganismo se cultiva bajo condiciones aeróbicas, es decir, por ejemplo, sumergido, mientras se agita o remueve en frascos de agitación o fermentadores, o en medio sólido, cuando resulte apropiado, mientras se hace pasar aire u oxígeno. Los microorganismos se pueden cultivar en un intervalo de temperatura de aproximadamente 18 a 35°C, preferentemente, de aproximadamente 20 a 32°C y, en particular, de aproximadamente 27 a 30°C. El intervalo de pH debe estar comprendido entre 4 y 10, preferentemente, entre 6,5 y 7,5. Por lo general, el microorganismo se cultiva bajo estas condiciones durante un período de 2 a 10 días, preferentemente, de 72 a 168 horas. De manera ventajosa, el microorganismo se cultiva en varias etapas, es decir, se preparan inicialmente uno o múltiples cultivos preliminares en un medio de nutrientes líquido, inoculando entonces estos cultivos preliminares en el medio de producción real, es decir, el cultivo principal, por ejemplo, en una relación por volumen de 1:10

35
36

hasta 1:100. El cultivo preliminar se obtiene, por ejemplo, inoculando la cepa, en forma de células vegetativas o cuerpos fructíferos, en una solución nutritiva y dejándola crecer durante aproximadamente 20 a 120 horas, preferentemente, desde 48 a 96 horas. Se pueden obtener células vegetativas y/o cuerpos fructíferos dejando crecer la cepa, por ejemplo, durante 1 a 15 días, preferentemente, 4 a 10 días, sobre un sustrato nutritivo sólido o líquido, por ejemplo, agar de levadura.

Se aísla o purifica un derivado de bengamida de la fórmula (V) a partir del medio de cultivo, usando métodos conocidos y teniendo en consideración las propiedades químicas, físicas y biológicas de las sustancias naturales. Se empleó HPLC para analizar las concentraciones de los respectivos derivados de bengamida en el medio de cultivo o en las etapas individuales de aislamiento, comparando convenientemente la cantidad de sustancia formada con una solución de calibración.

Para este aislamiento, el caldo de cultivo, o el cultivo junto con el medio sólido, se liofilizan, tras lo cual se extraen los derivados de bengamida del liofilizado usando un disolvente orgánico, por ejemplo, metanol o 2-propanol. La fase de disolvente orgánico contiene las sustancias naturales según la invención; cuando es adecuado, se concentra al vacío y se somete a una purificación adicional.

La purificación adicional de uno o múltiples compuestos según la invención se realiza por cromatografía sobre materiales adecuados, preferentemente, por ejemplo, sobre tamices moleculares, sobre gel de sílice, sobre óxido de aluminio, sobre intercambiadores de iones, o sobre resinas adsorbentes o sobre fases inversas (RP). Esta cromatografía se utiliza para separar los derivados de bengamida. Los derivados de bengamida se cromatografían usando soluciones acuosas tamponadas o mezclas de soluciones acuosas y orgánicas.

Como mezclas de soluciones acuosas u orgánicas se entienden todos los disolventes orgánicos miscibles con agua, preferentemente, metanol, 2-propanol o acetonitrilo, en una concentración de 5 a 95% de disolvente, preferentemente, 5 a 40% de disolvente, o todas las soluciones acuosas tamponadas que son miscibles con disolventes orgánicos. Los tampones que se deben utilizar son los mismos que se han especificado anteriormente.

Los derivados de bengamida se separan, sobre la base de sus diferentes polaridades, por medio de cromatografía de fase inversa, por ejemplo, sobre MCI (resina adsorbente de Mitsubishi, Japón), o Amberlite XAD® (TOSHAAS), o sobre otros materiales hidrófobos, por ejemplo, sobre fases RP-8 o RP-18. Adicionalmente, la sepa-

ración se puede efectuar mediante cromatografía de fase normal, por ejemplo, sobre gel de sílice, óxido de aluminio, y similares.

Los derivados de bengamida se cromatografían usando soluciones acuosas tamponadas, básicas o acidificadas, o mezclas de soluciones acuosas con alcoholes u
5 otros disolventes orgánicos miscibles con agua. Se utilizan, preferentemente, acetonitrilo y metanol como disolvente orgánico.

Como soluciones acuosas tamponadas, básicas o acidificadas se entienden, por ejemplo, agua, tampón fosfato, acetato de amonio y tampón citrato, a una concentración de hasta 0,5M, así como ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético,
10 amoniaco y trietilamina, o todos los ácidos y bases disponibles en el comercio y conocidos por los expertos, preferentemente, a una concentración de hasta 1%. En el caso de soluciones acuosas tamponadas, se prefiere de manera especial acetato de amonio al 0,1%.

La cromatografía se llevó a cabo usando un gradiente que comenzó con agua
15 al 100% y finalizó con disolvente al 100%; la cromatografía se efectuó, preferentemente, con un gradiente lineal de acetonitrilo al 5 a 95%.

De forma alternativa, también es posible llevar a cabo una cromatografía sobre gel o cromatografía sobre fases hidrófobas. La cromatografía sobre gel se lleva a cabo sobre geles de poliacrilamida o geles copolímeros tales como Biogel-P 2® (Biorad), o
20 Fractogel TSK HW 40® (Merck, Alemania). Es posible invertir la secuencia de las etapas cromatográficas anteriormente mencionadas.

En el caso en que las bengamidas estén presentes como diastereoisómeros, se les puede separar usando métodos conocidos, por ejemplo, mediante separación usando una columna quiral.

La derivatización de los grupos OH en la cadena lateral de los compuestos de las fórmulas (I) y/o (V) (R_3 es, en cada caso, H), para dar un grupo acilo (R_4 es, en cada caso, $-C(=O)-\text{alquilo}-(C_1-C_n)$) se efectúa empleando métodos que son conocidos en sí mismos (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4ª edición, 1992), por ejemplo, por medio de una reacción con un anhídrido ácido. Por ejemplo,
30 Adamczeski et al., J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 647-654, describen la reacción con anhídrido acético para dar un compuesto de las fórmulas (I) y/o (V), en las que R_3 es $-C(=O)-CH_3$.

Del mismo modo, la alquilación del grupo NH en el anillo de caprolactama de un compuesto de la fórmula (I) o (V) (R_1 es, en cada caso, H) se lleva a cabo usando
35 métodos conocidos en sí mismos (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley

37
50

& Sons, 4ª edición, 1982), por ejemplo, por reacción con Me_2CO_3 o Me_2SO_4 , para preparar los correspondientes derivados N-metilados, o por reacción con bromuro de alquilo- $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ en presencia de una base.

5 Con el número DSM 15898, se depositó con fecha 11.09.2003 un aislado de la cepa de microorganismo *Myxococcus virescens* ST200611 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Alemania, de acuerdo con las normas del Tratado de Budapest.

10 Las células vegetativas de la cepa DSM 15898 tienen forma de bacilo característica de *Myxococcus virescens*. Sobre sustratos nutrientes sólidos, *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) forma cuerpos fructíferos que contienen mixosporas redondas.

En lugar de la cepa *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), también es posible usar sus mutantes y/o variantes que sintetizan uno o múltiples compuestos según la invención.

15 Un mutante es un microorganismo en el que uno o múltiples genes del genoma se han modificado con el gen o los genes responsables de la capacidad del organismo para producir el compuesto según la invención, conservándose éstos últimos en forma funcional y hereditaria.

20 Estos mutantes se pueden producir, de manera conocida en sí misma, usando medios físicos, por ejemplo, irradiación tal como, por ejemplo, con rayos ultravioletas o rayos X, o mutágenos químicos tales como metanosulfonato etílico (EMS); 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona (MOB) o N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), o del modo descrito por Brock et al. en "Biology of Microorganisms", Prentice Hall, páginas 238-247 (1984).

25 Una variante es un fenotipo del microorganismo. Los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a su ambiente y, por consiguiente, exhiben una flexibilidad fisiológica altamente desarrollada. En la adaptación fenotípica intervienen todas las células del microorganismo, sin que la naturaleza de la variación esté genéticamente condicionada y siendo reversible con la alteración de las condiciones (H. Stolp, Microbial ecology: organism, habitats, activities, Cambridge University Press, Cambridge, GB, página 180, 1988).

El análisis de mutantes y/o variantes que sintetizan uno o más de los compuestos según la invención tiene lugar de acuerdo con el siguiente esquema:

- liofilización del medio de fermentación;
- 35 - extracción del liofilizado con un disolvente orgánico;

38
29

- extracción del compuesto del filtrado del cultivo, usando fases sólidas;
- análisis por HPLC o TLC (CCF), o por ensayo de la actividad biológica.

Las condiciones de fermentación que se han descrito son aplicables a *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) y a sus mutantes y/o variantes.

5 La presente invención se refiere, asimismo, al uso del microorganismo *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), o de un mutante y/o una variante, para preparar un compuesto de la fórmula (V), en particular, un compuesto de la fórmula (IV), o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, como se ha descrito anteriormente.

10 Se emplea un ensayo basado en la determinación de la concentración intracelular de ATP para detectar la inhibición de la proliferación celular. Resulta posible utilizar líneas celulares tumorales tales como Hep-G2 y Colo205. En este ensayo, el contenido en ATP de células metabólicamente activas sirve, en una reacción con luciferasa, como medición del número de células vivas.

15 Los compuestos de las fórmulas (II)-(VI) se utilizaron en el ensayo en una concentración única de 0,3 – 40 μ M y una dependencia de dosis indicada como valor de CT_{50} , indicando en cada caso (IIA) y (IIB) una diastereoisómero del compuesto de la fórmula (II):

Tabla 1: Actividad de las bengamidas en un ensayo de proliferación celular, expresada como valor de CT_{50} en μ M		
Compuesto	Hep-G2	Colo 205
(II)	16	27
(IIA)	17	33
(IIB)	6	10
(III)	9	15
(IV)	>40	42
Bengamida E	36	46
Bengamida F	27	33

20

Por lo tanto, la invención también se refiere al uso del compuesto de la fórmula (I) o de una sal fisiológicamente aceptable del mismo como agente farmacéutico en medicina humana o veterinaria, en particular para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades oncológicas. La invención se refiere, preferentemente, al uso de un

25 compuesto de la fórmula (I), o de una sal fisiológicamente aceptable del mismo, para

31
P

tratar el cáncer de mama, cáncer intestinal, cáncer de estómago, cáncer de hígado, tumores cerebrales, tumores ováricos, cáncer de esófago, cáncer renal y carcinoma de células musculares, en especial, carcinoma de los músculos de cabeza y cuello.

Además, la presente invención se refiere a un agente farmacéutico que contiene al menos un compuesto de la fórmula (I) o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, existiendo la posibilidad de administrar el o los compuestos de la fórmula (I) como tales o, preferentemente, estando presentes en una mezcla con uno o más de las sustancias de vehículo o sustancias auxiliares habituales, farmacéuticamente adecuadas.

Los compuestos según la invención son estables en estado sólido y en soluciones, en un intervalo de pH entre 2 y 9, en particular, entre 5 y 7 y, en consecuencia, se pueden incorporar en preparaciones galénicas habituales.

Aun cuando los preparados farmacéuticos según la invención se pueden administrar por vía oral o parenteral, también resulta posible, en principio, su uso por vía rectal. Ejemplos de formas de preparaciones galénicas sólidas o líquidas adecuadas son gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, aerosoles, gotas o soluciones inyectables en forma de ampolla, así como preparaciones que proporcionan una liberación prolongada del compuesto activo; en su preparación se utilizan habitualmente sustancias de vehículo o sustancias auxiliares farmacológicamente adecuadas tales como desintegrantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchamiento, deslizantes, lubricantes, sustancias saborizantes, edulcorantes o solubilizantes, por ejemplo, carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteína de la leche, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales o vegetales, polietilenglicoles y disolventes tales como agua esterilizada, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos.

Cuando resulta apropiado, las unidades de dosificación para administración oral pueden estar micro-encapsuladas para retrasar la liberación o prolongarla durante un período relativamente largo de tiempo, por ejemplo, mediante recubrimiento o inclusión del compuesto activo en forma de partículas en polímeros o ceras adecuados, y similares.

Es preferible producir y administrar las preparaciones farmacéuticas en unidades de dosificación, conteniendo cada unidad, como componente activo, una dosis definida de uno o múltiples compuestos de los derivados de bengamida de la fórmula (I). En el caso de unidades de dosificación sólidas tales como comprimidos, cápsulas y

40
91

supositorios, esta dosis puede ser de hasta 500 mg, pero, preferentemente, es de aproximadamente 0,1 hasta 200 mg y, en el caso de soluciones inyectables en forma de ampolla, hasta aproximadamente 200 mg, pero, preferentemente, de aproximadamente 0,5 hasta 100 mg al día.

- 5 La dosis diaria a administrar depende del peso corporal, edad, sexo y estado del sujeto mamífero. Sin embargo, también dosis diarias mayores o menores pueden ser apropiadas. La dosis diaria se puede administrar tanto por medio de una administración única al día, en forma de una unidad de dosificación única, o en varias unidades de dosificación menores, y por medio de la administración múltiple de dosis subdivididas, a intervalos definidos.

Los preparados farmacéuticos según la invención se fabrican dando forma adecuada para la administración a uno o múltiples compuestos de la fórmula (I) según la invención, opcionalmente junto con una o múltiples sustancias de vehículo y sustancias auxiliares habituales.

- 15 Los siguientes Ejemplos pretenden explicar la invención de forma más detallada, sin limitar su alcance en absoluto.

A menos que se indique lo contrario, los valores porcentuales se refieren al peso y las relaciones de mezcla, en el caso de líquidos, se refieren al volumen.

- 20 Ejemplo 1: Almacenamiento de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) a -135°C

- Se inocular una placa de agar (levadura de panadería fresca al 1%, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ al 1%, HEPES 20 mM, cianocobalamina al 0,00005%, agar al 1,5%, pH 7,2) con la cepa de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) y se incuba a 30°C durante aproximadamente 7 días. De la superficie de agar se retiran por raspado las células en este cultivo superficial usando una espátula estéril, se resuspenden en 0,5 ml de medio de casitona (casitona al 1% (Difco), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ al 0,15%, pH 7,0) y se almacenan a -135°C .

- 30 Ejemplo 2: Preparación de un cultivo preliminar de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898) en un matraz de Erlenmayer

- Un matraz de Erlenmayer de 300 ml con 100 ml de solución nutritiva (levadura de panadería fresca al 1%, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ al 1%, HEPES 20 mM, cianocobalamina al 0,00005%, pH 7,2) se inocular con la cepa de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), y el cultivo se incuba durante 4 días a 30°C y 180 rpm en un agitador rotatorio.

Se utilizan, entonces, 5 ml de este cultivo preliminar para preparar los cultivos principales.

Ejemplo 3: Preparación de un cultivo principal líquido de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898)

Un matraz de Erlenmayer estéril de 300 ml, que contiene 100 ml de la siguiente solución nutritiva (extracto de levadura al 0,5%, casitona al 0,5%, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ al 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ al 0,2%, cianocobalamina al 0,00005%, pH 7,4) se inocula con 5 ml del cultivo preliminar (véase el Ejemplo 2), o un cultivo realizado en un placa de agar fresco (levadura de panadería fresca al 1%, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ al 1%, HEPES 20 mM, cianocobalamina al 0,00005%, pH 7,2, más agar al 1,5%), y se incuba a 30°C y 180 rpm en una agitadora. La producción máxima de bengamidas según la invención se alcanza después de 72-96 horas. Un cultivo sumergido de 72-96 horas de antigüedad (cantidad de inoculación aprox. 5-10%) de la misma solución nutritiva descrita en el Ejemplo 2, es suficiente para inocular fermentadores de 10 a 200 l.

Ejemplo 4: Preparación de un cultivo principal líquido de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), con alimentación de hidroxilisina para producir el derivado de bengamida (IV)

Un matraz de Erlenmayer estéril, de 300 ml, que contiene 100 ml de la siguiente solución de nutrientes (extracto de levadura al 0,5%, casitona al 0,5%, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ al 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ al 0,2%, cianocobalamina al 0,00005% e hidroxilisina 1 mM, pH 7,4) se inocula con 5 ml de un cultivo preliminar del Ejemplo 2, o un cultivo que se ha hecho crecer sobre una placa de agar fresco (levadura de panadería fresca al 1%, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ al 1%, HEPES 20 mM, cianocobalamina al 0,00005%, pH 7,2, más agar al 1,5%), y se incuba a 30°C y 180 rpm en una agitadora. La producción máxima del derivado de bengamida (IV) se alcanza después de 72-96 horas. Se utilizó HPLC-MS para el análisis. Un cultivo sumergido de 72-96 horas de antigüedad (cantidad de inoculación, aprox. 5-10%) de la misma solución de nutrientes descrita en el Ejemplo 2, es suficiente para inocular fermentadores de 10 a 200 l.

Ejemplo 5: Preparación de derivados de bengamida en un fermentador

Los fermentadores de 10 l y 30 l se hicieron funcionar bajo las siguientes condiciones:

42
43

Inóculo:	aprox. 5%	aprox. 9%
Fermentador:	30 l	10 l
Medio de nutrientes:	Véase el Ejemplo 2	Véase el Ejemplo 2
Temperatura de incubación:	30°C	30°C
Velocidad del agitador:	112 rpm	150 rpm
Aireación:	8 l/min	4 l/min
Regulación de pH:	desde pH 7,8 a pH 7,5	desde pH 8,1 a pH 7,5
Regulación de pO ₂ :	ninguna	ninguna

El pH se reguló siempre utilizando KOH al 10% o, respectivamente, H₂SO₄ al 10%. La formación de espuma se puede suprimir agregando repetidamente Clerol FBA 265 (Cognis Alemania GmbH). La producción máxima se alcanza después de aprox.
5 72 a 96 horas.

Ejemplo 6: Aislamiento de los derivados de bengamida (II) y (III), así como de bengamidas E y F, de los cultivos agitados de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898)

10 Después de finalizar la fermentación de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), se liofilizó el caldo de cultivo del Ejemplo 3 (30 l de caldo de cultivo), junto con la biomasa, y el liofilizado se extrajo con metanol (2 x 5 l). El extracto de metanol se redujo a 1,2 l al vacío y se cargó, seguidamente, en una columna preparada empaquetada con aprox. 1,5 litros de material CHP-20P (gel MCI®, 75-150 µ, Mitsubishi Chemical Corporation). La columna se eluyó con metanol al 95%. Se recogió el
15 caudal de la columna (120 ml/min) y se redujo a un volumen de 1,5 l al vacío.

Ejemplo 7: Pre-separación de los derivados de bengamida (II) y (III), así como de las bengamidas E y F, mediante cromatografía RP-18

20 Se cargaron 1,5 l de la solución obtenida de la forma descrita en el Ejemplo 6 en una columna Phenomenex Luna® 10 µ C18 (2) (tamaño: 50 mm x 250 mm), dotada con una pre-columna Luna® 10 µ C18 (2) (dimensiones: 21,2 mm x 60 mm), y se eluyó (acetato de amonio al 0,1%, pH 4,6, ajustado con ácido acético) durante 60 min, usando un gradiente de acetonitrilo en agua al 5% hasta 95%. El caudal fue de 150
25 ml/min y el tamaño de fracción fue de 200 ml. Las bengamidas estuvieron presentes en las fracciones 5-9, 10-11 y 12-14.

Ejemplo 8: Purificación de los derivados de bengamida (II) y (III), así como de las bengamidas E y F

Se liofilizaron las fracciones individuales del Ejemplo 7 y se purificaron una vez más por HPLC sobre una columna Phenomenex Luna® 10 µm C18 (2) (dimensiones: 21 mm x 250 mm), dotada con una pre-columna XTerra® Prep MS C18 10 µm (Waters, dimensiones: 19 x 10 mm). La columna se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo en agua al 5% hasta 40% durante 40 min (con la presencia adicional de acetato de amonio al 0,1%, pH 8,8, ajustado con metilamina). Se recogió el caudal de la columna (50 ml/min) en fracciones (fracciones de 7,5 ml en cada caso). Las fracciones 5-9 del Ejemplo 7 contuvieron el compuesto de la fórmula (III) y, después de la cromatografía y liofilización, proporcionaron 86 mg de bengamida E (pureza >95%). Después de la cromatografía, las fracciones 10-11 del Ejemplo 7 proporcionaron 145 mg de bengamida (II) (pureza >95%, mezcla diastereoisómera 70/30) y 5 mg de bengamida F (pureza >95%). Se obtuvieron 35 mg de bengamida (III) (pureza >95%) en forma de mezcla diastereoisómera, en una relación de 75:25, de las fracciones 12-14 del Ejemplo 7. Los diastereoisómeros son, en cada caso, los correspondientes epímeros C-16.

Ejemplo 9: Aislamiento de la hidroxibengamida (IV) de los cultivos agitados de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898)

Después de finalizar la fermentación de *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), se liofilizó el caldo de cultivo del Ejemplo 5 (10 l de caldo de cultivo), junto con la biomasa, y el liofilizado se extrajo con metanol (2 x 3 l). El extracto de metanol se redujo al vacío a 400 ml y se cargó en una columna preparada, que se había empaquetado con 0,6 litros de material CHP-20P (gel MCI®, 75-150, Mitsubishi Chemical Corporation). La columna se eluyó con metanol en agua al 5% hasta 95%. El caudal de la columna (100 ml/min) se recogió en fracciones durante 60 min (0,5 min por fracción). Las fracciones que contuvieron el derivado deseado (fracciones 45-109) se combinaron y redujeron al vacío a un volumen de 700 ml.

Ejemplo 10: Pre-purificación de la hidroxibengamida (IV) mediante cromatografía RP-18

A continuación, la solución del Ejemplo 9 se cargó en una columna Phenomenex Luna® 10 µ C18 (2) (tamaño: 50 mm x 250 mm), dotada de una pre-columna Phenomenex Luna® 10 µ C18 (2) (dimensiones: 21,2 mm x 60 mm) y se eluyó (acetato de amonio al 0,1%, pH 8,8, ajustado con trietilamina), usando un gradiente de ace-

84
45

tonitrilo en agua al 5% hasta 40%, durante 60 min. El caudal fue de 150 ml/min y el tamaño de fracción fue 250 ml. La fracción 22 contuvo el derivado de bengamida deseado.

5 Ejemplo 11: Purificación de la hidroxi-bengamida (IV)

La fracción 22 del Ejemplo 10 se liofilizó y purificó nuevamente por medio de HPLC en una columna Phenomenex Luna® 10 µm C18 (2) (dimensiones: 21 mm x 250 mm), dotada de una pre-columna Waters XTerra® Prep MS C18 10 µm (dimensiones: 19 x 10 mm). La columna se eluyó con un gradiente de acetonitrilo en agua al 5% hasta 95% durante 60 min (con la presencia adicional de acetato de amonio al 0,1%, pH 4,6, ajustado con ácido acético). Se recogió el caudal de la columna (50 ml/min) en fracciones (fracciones de 7,5 ml en cada caso). Se combinaron, desalinizaron y liofilizaron las fracciones que contuvieron bengamida (fracciones 26-28). En relación con esto, se obtuvieron 7 mg de bengamida (IV) en forma de mezcla diastereoisómera en una relación de 75:25.

Ejemplo 12: Caracterización del compuesto de la fórmula (II)

Fórmula empírica: C₁₈H₃₂N₂O₆

20 Peso molecular: 372,47

Mezcla diastereoisómera: 75:25

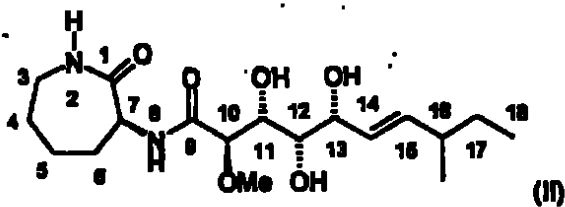


Tabla 2: Desviaciones químicas de RMN de bengamida (II), mezcla diastereoisómera, c = 3 mg/ml en DMSO, 300 K		
Posición	¹ H	¹³ C
1	-	173,99
2	7,91	-
3	3,19/3,06	40,56

48
46

4	1,74/1,20	28,75
5	1,87/1,64	27,55
6	1,87/1,36	30,72
7	4,39	51,27
8	7,78	-
9	-	169,61
10	3,69	81,60
10-Ome	3,25	57,32
11	3,58	70,72
11-OH	4,46	-
12	3,33	72,80
12-OH	4,36	-
13	3,97	72,48
13-OH	4,56	-
14	5,37	129,05
15	5,48	136,57
16	1,99	37,41
16-Me	0,93	19,90
17	1,26	29,15
18	0,81	11,58

Ejemplo 13: Caracterización del compuesto de la fórmula (III)

Fórmula empírica: C₁₉H₃₄N₂O₆

5 Peso molecular: 386.49

Mezcla diastereoisómera: 75/25

Tabla 3: Desviaciones químicas de RMN de bengamida (III), mezcla diastereoisómera, c = 3 mg/ml en DMSO, 300 K		
Posición	¹ H	¹³ C
1	-	171,95
2	2,91	35,28
3	3,61/3,21	49,20
4	1,71/1,31	26,13

5	1,82/1,67	27,11
6	1,84/1,32	30,80
7	4,55	51,14
8	7,84	-
9	-	169,54
10	3,69	81,55
10-OMe	3,25	57,28
11	3,57	70,69
11-OH	4,45	-
12	3,33	72,77
12-OH	4,37	-
13	3,97	72,47
13-OH	4,56	-
14	5,37	129,04
15	5,48	136,58
16	1,99	37,41
16-Me	0,93	19,89
17	1,26	29,15
18	0,81	11,58

Ejemplo 14: Caracterización del compuesto de la fórmula (IV)

Fórmula empírica: C₁₈H₃₂N₂O₇

- 5
- Peso molecular: 388,46
 Mezcla diastereoisómera: 75/25

Tabla 4: Desviaciones químicas de RMN de bengamida (IV), mezcla diastereoisómera, c = 3,1 mg/ml en DMSO, 300 K		
Posición	¹ H	¹³ C
1	-	173,45
2	7,55	-
3	3,35/3,02	45,05
4	3,74	63,48
4-OH	4,60	-

47
48

5	1,81/1,75	34,28
6	1,68/1,64	24,25
7	4,32	51,18
8	7,77	-
9	-	169,63
10	3,70	81,59
10-OMe	3,26	57,30
11	3,58	70,73
11-OH	4,47	-
12	3,34	72,82
12-OH	4,38	-
13	3,97	72,47
13-OH	4,56	-
14	5,37	129,06
15	5,48	136,57
16	1,99	37,41
16-Me	0,93	19,90
17	1,26	29,15
18	0,81	11,58

Ejemplo 15: Caracterización de bengamida E

Fórmula empírica: C₁₇H₃₀N₂O₈

5 Peso molecular: 358,44

Tabla 5: Desviaciones químicas de RMN de bengamida E, c = 3 mg/ml en DMSO, 300 K		
Posición	¹ H	¹³ C
1	-	174,01
2	7,91	-
3	3,19/3,06	40,56
4	1,74/1,20	28,75
5	1,87/1,64	27,56
6	1,87/1,36	30,72

48
99

7	4,39	51,27
8	7,78	-
9	-	169,60
10	3,69	81,61
10-OMe	3,25	57,30
11	3,56	70,74
11-OH	4,49	-
12	3,33	72,78
12-OH	4,38	-
13	3,96	72,38
13-OH	4,57	-
14	5,38	127,68
15	5,58	137,85
16	2,24	30,08
17	0,95	22,27
18	0,95	22,17

Ejemplo 16: Caracterización de bengamida F

- 5 Fórmula empírica: $C_{19}H_{32}N_2O_6$
 Peso molecular: 372,47

Tabla 6: Desviaciones químicas de RMN de bengamida F, c = 3 mg/ml en DMSO, 300 K	
Posición	^1H
1	-
2	2,91
3	3,62/3,21
4	1,69/1,33
5	1,84/1,69
6	1,84/1,33
7	4,56

49
50

8	7,84
9	-
10	3,70
10-OMe	3,25
11	3,57
12	3,33
13	3,97
14	5,38
15	5,59
16	2,25
17	0,95
18	0,95

Ejemplo 17: Separación de los diastereoisómeros del compuesto (II)

La mezcla diastereoisómera del compuesto de la fórmula (II) del Ejemplo 6 se separó en una columna quirál (AD/H, Daicel, 20 x 200 mm, 0,5 ml/min, fase móvil: acetonitrilo:metanol 4:1 + NH₄Ac al 0,1%). La pureza óptica se comprobó en una columna analítica AD/H (Daicel) (4,6 x 250 mm, 30°C, fase móvil: acetonitrilo:metanol 4:1 + NH₄Ac al 0,1%, 0,75 ml/min, pico 1 de Rt: 9,9 min, pico 2 de Rt: 10,9 min).

10

Tabla 7: Desviaciones químicas de RMN de los diastereoisómeros de bengamida (II), c = 3 mg/ml en DMSO, 300 K				
	¹ H (A)	¹ H (B)	¹³ C (A)	¹³ C (B)
1	-	-	173,99	173,99
2	7,91	7,91	-	-
3	3,19/3,06	3,19/3,06	40,56	40,56
4	1,74/1,20	1,74/1,20	28,75	28,75
5	1,87/1,64	1,87/1,64	27,55	27,55
6	1,87/1,36	1,87/1,36	30,72	30,72
7	4,39	4,39	51,27	51,27
8	7,78	7,78	-	-
9	-	-	169,61	169,61

51

10	3,69	3,69	81,60	81,60
10-OMe	3,25	3,25	57,32	57,32
11	3,58	3,58	70,72	70,77
11-OH	4,46	4,47	-	-
12	3,33	3,33	72,80	72,85
12-OH	4,36	4,36	-	-
13	3,97	3,97	72,46	72,37
13-OH	4,56	4,56	-	-
14	5,37	5,38	129,05	129,01
15	5,48	5,49	136,57	136,44
16	1,99	1,99	37,41	37,28
16-Me	0,93	0,92	19,90	19,86
17	1,26	1,26	29,15	29,06
18	0,81	0,82	11,58	11,48

Ejemplo 18: Mediciones de la proliferación celular, realizadas en diversas líneas de células tumorales

Se utilizaron las líneas de células tumorales Hep-G2 (ATCC No. HB-8065) y COLO 205 (ATCC No. CCL-222) para determinar la proliferación celular. Las líneas celulares se sembraron en medio de cultivo celular a una velocidad de 1000 células/pocillo [Hep-G2] y, respectivamente, 3500 células/pocillo [Colo205], y se incubaron durante 4 horas a 37°C y CO₂ al 5%.

Medio para Hep-G2: Medio de Eagle modificado por Dulbecco / mezcla F12 de Ham (Gibco); NEAA (al 10%; aminoácidos no esenciales, Gibco), piruvato sódico (al 1%, Gibco), L-glutamina (al 1%, Gibco), suero de ternero fetal (al 5%; PAA).

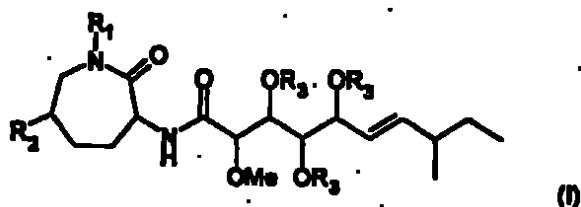
Medio para COLO 205: RPMI 1640 (Gibco), L-glutamina (al 1%, Gibco), HEPES (al 1%, Gibco), suero de ternero fetal (al 10%, PAA).

Después de 4 horas, se agregaron los compuestos (II), (III) y (IV) y las bengamidas E y F, disueltos en DMSO/medio de cultivo celular, en diversas diluciones, y las mezclas se incubaron durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. El contenido intracelular en ATP se determinó usando el reactivo de ensayo CellTiterGlo (Promega).

Los resultados de los ensayos de proliferación celular se ofrecen en la Tabla 1.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I).



5 en la que

R_1 es H o alquilo-(C_1-C_8),

R_2 es H u OH, y

R_3 es H o $-C(=O)$ -alquilo-(C_1-C_8)

o una sal fisiológicamente aceptable del mismo.

10

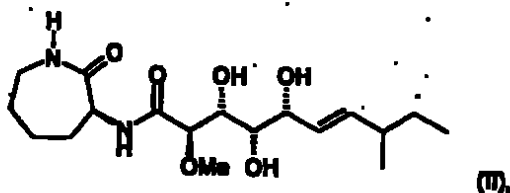
2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R_1 es H o metilo.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que R_3 es H.

15

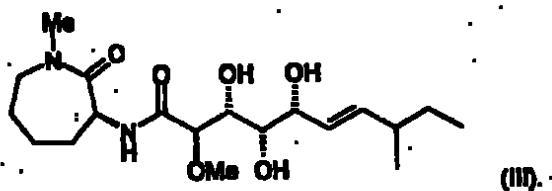
4. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R_1 es H o metilo, R_2 es H u OH, y R_3 es H.

5. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza por un compuesto de la fórmula (II)

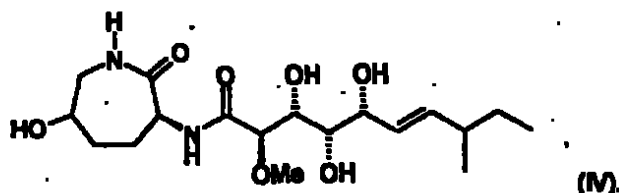


20

6. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 4, que es un compuesto de la fórmula (III)



7. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 4, que es un compuesto de la fórmula (IV)

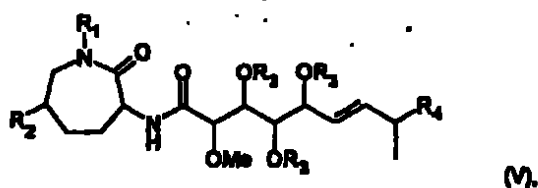


8. El uso de un compuesto de la fórmula (I) o de una sal fisiológicamente aceptable del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un producto farmacéutico.

9. El uso de un compuesto de la fórmula (I) o de una sal fisiológicamente aceptable del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un producto farmacéutico para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades oncológicas.

10. Un producto farmacéutico que contiene al menos un compuesto de la fórmula (I), o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 7.

11. Un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula (V)



en la que

R_1 es H o alquilo-(C_1-C_6),

R_2 es H u OH,

R_3 es H o $-C(=O)$ -alquilo-(C_1-C_6), y

R_4 es metilo o etilo

o una sal fisiológicamente aceptable de un compuesto de la fórmula (V),

que comprende

1. la fermentación de la cepa *Myxococcus virescens* ST200811 (DSM 15898), o una de sus variantes y/o mutantes, bajo condiciones adecuadas en un medio de cultivo hasta que se acumule uno o más de los compuestos de la fórmula (V) en el medio de cultivo,

83
54

2. aislamiento de un compuesto de la fórmula (V) desde el medio de cultivo, y
3. derivatización y/o conversión del compuesto de la fórmula (V) en una sal fisiológicamente aceptable, cuando resulte apropiado.

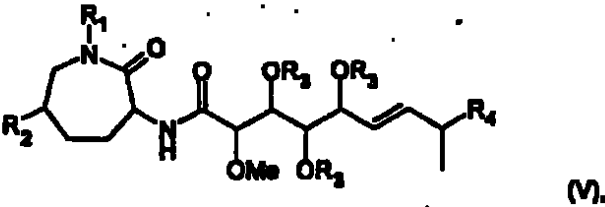
5 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que R₄ es etilo.

13. El procedimiento según la reivindicación 11 ó 12, en el que, de forma independiente entre sí, R₁ es H o metilo, R₃ es H y R₄ es etilo.

10 14. El procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 13, en el que R₂ es OH y en el que el medio de cultivo contiene hidroxilisina.

15. El microorganismo *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898).

15 16. El uso del microorganismo *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), o de un mutante y/o variante del mismo, para preparar un compuesto de la fórmula (V)



en la que

- R₁ es H o alquilo-(C₁-C₆),
- 20 R₂ es H u OH,
- R₃ es H o -C(=O)-alquilo-(C₁-C₆), y
- R₄ es metilo o etilo,
- o una sal fisiológicamente aceptable del mismo.

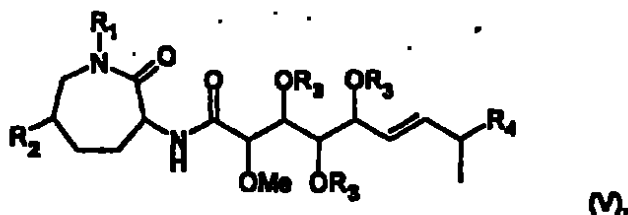
34/5

DERIVADOS DE BENGAMIDA, MÉTODO PARA SU PRODUCCIÓN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

Resumen

5

La invención se refiere a derivados de bengamida formados, durante la fermentación, por el microorganismo *Myxococcus virescens* ST200611 (DSM 15898), a su uso para tratar cáncer, a medicamentos que contienen derivados de bengamida, a un método para preparar bengamidas de la fórmula (V), y al microorganismo *Myxococcus*
10 *virescens* ST200611 (DSM 15898).



PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird

PCT/EP 2004 / 011244

Internationales Aktenzeichen

08.10.2004

Internationales Anmeldedatum

08 OCT 2004

EUROPEAN PATENT OFFICE

PCT INTERNATIONAL APPLICATION

Name des Anmelders und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
(falls gewünscht) (max. 12 Zeichen)

DEAV2003/0070

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Bengamide-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Feld Nr. II ANMELDER

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Aventis Pharma Deutschland GmbH
Brüningstraße 50
65929 Frankfurt
Deutschland

Telefonnr.:
(069) 305-7100

Telefaxnr.: (069) 357175

Fernschreiber:.

Registrierungsnr. Des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):
DESitz oder Wohnsitz (Staat):
DEDiese Person ist Anmelder
für folgende Staaten:☐ Alle Bestimm-
ungsgeländer☒ Alle Bestimmungsgeländer mit Ausnahme der
Vereinigten Staaten von Amerika☐ Nur die Vereinigten
Staaten von Amerika☐ Die im Zusatzfeld
angegabenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

HOFFMANN, Holger
Ernst-Ludwig Strasse 5
64846 Heppenheim
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☐ Anmelder und Erfinder☒ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen
angekreuzt, so sind die nachstehenden
Angaben nicht nötig.)

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für
folgende Staaten:☐ Alle Bestimm-
ungsgeländer☐ Alle Bestimmungsgeländer mit Ausnahme
der Vereinigten Staaten von Amerika☐ Nur die Vereinigten
Staaten von Amerika☐ Die im Zusatzfeld
angegabenen Staaten☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder
vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☐ Anwalt☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Aventis Pharma Deutschland GmbH
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt
Deutschland

Telefonnr.:
(069) 305-7100

Telefaxnr.: (069) 357175

Fernschreiber:.

Registrierungsnr. des Anmelders beim Amt:

☒ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Form PCT/RO/101 (Blatt 1) (Januar 2004)

Siehe Anmerkungen zu diesem Antragsformular

86
57

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.</i>	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i> HAAG-RICHTER, Sabine Hammanstr. 2 60322 Frankfurt Deutschland	Diese Person ist: ☐ Nur Anmelder ☐ Anmelder und Erfinder ☒ Nur Erfinder <i>(wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig)</i> Registrierungnr. des Anmelders beim Amt:
Staatsangehörigkeit (Staat): _____ Sitz oder Wohnsitz (Staat): _____	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ Alle Bestimmungen ☐ Alle Bestimmungen mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ Nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ Die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i> KURZ, Michael Erlenweg 7 65719 Hofheim Deutschland	Diese Person ist: ☐ Nur Anmelder ☐ Anmelder und Erfinder ☒ Nur Erfinder <i>(wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig)</i> Registrierungnr. des Anmelders beim Amt:
Staatsangehörigkeit (Staat): _____ Sitz oder Wohnsitz (Staat): _____	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ Alle Bestimmungen ☐ Alle Bestimmungen mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ Nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ Die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i> TIETGEN, Helko Karolinger Straße 19 55130 Mainz Deutschland	Diese Person ist: ☐ Nur Anmelder ☐ Anmelder und Erfinder ☒ Nur Erfinder <i>(wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig)</i> Registrierungnr. des Anmelders beim Amt:
Staatsangehörigkeit (Staat): _____ Sitz oder Wohnsitz (Staat): _____	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ Alle Bestimmungen ☐ Alle Bestimmungen mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ Nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ Die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i>	Diese Person ist: ☐ Nur Anmelder ☐ Anmelder und Erfinder ☐ Nur Erfinder <i>(wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig)</i> Registrierungnr. des Anmelders beim Amt:
Staatsangehörigkeit (Staat): _____ Sitz oder Wohnsitz (Staat): _____	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ Alle Bestimmungen ☐ Alle Bestimmungen mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ Nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ Die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.	

Feld Nr. V BESTIMMUNGEN

Die Einreichung dieses Antrags umfaßt gemäß Regel 4.9 Absatz a die Bestimmung aller Vertragsstaaten, für die der PCT am internationalen Anmeldedatum verbindlich ist, und insoweit verfügbar, für jede Art von Schutzrecht und sowohl für ein regionales als auch für ein nationales Patent.

Dennoch wird

☐ DE Deutschland nicht für ein nationales Schutzrecht bestimmt

☐ KR Republik Korea nicht für ein nationales Schutzrecht bestimmt

☐ RU Russische Föderation nicht für ein nationales Schutzrecht bestimmt

(Obenstehende Kästchen können angekreuzt werden, um die betreffenden Bestimmungen (unwiderruflich) auszuschließen, um zu vermeiden daß eine frühere nationale Anmeldung, deren Priorität beansprucht wird, nach nationalem Recht ihre Wirkung verliert. Siehe die Anmerkungen zu Feld Nr. V für die Folgen solcher nationalen Rechtsvorschriften in diesen und bestimmten anderen Staaten).

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit in Anspruch genommen:

Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist der frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung:* regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldedatum
Item(1) 24. October 2003 (24.10.2003)	10349669.6[44]	DE		
Item(2)				
Item(3)				

☐ Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.

Das Anmeldedatum wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist (sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldedatum ist):

☐ sämtliche Zeilen ☒ Zeile (1) ☐ Zeile (2) ☐ Zeile (3) ☐ Weitere, siehe Zusatzfeld

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, geben Sie mindestens einen Staat an, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums oder Mitglied der Welthandelsorganisation ist und für den oder das die frühere Anmeldung eingereicht wurde:.....

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherchenzuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

ISA /

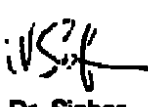
Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr): Aktenzeichen: Staat(oder regionales Amt):

Feld Nr. VIII ERKLÄRUNGEN

Die Felder VIII (i) bis (v) enthalten die folgenden Erklärungen (Kreuzen Sie unten die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte für jede Erklärung deren Anzahl an):			Anzahl der Erklärungen
☐ Feld Nr. VIII (i)	Erklärung hinsichtlich der Identität des Erfinders	:	
☐ Feld Nr. VIII (ii)	Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, ein Patent zu beantragen und zu erhalten	:	
☐ Feld Nr. VIII (iii)	Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen	:	
☐ Feld Nr. VIII (iv)	Erfindererklärung (nur im Hinblick auf die Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika)	:	
☐ Feld Nr. VIII (v)	Erklärung hinsichtlich unschädlicher Offenbarungen oder Ausnahmen von der Neuheitschädlichkeit	:	

Feld Nr. IX KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE		
Diese internationale Anmeldung enthält:		Anzahl
(a) auf Papier, die folgende Anzahl Blätter:		
Antrag (inklusive Erklärungsblätter):	: 4	
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollanteil):	: 25	
Ansprüche:	: 4	
Zusammenfassung:	: 1	
Zeichnungen:	:	
Teilanzahl:	: 34	
Sequenzprotokoll	:	
Diesbezügliche Tabellen (für beide, Anzahl der Blätter, soweit auf Papier eingereicht wird, unabhängig davon, ob zusätzlich auch in computer-lesbarer Form eingereicht wird; siehe unter (c))	:	
Gesamtanzahl:	: 34	
(b) ☐ ausschließlich in computerisierbarer Form (Abschnitt 801 (a)(i))		
(i) ☐ Sequenzprotokolle		
(ii) ☐ diesbezügliche Tabellen		
(c) ☐ auch in computerisierbarer Form (Abschnitt 801 (a)(i))		
(i) ☐ Sequenzprotokolle		
(ii) ☐ diesbezügliche Tabellen		
Art und Anzahl der Datenträger (Diskette, CD-ROM, CD-R oder sonstige) auf denen sich befinden		
☐ Sequenzprotokolle:		
☐ diesbezügliche Tabellen:		
(zusätzliche eingereichte Kopien unter Punkt 9(ii) und/oder 10(ii) in der rechten Spalte angeben)		
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):		
Dieser internationalen Anmeldung liegen die folgenden Anzahl Unterlagen bei (kreuzen Sie die entsprechenden Kästchen an und geben Sie in der rechten Spalte jeweils die Anzahl der beiliegenden Exemplare an)		
1. ☒ Blatt für die Gebührenrechnung		:
2. ☐ Original einer gesonderten Vollmacht		:
3. ☐ Original einer allgemeinen Vollmacht		:
4. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):		:
5. ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift		:
6. ☒ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer(n) gekennzeichnet:		: 1
7. ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:		:
8. ☒ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material		: 2
9. ☐ Sequenzprotokolle in computerisierbarer Form (Art und Anzahl der Datenträger)		:
(i) ☐ Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung)		:
(ii) ☐ (nur falls Felder (b)(i) oder (c)(i) in der linken Spalte angekreuzt wurden) zusätzliche Kopien einschließlich, soweit zutreffend, einer Kopie für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter		:
(iii) ☐ zusammen mit entsprechender Erklärung, daß die Kopie(n) mit dem in der linken Spalte aufgeführten Sequenzprotokollen identisch ist (sind)		:
10. ☐ Tabellen in computerisierbarer Form im Zusammenhang mit Sequenzprotokollen (Art und Anzahl der Datenträger)		:
(i) ☐ Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Abschnitt 802(b-quater) (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung)		:
(ii) ☐ (nur falls Felder (b)(ii) oder (c)(ii) in der linken Spalte angekreuzt wurden) zusätzliche Kopien einschließlich, soweit zutreffend, einer Kopie für die Zwecke der internationalen Recherche nach Abschnitt 802(b-quater)		:
(iii) ☐ zusammen mit entsprechender Erklärung, daß die Kopie(n) mit dem in der linken Spalte aufgeführten Tabellen identisch ist (sind)		:
11. ☐ Sonstige (einzeln auflisten):		:
Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:		deutsch

Feld Nr. X UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS	
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.	
Aventis Pharma Deutschland GmbH	
	
Dr. Wein	Dr. Sieber

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	08 OCT 2004 (08.10.04)
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde ISV (falls zwei oder mehr zuständig sind):	6. ☐ Übermittlung des Recherchenkomplexes bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SANOI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
Patent-und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt
Germany

Date of mailing (day/month/year)

21 March 2006 (21.03.2006)

Applicant's or agent's file reference

DEAV2003/0070

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/EP2004/011244

International filing date (day/month/year)

08 October 2004 (08.10.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

069 / 305-7100

Facsimile No.

069 / 357-175

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

SANOI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

069 / 305-7100

Facsimile No.

069 / 357-175

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Corrected version of Notification Form PCT/IB/306 mailed on 12 December 2005.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.88.70

Authorized officer

V. BLANC

Telephone No. (41-22) 336 8888

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DSMZ 61

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH



INTERNATIONAL FORM

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: ST 200611	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 15898
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2003-09-01 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2003-09-11

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Industriepark Höchst

D-65926 Frankfurt

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Aventis Pharma Deutschland GmbH Address: Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 15898 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2003-09-01	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2003-09-01 ² . On that date, the said microorganism was (x) ³ viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2003-09-11	

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH
Patent-und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt
Germany

Date of mailing (day/month/year) 05 November 2004 (05.11.2004)	
Applicant's or agent's file reference DEAV2003/0070	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2004/011244	International filing date (day/month/year) 08 October 2004 (08.10.2004)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 24 October 2003 (24.10.2003)
Applicant AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
24 Octo 2003 (24.10.2003)	103 49 669.6	DE	27 Octo 2004 (27.10.2004)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.70

Authorized officer

Silvie STENDER

Telephone No. (41-22) 338 8926

64

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 08-038074- -00000-0000 Fea: 2008-04-21 18:48:12
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII Evt 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 63

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 30,672
FECHA : ABRIL 21 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PBO	Vr. PAGO
GUSTAVO HOLLMAN	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	51165593	19/04/2006	2,838,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SOM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

64
65

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-038074-00000-0000 Fac: 2008-04-21 18:48:12
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII Eve 378 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folio: 63



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION () ☒ MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente. ☒	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. ☒	()	()
-Descripción de la invención. ☒	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes. ☒	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas. ☒	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Abel 21 de mayo de 2006.

Fecha:



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-038074-00000-0000 Fax: 2008-04-21 18:48:12
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTE VII Eje 379 FASE NACIONAL
Apt 411 PRESENTACION Folios: 63

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

(seguido de)

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

24-05-2006

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.



SOLICITANTE

(71)

Nombre: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND

ne eohini GMBH

Dirección: Brünigstrasse 50,
65829 Frankfurt, Alemania

Nacionalidad o Domicilio: Frankfurt, Alemania

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUIS PATIÑO LEYVA

Dirección Cra. 11ª No. 94-76 - Of. 308

Teléfono: 6161948

Fax: 6163976

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 2.930.616 TP 2698



INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: HOFFMANN Holger

Dirección: Ernst-Ludwig-Strasse 5,

Nacionalidad o Domicilio: 64646 Heppenheim, Alemania

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/011244

Fecha Octubre 8 de 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/044803 A1

Fecha Mayo 19 de 2005

⑤ Título (54) DERIVADOS DE BENGAMIDA, MÉTODO PARA SU PRODUCCIÓN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.



Clasificación Internacional (51) C07D 223/10, 223/12, A61K 31/55, A61P 35/00

PRIORIDAD:

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Numero de Solicitud

SI



NO



Alemania

Octubre 24, 2003

103 49 669.6

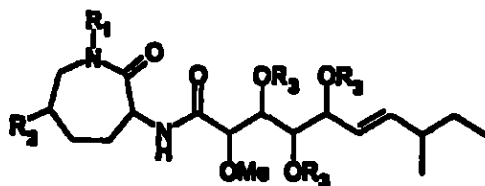
Comprobante de pago No.

Fecha

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

REIVINDICACIONES

- 1 Un compuesto de la fórmula (I)



(I)

- R₁ es H o alquilo-(C₁-C₆)
 R₂ es H u OH y
 R₃ es H o -C(=O)-alquilo-(C₁-C₆)
 o una sal fisiológicamente aceptable del mismo

10

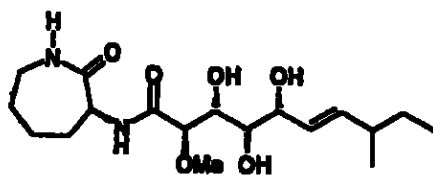
- 2 Un compuesto según la reivindicación 1 en el que R₁ es H o metilo

- 3 Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2 en el que R₃ es H

15

- 4 Un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 3 en el que R₁ es H o metilo R₂ es H u OH y R₃ es H

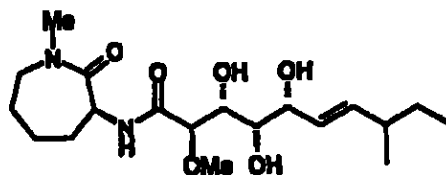
- 5 Un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 4 que se caracteriza por un compuesto de la fórmula (II)



(II)

20

- 6 Un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 4 que es un compuesto de la fórmula (III)



(III)

6560

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
PATIÑO LEYVA LUIS
Apoderado(a) y/o Representante de
AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH

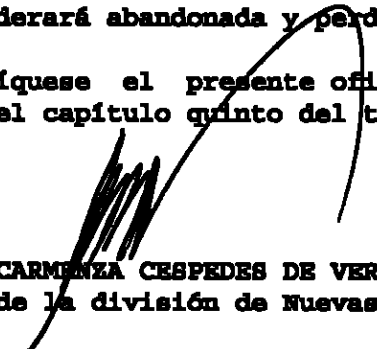
REFERENCIA Radicación No. 06 38074
 Solicitud internacional EP2004/011244
 Fecha inicio fase nacional 24/05/2006
 Trámite 11
 Evento 379
 Actuación 430
 Oficio No. 8440

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04-AGO. 2006 jramos