



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 355 032**

⑫ Número de solicitud: 200930497

⑬ Int. Cl.:

C07H 15/24 (2006.01)	A61K 31/704 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 15/76 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)	A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)	A61P 19/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)	C12R 1/465 (2006.01)
C12R 1/545 (2006.01)	

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **23.07.2009**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2011**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.03.2011

⑱ Solicitante/s: **ENTRECHEM, S.L.**
Edificio Científico Tecnológico
Campus "El Cristo"
33006 Oviedo, Asturias, ES

⑲ Inventor/es: **Salas Fernández, José Antonio;**
García Fernández, Beatriz;
Fernández Braña, Alfredo;
Méndez Fernández, María del Carmen;
González Sabin, Javier;
Pérez Solares, María;
Núñez González, Luz Elena;
Morís Varas, Francisco y
Menéndez Sánchez, Nuria

⑳ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

㉑ Título: **Derivados de ácidos aureólicos, su procedimiento de obtención y sus usos.**

㉒ Resumen:

Derivados de ácidos aureólicos, su procedimiento de obtención y sus usos. La presente invención proporciona una cepa bacteriana que produce compuestos pertenecientes a la familia del ácido aureólico, de aplicación en el tratamiento del cáncer o enfermedades neurológicas.

ES 2 355 032 A1

DESCRIPCIÓN

Derivados de ácidos aureólicos, su procedimiento de obtención y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La invención se adscribe al campo farmacéutico y en concreto se refiere a compuestos con aplicación en oncología, con estructura química derivada de ácidos aureólicos y que se obtienen por fermentación de microorganismos y/o acilación enzimática catalizada por lipasas.

10 **Estado de la técnica**

La familia del ácido aureólico comprende a un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por miembros del género bacteriano *Streptomyces*. Esta familia está integrada por la mitramicina (MTM), las cromomicinas, las olivomicinas, la cromociclomicina, el UCH9 y la durhamicina (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73, 1-14).

15 Los miembros de la familia del ácido aureólico presentan interesantes actividades biológicas de aplicación farmacéutica, tales como propiedades antibacterianas, antivirales y neuroprotectoras, aunque su principal interés farmacológico reside en su actividad antitumoral. Así por ejemplo, la MTM tiene aplicación clínica en el tratamiento de determinados tipos de cáncer, tales como el carcinoma testicular, la leucemia mieloide crónica y la leucemia mieloide aguda. También se ha utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Paget y de la hipercalcemia causada por lesiones óseas asociadas al cáncer (*Oncology* 1973, 28, 147-163; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 195, 1245-1253; *Treat. Endocrinol.* 2002, 1, 241-257; *Treat. Endocrinol.* 2003, 2, 273-292). Además, la MTM y la cromomicina A3 (CRM) se han descrito como potentes inhibidores de la apoptosis neuronal aberrante característica de ciertos desórdenes neurológicos (*Ann. Neurol.* 2001, 49, 345-354), lo que podría convertir a estas moléculas en agentes para el tratamiento de enfermedades neurológicas tales como accidente cerebrovascular, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y encefalitis vírica (*J. Neurosci.* 2004, 24, 10335-10342; *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 16672-16680). Más recientemente, se ha descrito que la MTM en combinación con otros fármacos podría constituir una nueva terapia antiangiogénica para el tratamiento del cáncer de páncreas y otros tipos de cáncer (*Cancer Res.* 2007, 67, 4878- 4885).

30 Las diferentes actividades biológicas de los ácidos aureólicos son consecuencia de su mecanismo de acción a nivel celular, que consiste en la unión no covalente de estas moléculas (en forma de dímeros en presencia de iones Mg^{2+}) al surco menor del ADN en regiones con alto contenido GC. De este modo inhiben la transcripción génica, ya que desplazan a los activadores transcripcionales que se unen a las regiones ricas en GC presentes en determinadas secuencias promotoras (*J. Clin. Invest.* 1989, 83, 2003-2007; *J. Clin. Invest.* 1991, 88, 1613-1621). Tal es el caso de los factores de transcripción Sp1, una familia de proteínas de unión al ADN muy importantes para la transcripción de muchos genes celulares y virales que contienen cajas GC en sus regiones promotoras. Los factores Sp1 regulan múltiples funciones biológicas, incluyendo supervivencia celular, crecimiento y diferenciación, así como desarrollo y progresión tumoral (*J. Cell. Physiol.* 2001, 188, 143-160).

40 Estructuralmente los compuestos del grupo del ácido aureólico poseen una parte cromófora (aglicón) de origen policetónico formada por tres anillos (cuatro en el caso de la cromociclomicina) y una cadena lateral altamente funcionalizada en el carbono 3. También presentan (con excepción de la olivomicina) un alquilo de cadena corta (metilo, isobutilo) en el carbono 7. Asimismo, estos compuestos poseen 2-6 desoxiazúcares unidos en forma de trisacárido o tetrasacárido (en el carbono 2) y monosacárido o disacárido (en el carbono 6). Los compuestos del grupo del ácido aureólico difieren en la naturaleza y el modo de unión de sus cadenas glucídicas, que contienen diferentes 2,6-didesoxiazúcares. Estas variaciones estructurales son las responsables de las sutiles diferencias que existen entre los miembros del grupo en cuanto a su unión al ADN y su perfil de actividad biológica. Es bien conocido que el patrón de glicosilación de los fármacos antitumorales que actúan uniéndose al ADN, como es el caso de los ácidos aureólicos, tiene gran importancia en su actividad biológica. Por ello, la obtención de nuevos derivados de MTM con patrones glicosídicos alterados puede generar fármacos con actividad mejorada.

55 La MTM y la CRM (Figura 1) son los miembros más representativos de la familia del ácido aureólico. La MTM es un fármaco antitumoral producido por microorganismos del género *Streptomyces*, incluyendo *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956. La CRM es producida, entre otros, por *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* ATCC13276. La biosíntesis de MTM y CRM ha sido ampliamente estudiada en las cepas productoras previamente citadas (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73, 1-14). Los agrupamientos génicos responsables de la biosíntesis de ambas moléculas han sido secuenciados íntegramente. Adicionalmente, la inactivación específica de muchos de los genes biosintéticos ha permitido obtener información acerca del mecanismo de biosíntesis de los ácidos aureólicos. Así, se ha descrito que la biosíntesis de estas moléculas comienza con la condensación de 10 unidades de acil-coenzima A para generar un intermediario tetracíclico, denominado premitramicinona. A continuación, 5 unidades de desoxiazúcares son añadidas de forma sucesiva, generándose intermediarios tetracíclicos con diferente grado de glicosilación. La acción de una oxigenasa en uno de los pasos finales de la biosíntesis tiene como consecuencia la ruptura de uno de los anillos, generando una estructura tricíclica con una cadena lateral alifática unida a la posición 3 del aglicón. Finalmente, la reducción de un grupo ceto en la cadena lateral, genera la molécula final.

65 En el caso de la CRM cabe destacar la existencia de dos pasos biosintéticos adicionales que suponen la modificación de los azúcares después de haber sido transferidas al aglicón: una metilación en posición 4B (llevada a cabo por

CmmMIII) y dos acetilaciones en posiciones 4A y 4E (catalizadas por CmmA). La presencia de estos grupos metilo y acetilo en los azúcares de la CRM confiere características específicas a la unión con el ADN, ya que aportan enlaces de hidrógeno adicionales con los grupos amino de las bases de guanina, incrementando así la especificidad en la unión al ADN (*Biochem.* 1997, 36, 2291-2299). La gran importancia de los grupos acetilo en la actividad biológica de la CRM quedó de manifiesto con la inactivación del gen *cmmA* en *S. griseus*, que permitió obtener un derivado desacetilado de la CRM que presenta una actividad antitumoral significativamente inferior a la molécula parental (*Mol. Microbiol.* 2004, 53, 903-915). Por ello, la obtención de nuevos derivados de ácidos aureólicos con distintos patrones de acilación puede generar fármacos con propiedades farmacológicas más interesantes.

Actualmente existe una gran necesidad de nuevos agentes antitumorales, con actividad mejorada, con menos efectos secundarios indeseables y con mayor selectividad, en comparación con los fármacos actualmente en uso. En este sentido, el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha abierto un interesante campo de investigación para la generación de nuevos compuestos bioactivos mediante la manipulación de genes implicados en la biosíntesis de agentes antitumorales, principalmente de bacterias del grupo de los actinomicetos. Estas técnicas también pueden ser usadas para mejorar la producción de compuestos naturales ya conocidos, pues las cepas naturales suelen producir bajas concentraciones del metabolito de interés.

La manipulación genética de microorganismos ha sido ya utilizada para la obtención de nuevos derivados de tipo ácido aureólico (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73, 1-14). Algunos de estos derivados presentan características mejoradas con respecto a la molécula parental. Tal es el caso de los derivados obtenidos a partir de *Streptomyces argillaceus* M7W1, cepa generada a partir de *Streptomyces argillaceus* mediante inactivación del gen *mtmW* (US 7,423,008 B2; *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 5745-5753). El gen *mtmW* codifica una cetorreductasa, y su inactivación da como resultado la acumulación de 3D-desmicarosil-MTM-SK, MTM-SK, MTM-SA y MTM-SDK, moléculas que difieren de la MTM a nivel de la cadena lateral de la posición 3.

La biocatálisis por su parte es una herramienta muy eficaz para modificar productos naturales complejos y generar diversidad estructural (*Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5, 106-111; *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999, 10, 130-136). En particular, el descubrimiento de que tanto lipasas como proteasas (enzimas hidrolíticas de lípidos y proteínas respectivamente) son capaces de catalizar reacciones en disolventes orgánicos distintos a su medio acuoso natural desencadenó una intensa investigación con estos biocatalizadores. Entre sus atractivos fundamentales destacan los excelentes niveles de quimio-, regio- y estereoselectividad exhibidos así como su capacidad para operar en condiciones de reacción suaves. En la literatura existen ejemplos de acilación regioselectiva catalizada por lipasas de una gran variedad de productos naturales polihidroxilados tales como nucleósidos, saponinas, flavonoides, terpenos, alcaloides y policétidos glicosilados. De estas librerías de compuestos acilados han surgido nuevos derivados con una mejora sustancial de actividad respecto a los compuestos originales.

Los ácidos aureólicos presentan en su estructura numerosos grupos hidroxilo susceptible de ser acilados, tanto en los azúcares como en el aglicón. Sin embargo, y a pesar de su potencial evidente, no existen antecedentes de este tipo de acilaciones enzimáticas con esta familia de compuestos.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una nueva cepa bacteriana denominada *Streptomyces argillaceus* Δ AH-W⁻ (pMP3*BII), la cual produce nuevos derivados de MTM. Para la obtención de esta cepa se partió de la cepa recombinante ya existente *Streptomyces argillaceus* Δ AH, un mutante sobreproductor de MTM que presenta inactivados los genes *mtmA* y *mtmH* (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73, 1-14). Sobre este mutante se llevó a cabo posteriormente la inactivación del gen *mtmW*, obteniéndose de esta manera el doble mutante *S. argillaceus* Δ AH-W⁻ (ver ejemplo 1). El gen *mtmW* codifica una cetorreductasa, y su inactivación en la cepa silvestre da como resultado la acumulación de 3D-desmicarosil-MTM-SK, MTM-SK, MTM-SA y MTM-SDK (US 7,423,008 B2; *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 5745-5753). Finalmente, la generación de la cepa *Streptomyces argillaceus* Δ AH-W⁻ (pMP3*BII) implica la introducción de un ácido nucleico adicional en el mutante Δ AH-W⁻.

Concretamente el ácido nucleico utilizado para la presente invención es el contenido en el plásmido pMP3*BII (*Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 6644-6652). Dicho plásmido contiene ácidos nucleicos que codifican enzimas para la biosíntesis de nucleosidildifosfato (NDP)-D-digitoxosa, un azúcar no sintetizado de manera natural por *S. argillaceus*.

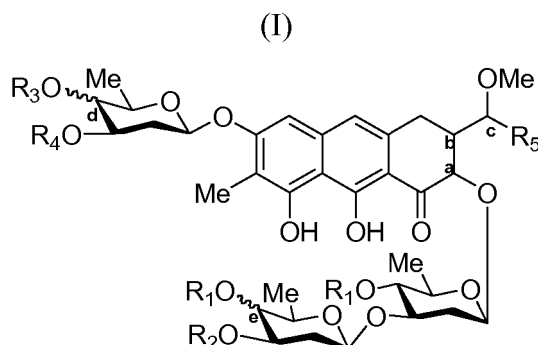
La introducción de ácidos nucleicos en *Streptomyces argillaceus* (o en cepas derivadas) se puede realizar mediante transformación de protoplastos, conjugación, u otros métodos conocidos (tales como lo descritos en Practical *Streptomyces* Genetics, The John Innes Foundation, Norwich, Gran Bretaña, 2000), de tal forma que los ácidos nucleicos son replicables en el organismo, bien en forma de elemento extracromosómico o bien integrados en el cromosoma del organismo. La cepa bacteriana de esta invención pueden ser cultivada en cualquier medio adecuado, en condiciones que permitan su crecimiento, tal como se describe en *Gene* 1996, 172, 87-91; *J. Bacteriol.* 1998, 180, 4929-4937; *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 5745-5753. Tras varios días de incubación, estos cultivos contienen una cantidad elevada de células (micelio), junto con una mezcla de compuestos, incluyendo derivados de ácidos aureólicos. A continuación, los cultivos son sometidos a diferentes procesos para la separación de una fase líquida (sobrenadante) y una fase sólida (micelio). Seguidamente las dos fases son sometidas, separadamente, a diversos procedimientos que pueden incluir extracción con diversos solventes orgánicos, y varios tipos de cromatografías (tales como HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento), con el fin de obtener los derivados de ácidos aureólicos en forma de compuestos puros.

Asimismo, la presente invención proporciona nuevos compuestos pertenecientes a la familia del ácido aureólico, derivados de MTM y CRM. Estos nuevos derivados presentan modificaciones a nivel del patrón de glicosilación y/o acilación con respecto a las moléculas parentales y pueden ser obtenidos mediante a) producción directa de nuevos compuestos llevada a cabo por una cepa modificada genéticamente; b) bioconversión realizada por actividades enzimáticas presentes en un microorganismo sobre sustratos añadidos al medio de cultivo; c) acilación enzimática catalizada por lipasas.

En el sentido de la presente invención se entiende por bioconversión la transformación biológica de un sustrato, llevada a cabo por un microorganismo, a una forma modificada químicamente. Más concretamente, en la presente invención se utiliza el microorganismo recombinante *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* C10GIV (*Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 167-177), para obtener derivados de ácidos aureólicos que presentan variaciones en el perfil de acilación. Esta cepa es capaz de acetilar derivados de MTM añadidos al medio de cultivo por la actividad del enzima CmmA, una aciltransferasa responsable de la modificación de los azúcares de la CRM en posiciones 4A y 4E (*Mol. Microbiol.* 2004, 53, 903-915).

En el sentido de la presente invención se entiende por acilación enzimática la transformación regioselectiva de un sustrato en un derivado acilado a partir de su reacción con un agente acilante catalizada por lipasa. Lipasas útiles para la acilación pueden encontrarse en *Tetrahedron* 2004, 60, 501-519; *Chem. Soc. Rev.* 2004, 33, 201-209; o *Adv. Synth. Catal.* 2006, 348, 797-812. Más concretamente, en la presente invención se utiliza la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) y la lipasa A de *Candida antarctica* (CAL-A), para obtener derivados de ácidos aureólicos acilados tanto en los azúcares como en el aglicón. Estas lipasas se presentan en diferentes formas de inmovilización sobre soportes hidrófobos y mecánicamente resistentes o sobre resinas acrílicas, como puede ser una resina epoxiacrítica activada con grupos deca-octilo. Agentes acilantes útiles para la presente invención son aquellos que pueden actuar como sustratos de la lipasa utilizada dando lugar a la acilación del ácido aureólico, y pueden ser ésteres, carbonatos y anhídridos. Preferiblemente, el agente acilante y el disolvente son el mismo, a excepción de aquellos casos en que el ácido aureólico es poco soluble en el agente acilante o éste último es un sólido, en cuyo caso se facilita la disolución con un pequeño volumen de tetrahidrofurano. En general la temperatura debe mantener la estructura de la enzima intacta sin que se produzcan fenómenos de desnaturalización. La reacción puede llevarse a cabo entre 5 y 60°C, preferiblemente entre 10 y 60°C, más preferiblemente entre 20 y 50°C.

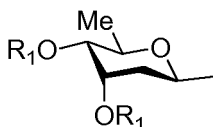
Asimismo, la presente invención proporciona compuestos caracterizados por la fórmula general (I):



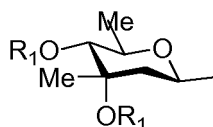
donde,

R₁ es hidrógeno o un grupo protector,

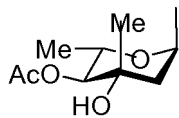
R₂ es hidrógeno, o un grupo protector, o un monosacárido de fórmula (II),



o un monosacárido de fórmula (III),

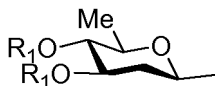


o un monosacárido de fórmula (IV),

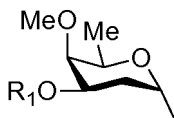


R_3 es hidrógeno o un grupo acetilo,

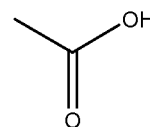
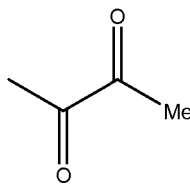
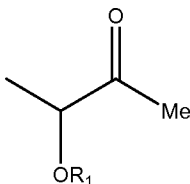
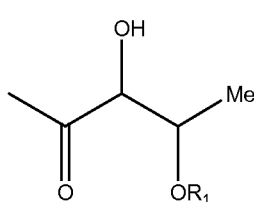
R_4 es un monosacárido de fórmula (V),



o un monosacárido de fórmula (VI)

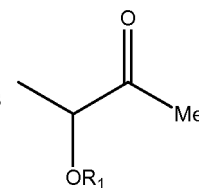


R_5 puede ser seleccionado entre los siguientes sustituyentes:



teniendo en consideración que si R_2 es el monosacárido de fórmula (III) o el monosacárido de fórmula (IV), al me-

nos un R_1 debe ser un grupo protector, y considerando igualmente que si R_2 es hidrógeno y R_5 es



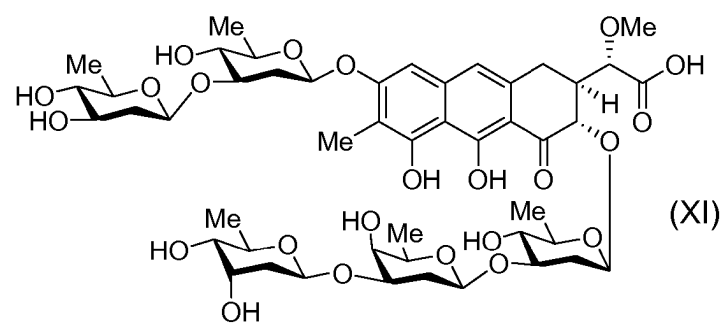
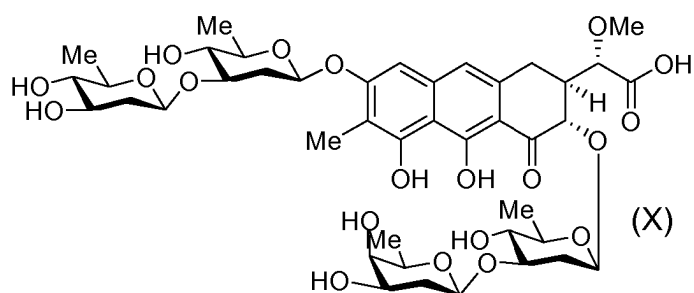
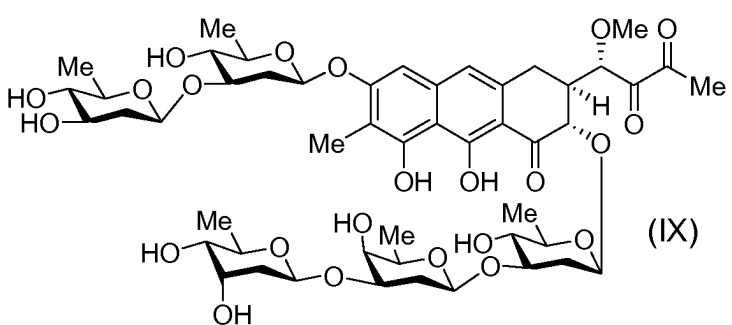
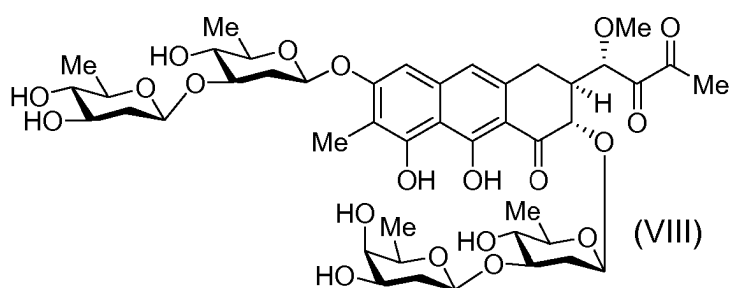
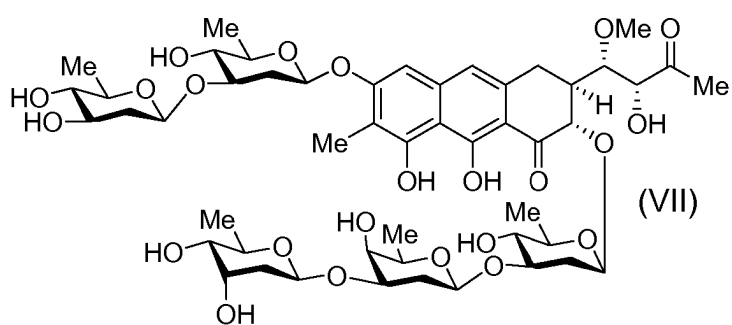
entonces, al menos un R_1 debe ser un grupo protector.

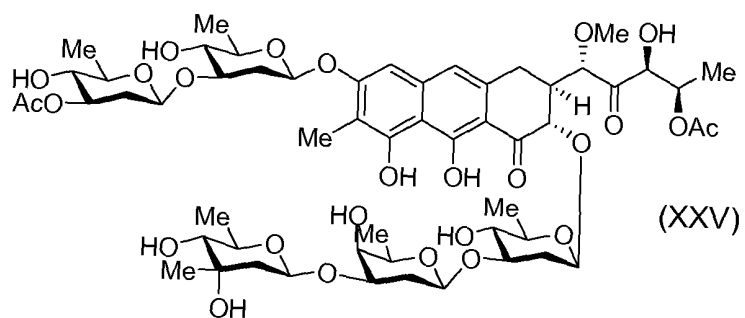
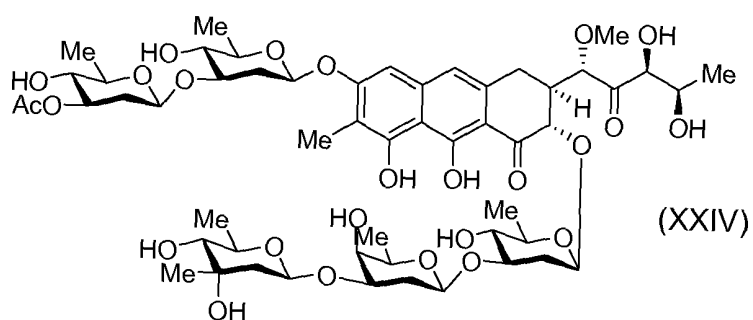
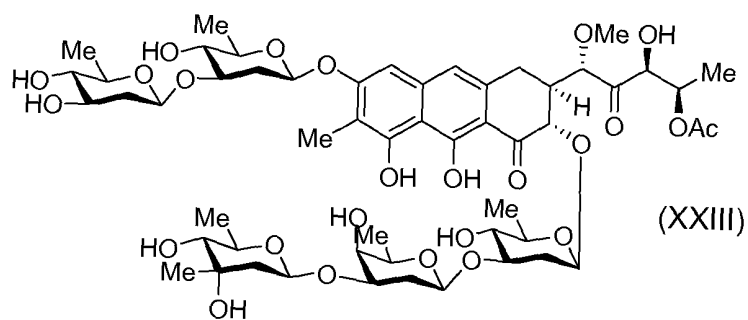
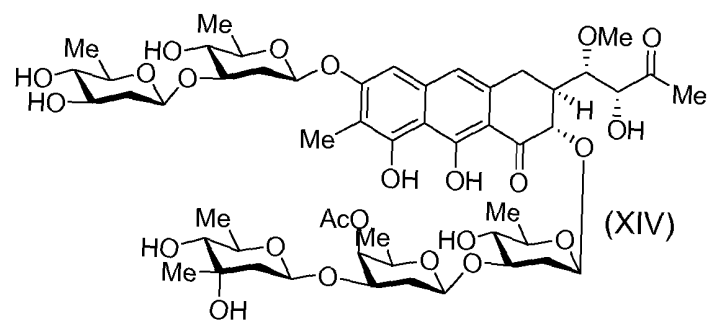
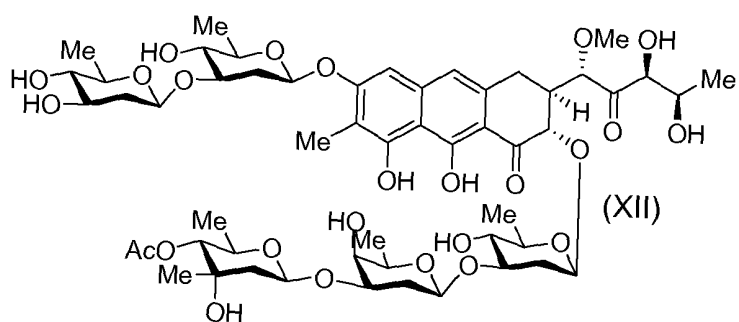
Un grupo protector comprende, pero no está limitado a, un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalquilo heterocíclico, un grupo hidroxialquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo alcoxialquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo alquilarilo, un grupo éster, un grupo carbonato, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo uretano, un grupo sililo, un grupo sulfoxo o una combinación de ellos.

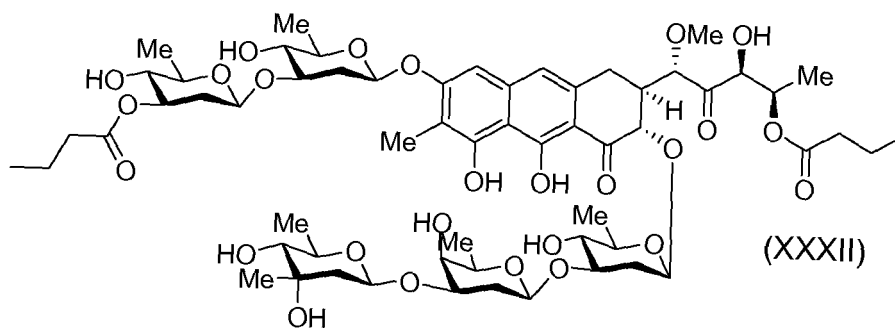
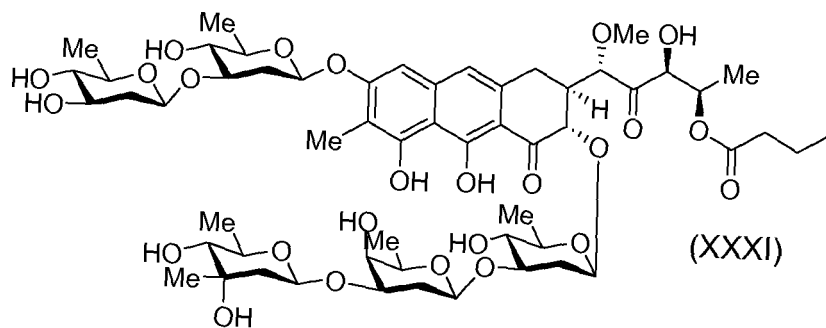
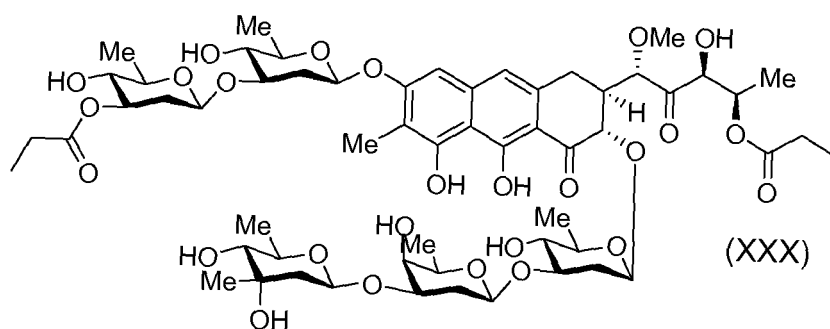
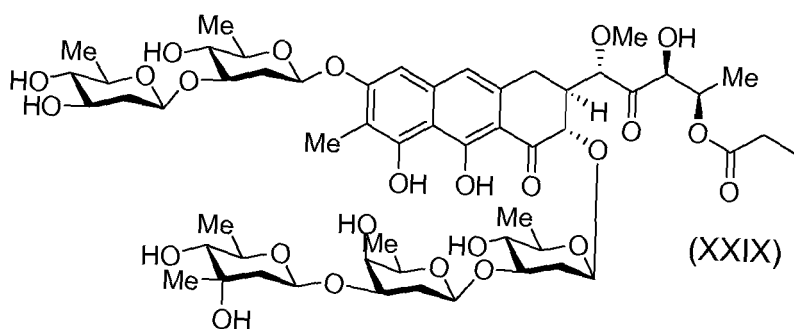
La estereoquímica de los carbonos a, b y c, así como la de los centros quirales presentes en R_5 puede ser *R*, *S*, o una mezcla de ambos.

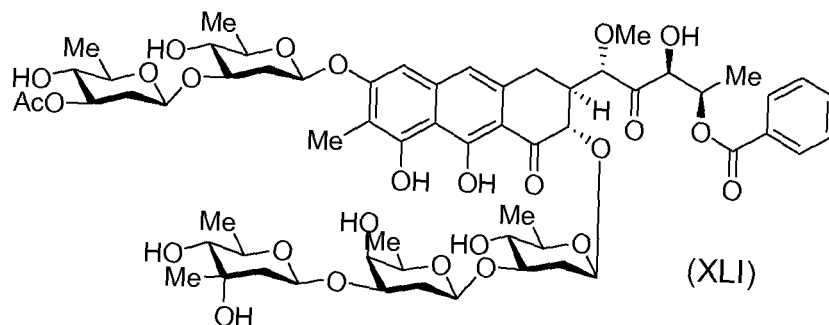
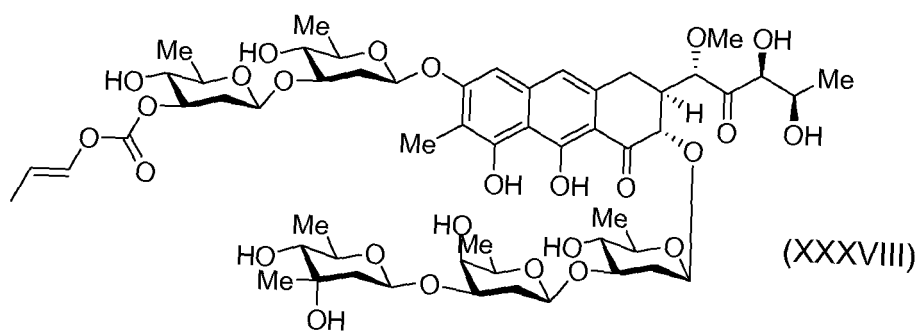
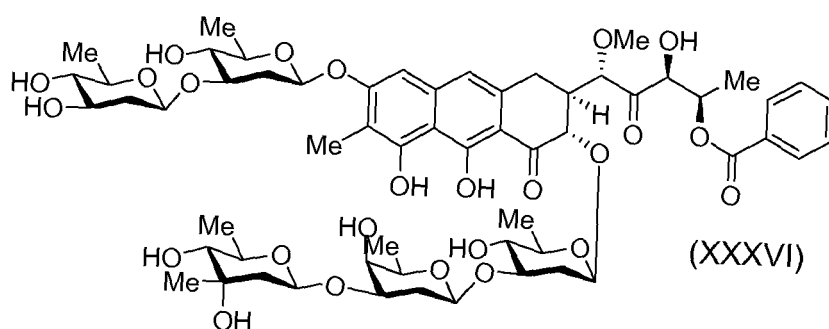
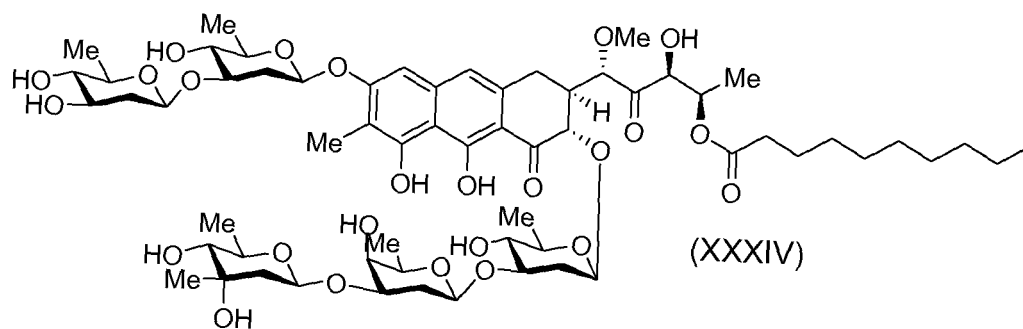
A los efectos de la presente invención y su descripción, los dos enlaces ondulantes presentes en la fórmula general (I) sobre los carbonos d y e indican que los correspondientes sustituyentes pueden estar tanto en posición axial como en ecuatorial.

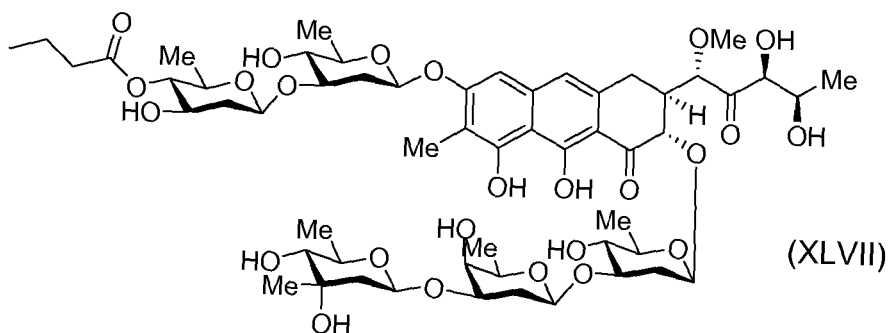
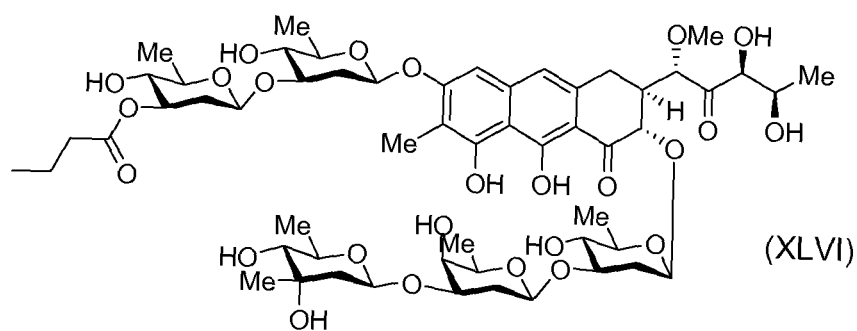
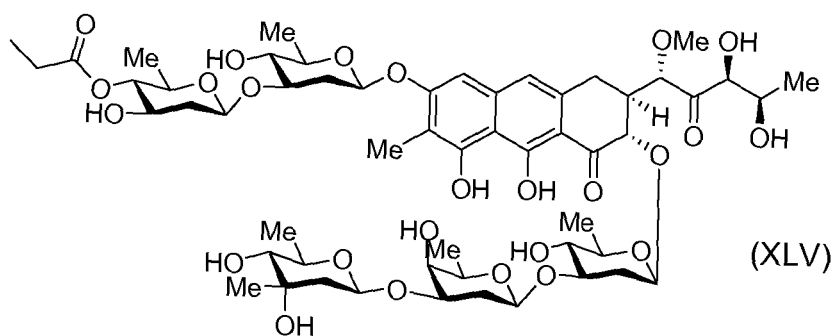
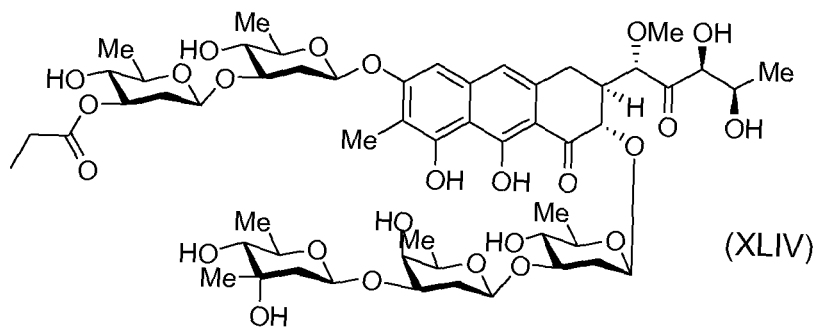
En particular, la presente invención proporciona, entre otros, los compuestos con las fórmulas (VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIV, XXIII, XXIV, XXV, XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIV, XXXVI, XXXVIII, XLI, XLIV, XLV, XLVI, XLVII, XLVIII, XLIX, LI, LII, LIII, LIV, LV, LVI, LVII, LVIII, LXI, LXIX, LXXX, XCII, XCIII, XCIV, XCV)

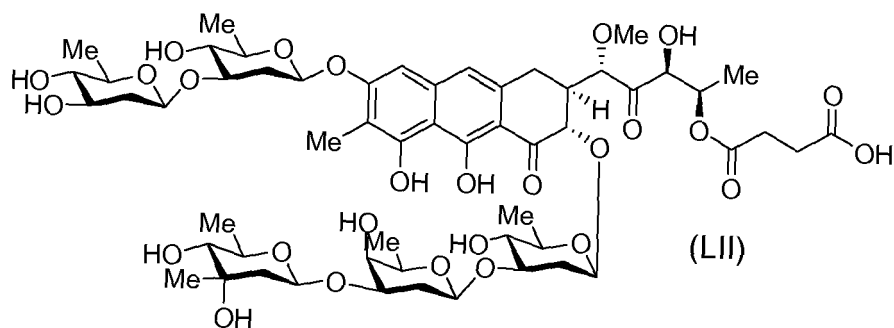
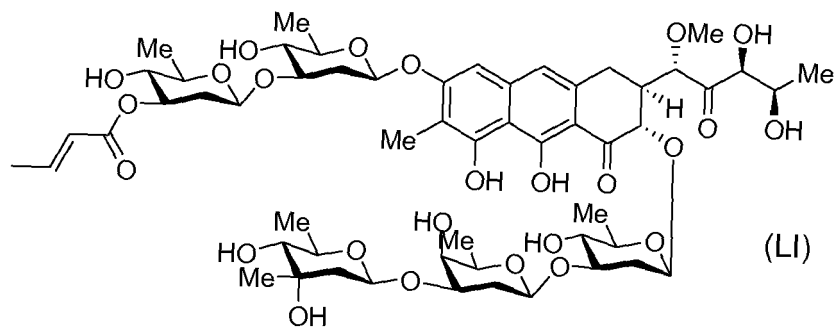
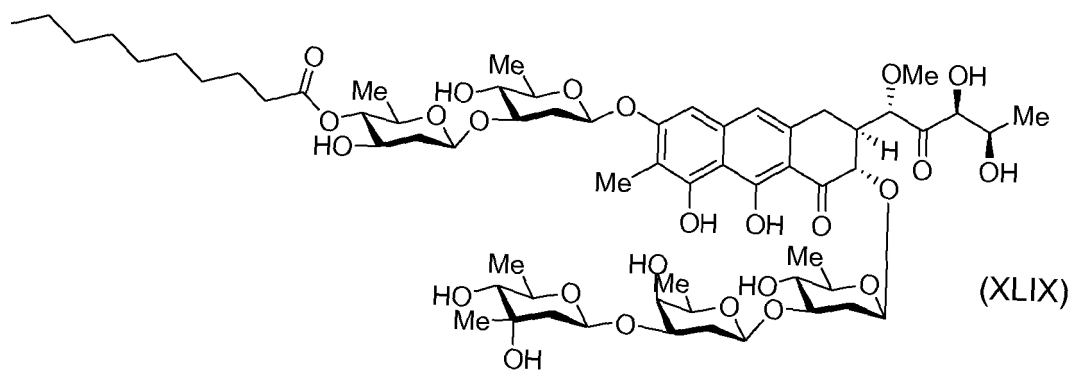
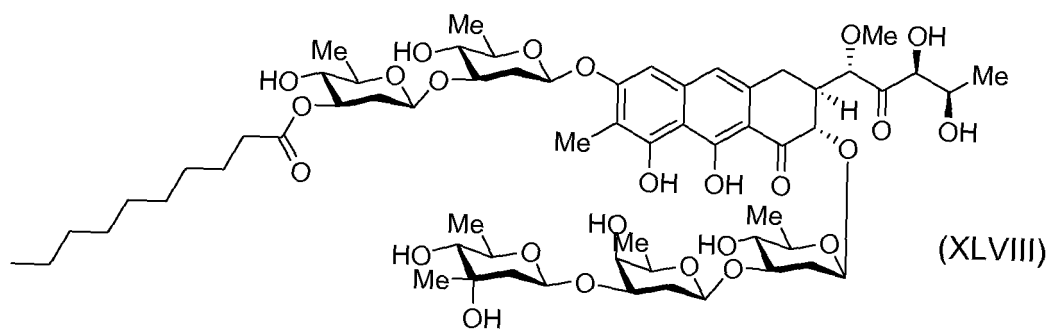


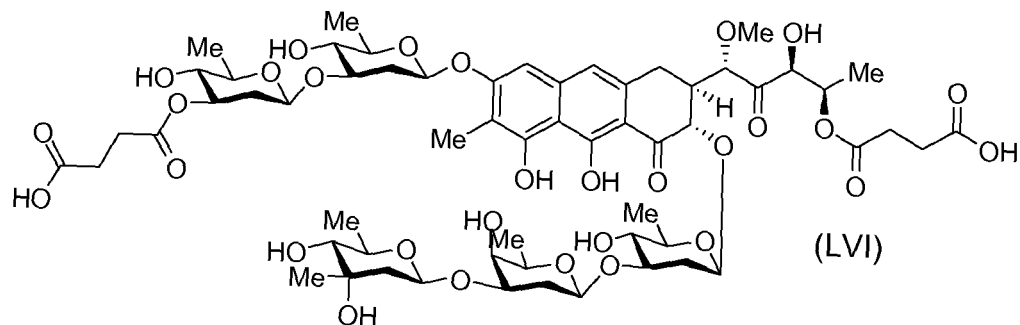
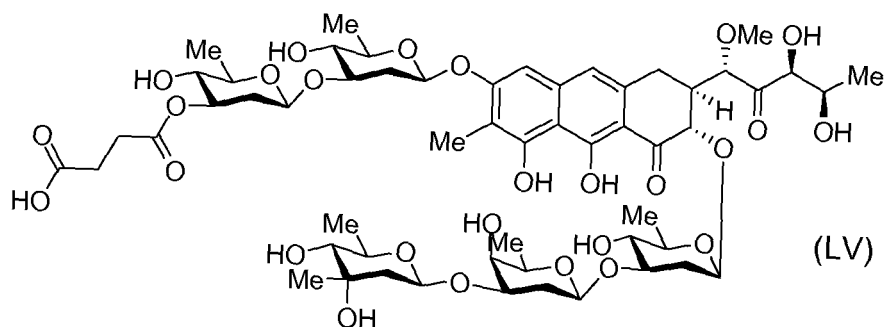
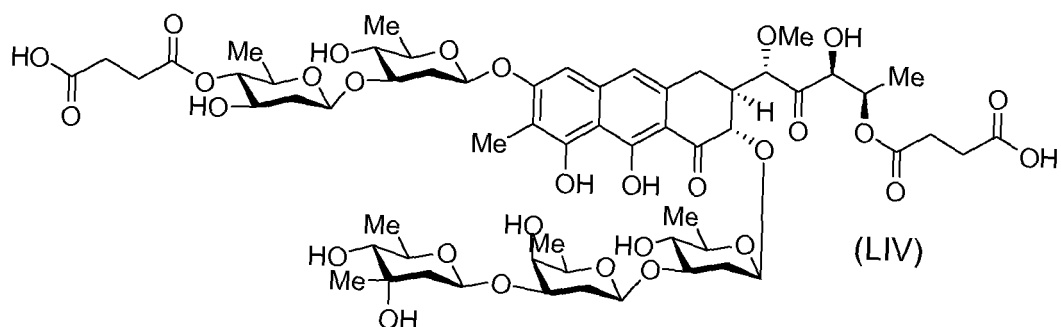
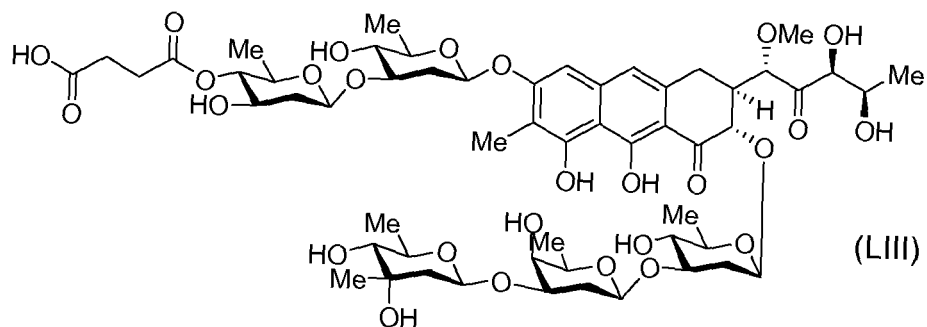


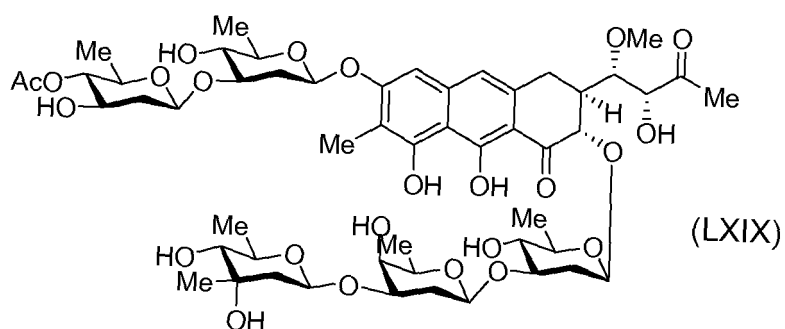
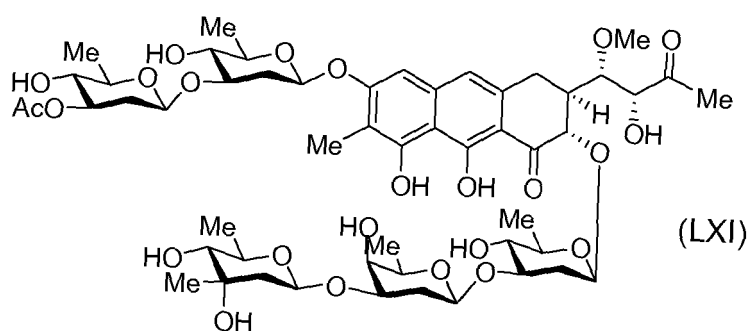
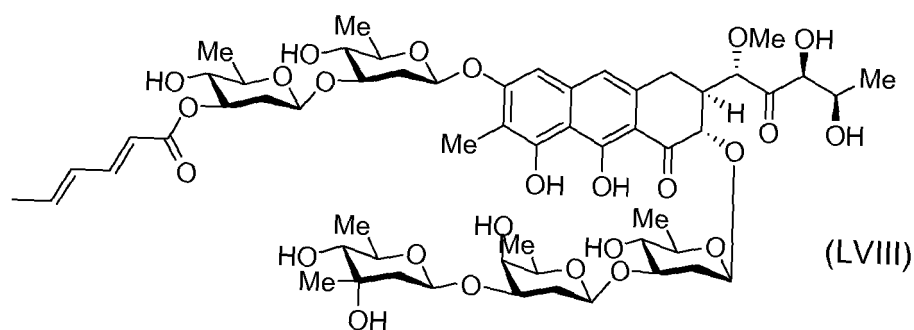
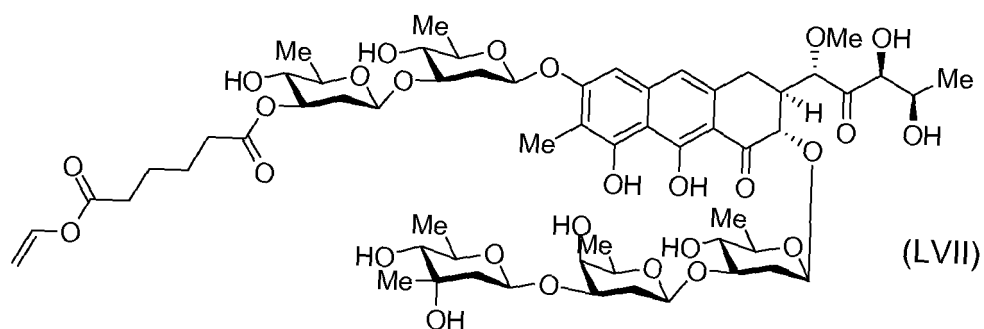


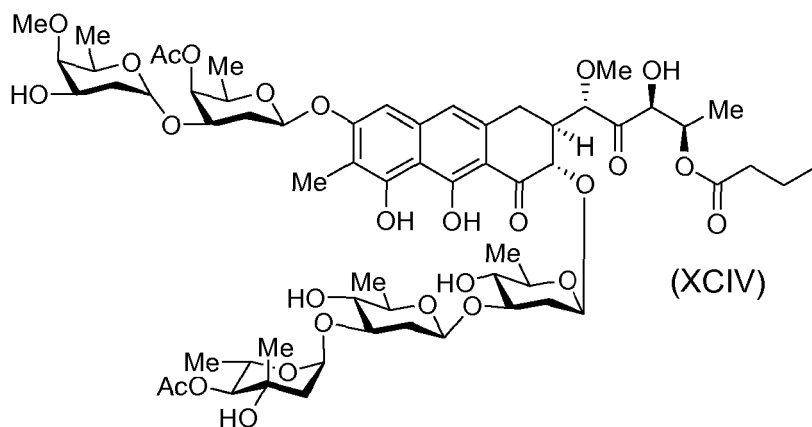
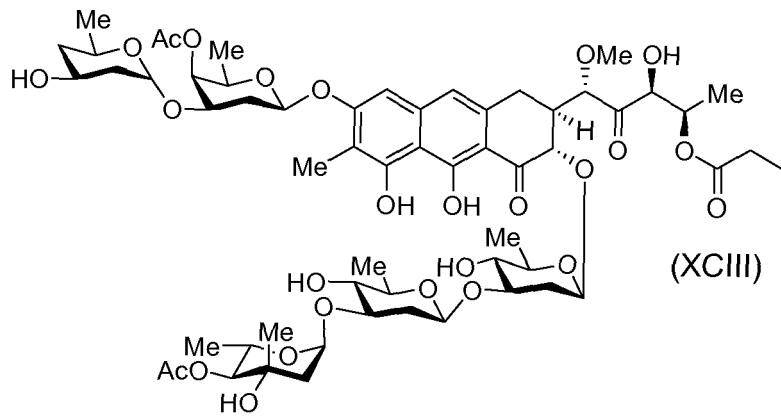
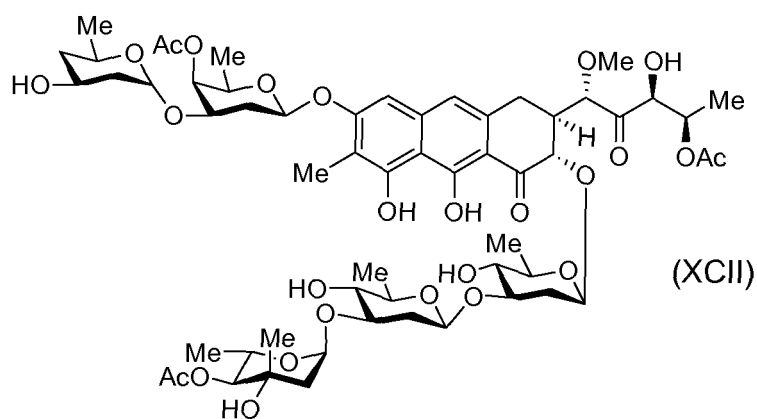
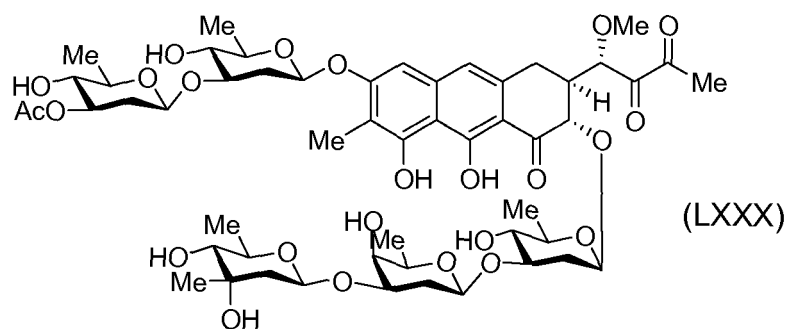


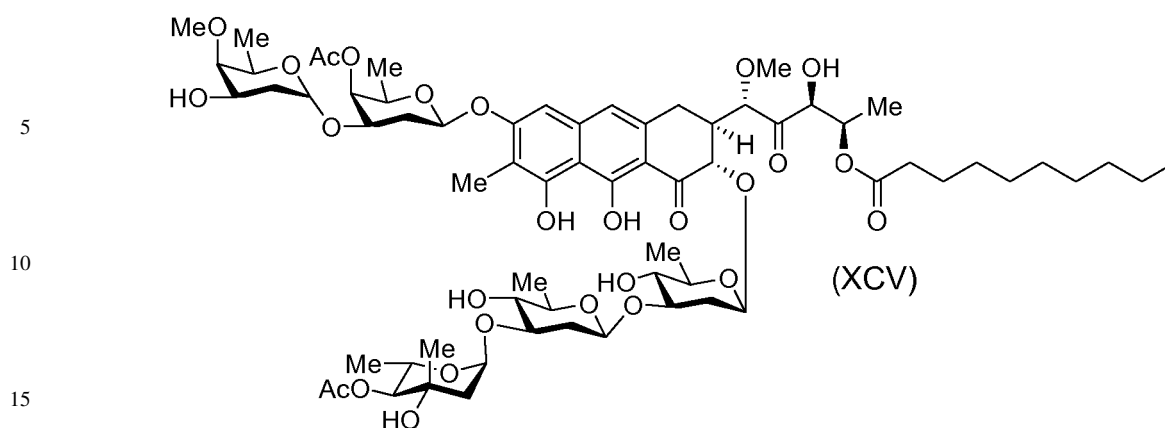












20 Los compuestos de la invención son inhibidores del crecimiento de tumores y son por tanto útiles en el tratamiento del cáncer.

25 De esta forma, son objeto de la presente invención las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la manufacturación de un medicamento.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para inhibir el crecimiento de un tumor.

30 Tal como es usado aquí, “inhibir” significa disminuir, hacer más lento, o detener. Por tanto, un compuesto de esta invención puede disminuir, hacer más lento, o detener el crecimiento de una célula tumoral. Tal como es usado aquí, “crecimiento” significa aumento en tamaño, o proliferación, o ambos. Por tanto, un compuesto de esta invención puede inhibir el aumento de tamaño de una célula tumoral y/o puede impedir que la célula tumoral se divida y aumente el número de células tumorales. Una “célula tumoral” es una célula que constituye un neoplasma (crecimiento nuevo), el cual puede ser canceroso (maligno) o no canceroso (benigno). Una célula tumoral cancerosa puede invadir los tejidos normales a su alrededor y los vasos sanguíneos/linfáticos y formar metástasis en tejidos alejados del tumor original. Por el contrario, una célula tumoral no cancerosa puede crecer y comprimir los tejidos normales adyacentes pero no puede invadir tejidos normales y vasos sanguíneos/linfáticos, y tampoco puede formar metástasis en tejidos alejados del tumor original.

40 Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para tratar el cáncer.

45 Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la manufacturación de un medicamento con actividad antitumoral.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la manufacturación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

50 Es también objeto de la presente invención un método de tratamiento de un sujeto, incluyendo un ser humano, diagnosticado con cáncer, que consiste en tratar a dicho sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 Tal como es usado aquí, un “sujeto” puede incluir animales domesticados (por ejemplo, gatos, perros, etc.), ganado (por ejemplo, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, cobayas, etc.) y pájaros. De manera preferente, el sujeto es un mamífero tal como un primate y, con mayor preferencia, un ser humano.

60 En general, una “cantidad efectiva” de un compuesto es aquella cantidad necesaria para conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, la cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención trata el cáncer mediante la inhibición del crecimiento de las células que constituyen el tumor, con lo que previene la invasión de tejidos normales y vasos sanguíneos/linfáticos por parte de las células tumorales y, por tanto, previene metástasis. Ejemplos de cánceres que pueden ser tratados incluyen, pero no están limitados a, pulmón, colon, ovario, próstata, testículo, melanoma, riñón, mama, sistema nervioso central y leucemia. La expresión “composición farmacéutica aceptable” consiste en un material adecuado biológicamente, es decir, que el material puede ser administrado al sujeto sin causarle efectos biológicos sustancialmente dañinos.

Las dosis o cantidades de los compuestos de la invención deben ser suficientemente grandes para producir el efecto deseado. Sin embargo, la dosis no debe ser tan grande que cause efectos secundarios adversos, por ejemplo reacciones cruzadas indeseadas, reacciones anafilácticas, y similares. Generalmente, la dosis variará con la edad, condición, sexo y el grado de la enfermedad del sujeto, y puede ser determinada por cualquier experto en la materia. La dosis puede ser ajustada por cada médico, en base a la condición clínica del sujeto implicado. La dosis, régimen de dosificación y ruta de la administración pueden variarse. Las dosis y el régimen de dosificación actualmente empleados para la MTM proporcionan una guía para las dosis y el régimen de dosificación que pueden emplearse para los nuevos derivados de ácidos aureólicos (ver por ejemplo *Cancer Treat. Rep.* 1979, 63, 1835-1838; *Ann. Intern. Med.* 1975, 83, 659-660).

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la manufacturación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Paget.

Es también objeto de la presente invención un método de tratamiento de un sujeto, incluyendo un ser humano, diagnosticado con la enfermedad de Paget, que consiste en tratar a dicho sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, y el compuesto puede ser, entre otras vías, administrado parenteralmente.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la manufacturación de un medicamento para el tratamiento de la hipercalcemia.

Es también objeto de la presente invención un método de tratamiento de un sujeto, incluyendo un ser humano, diagnosticado con hipercalcemia, que consiste en tratar a dicho sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, y el compuesto puede ser, entre otras vías, administrado parenteralmente.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la manufacturación de un medicamento para el tratamiento de la hipercalcemia.

Es también objeto de la presente invención un método de tratamiento de un sujeto, incluyendo un ser humano, diagnosticado con hipercalcemia, que consiste en tratar a dicho sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, y el compuesto puede ser, entre otras vías, administrado parenteralmente.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la manufacturación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Es también objeto de la presente invención un método de tratamiento de un sujeto, incluyendo un ser humano, diagnosticado con una enfermedad neurológica, que consiste en tratar a dicho sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, y el compuesto puede ser, entre otras vías, administrado parenteralmente.

Ejemplos de enfermedades neurológicas que pueden ser tratadas incluyen, pero no están limitados a, enfermedades neurodegenerativas tales como las de Parkinson, Alzheimer, y Huntington.

Los compuestos de la invención pueden ser útiles para la investigación en bioquímica o biología celular. Por ejemplo, los compuestos pueden ser útiles para bloquear la expresión de c-Src (y otros enzimas dependientes de Sp1) en osteoclastos u otros tipos celulares.

Cualquiera de los compuestos de la invención puede ser utilizado terapéuticamente formando parte de una composición farmacéutica aceptable. Cualquier experto en la materia puede crear composiciones farmacéuticas aceptables, las cuales pueden consistir en soluciones estériles en agua, soluciones salinas, o soluciones tamponadas a pH fisiológico. Cualquiera de los compuestos de la invención puede ser preparado en forma de composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir diversos agentes transportadores, espesantes, diluentes, tampomantes, conservantes, tensoactivos, y otros, además del compuesto de la invención. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también ingredientes activos tales como agentes antimicrobianos, antiinflamatorios, anestésicos, etc.

Los compuestos de la invención pueden ser administrados al sujeto de varias maneras distintas, dependiendo de si se desea que el tratamiento sea local o sistémico, y dependiendo del área a ser tratada. Así por ejemplo, un compuesto de la presente invención puede ser administrado en forma de solución oftálmica, de aplicación en la superficie del ojo. Además un compuesto puede ser administrado a un sujeto por vía vaginal, rectal, intranasal, oral, por inhalación, o por vía parenteral, ya sea por ruta intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrarrectal, intraarterial, intralinfática, intravenosa, intratecal e intratraqueal. La administración parenteral, si se emplea, se realiza generalmente

mediante inyección. Los inyectables pueden ser preparados de diversas formas, tales como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para ser disueltas o puestas en suspensión antes de la inyección, o como emulsiones. Otras formas de administración parenteral emplean sistemas de liberación lenta o sostenida, de tal forma que se consigue mantener una dosis constante (ver, por ejemplo, patente US 3,710,795). Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones, y emulsiones, que además pueden contener tampones y aditivos diluentes y otros. Ejemplos de solventes no acuosos son: propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como etiloleato. Ejemplos de solventes acuosos son: agua, soluciones alcohólico-acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo soluciones salinas y tamponadas. Ejemplos de vehículos parenterales son: solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, etc. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes, etc. Las formulaciones para administración tópica pueden incluir cremas, lociones, geles, gotas, supositorios, sprays, líquidos y polvos. También pueden ser necesarios o deseables ciertos transportadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, oleosas, o en polvo, espesantes, etc. Las composiciones para administración oral pueden incluir polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, o tabletas. Puede ser deseable la inclusión de agentes espesantes, saborizantes, diluentes, emulsionantes, dispersantes, etc.

A los efectos de la presente invención y su descripción, el término “derivado” de ácidos aureólicos debe interpretarse como un compuesto cubierto por la fórmula general (I).

Explicación de una forma de realización preferente

Para una mejor comprensión de la presente invención, se exponen los siguientes ejemplos, descritos en detalle, que deben entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Obtención de la cepa bacteriana *Streptomyces argillaceus* Δ AH-W⁻ (pMP3*BII)

En el presente ejemplo se emplean técnicas de Biología Molecular convencionales en el actual estado de la técnica. Las preparaciones de plásmidos, aislamiento de ADN total, digestiones con enzimas de restricción, tratamientos con fosfatasa alcalina, ligaciones de ADN, etc., se llevaron a cabo siguiendo métodos estandarizados previamente descritos por Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), y por Kieser y colaboradores (Practical *Streptomyces* genetics, The John Innes Foundation, Norwich, England, 2000). Los fragmentos de ADN fueron aislados de geles de agarosa utilizando el kit de extracción “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) La cepa *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen) se utilizó como huésped general de clonación.

Las cepas derivadas de *S. argillaceus* descritas en la presente invención se cultivaron para su esporulación en medio A (*J. Bacteriol.*, 180, 4929-4937, 1998) a 30°C; para la producción de antibiótico se cultivaron en medio R5A (*J. Bacteriol.*, 180, 4929-4937, 1998), utilizando un inóculo previamente obtenido de un cultivo en medio TSB (Merck). La introducción de ADN en cepas de *Streptomyces* se llevó a cabo mediante transformación de protoplastos (Practical *Streptomyces* genetics, The John Innes Foundation, Norwich, England, 2000). Para el cultivo de cepas conteniendo marcadores de resistencia, los medios de cultivo fueron suplementados con los antibióticos apropiados en cada caso a las concentraciones siguientes: 100 μ g/ml ampicilina, 25 μ g/ml tiostreptona (en medio sólido), 5 μ g/ml tiostreptona (en medio líquido) y 100 μ g/ml higromicina.

La generación de la cepa bacteriana *Streptomyces argillaceus* Δ AH-W⁻ (pMP3*BII) se llevó a cabo en dos etapas:

1.1. Obtención de la cepa mutante *S. argillaceus* Δ AH-W⁻.

1.2. Introducción del plásmido pMP3*BII en la cepa *S. argillaceus* Δ AH-W⁻.

1.1. Obtención de la cepa mutante *S. argillaceus* Δ AH-W⁻

La caracterización de la ruta de biosíntesis de MTM implicó la generación de cepas mutantes que presentasen inactivados de manera selectiva diferentes genes identificados en el agrupamiento génico. Una de dichas cepas fue *S. argillaceus* Δ AH, un mutante generado por reemplazamiento génico en el cual se inactivaron conjuntamente los genes *mtmA* y *mtmH*. MtmA es una proteína de fusión que presenta un dominio S-adenosilmetionina sintetasa y otro metilentetrahidrofolato reductasa; por su parte, MtmH es similar a S-adenosilhomocisteína hidrolasas (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73, 1-14). Este tipo de enzimas están relacionados con la síntesis de S-adenosilmetionina, cofactor utilizado por las metiltransferasas que participan en la biosíntesis de MTM (*J. Biol. Chem.* 2000, 275, 3065-3074). Sin embargo, a pesar del papel asignado previamente a estos dos genes, el mutante *S. argillaceus* Δ AH resultó no estar afectado en el perfil de metilación de los productos acumulados, ya que seguía produciendo MTM, y además a niveles sustancialmente superiores a los de la cepa silvestre, lo cual sugiere un papel regulador de uno o ambos genes

en la biosíntesis de MTM (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73, 1-14). La obtención del mutante *S. argillaceus* Δ AH y los análisis de la producción se describen detalladamente en la Tesis Doctoral: "Biosíntesis de mitramicina por *Streptomyces argillaceus*: caracterización de genes implicados en la metilación de la estructura policetídica" (María José Fernández Lozano, 1999).

Sobre la cepa sobreproductora de MTM *S. argillaceus* Δ AH se llevó a cabo la inactivación del gen *mtmW*, un gen que codifica una cetorreductasa que participa en la reducción en la cadena lateral y que constituye el paso final en la biosíntesis de MTM. La inactivación previa de *mtmW* en *S. argillaceus* ATCC12956 permitió obtener la cepa mutante M7W1, la cual acumula nuevos derivados de MTM que presentan diferencias a nivel de la cadena lateral: 3D-desmicarosil-MTM-SK, MTM-SK, MTM-SDK y MTM-SA (US 7,423,008 B2; *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 5745-5753).

Para inactivar *mtmW* en el mutante *S. argillaceus* Δ AH se sustituyó en el cromosoma de dicho mutante la copia activa del gen *mtmW* por otra modificada *in vitro*. Para ello, se abordó el siguiente experimento de reemplazamiento génico: un fragmento de ADN *Bam*HI de 4.5 kb conteniendo el extremo 3' de *mtmV*, los genes *mtmW*, *mtmGIV* y el extremo 5' de *mtmGIII* se clonó en el vector pBSKT (*J. Bacteriol.* 1999, 181, 642-647) digerido con *Bam*HI, generando la construcción pM7W0 (*J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 5745-5753). A continuación se clonó un gen de resistencia a higromicina en un sitio de restricción *Bgl*III (previamente hecho romo mediante tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa) interno a *mtmW* y único en pM7W0, obteniéndose así el plásmido pW0Hyg1. En este plásmido el gen de resistencia a higromicina está clonado en el mismo sentido de la transcripción que *mtmW*. El gen de resistencia a higromicina fue obtenido del vector pLHyg (*Chem. Biol.* 2004, 11, 87-97) mediante digestión con *Eco*RV.

El plásmido pW0Hyg1 fue introducido en *S. argillaceus* Δ AH mediante transformación de protoplastos según ha sido descrito (Practical *Streptomyces* genetics, The John Innes Foundation, Norwich, England, 2000). Para obtener el reemplazamiento de la copia silvestre del gen por la mutada es necesario un doble sobrecruzamiento. Los transformantes en los que había ocurrido un acontecimiento de doble sobrecruzamiento fueron seleccionados por su resistencia a higromicina (100 μ g/ml) y su sensibilidad a tiostreptona (25 μ g/ml). Entre estos transformantes, uno de ellos fue seleccionado para continuar su caracterización, correspondiendo a la cepa *S. argillaceus* Δ AH-W⁻.

Posterior análisis por HPLC-MS de extractos de cultivos de la cepa *S. argillaceus* Δ AH-W⁻ mostraron que dicha cepa había perdido la capacidad de producir MTM, acumulando en su lugar los derivados previamente caracterizados 3D-desmicarosil-MTM-SK, MTM-SK, MTM-SDK y MTM-SA.

1.2. Introducción del plásmido pMP3*BII en la cepa *S. argillaceus* Δ AH-W⁻

La cepa *S. argillaceus* Δ AH-W⁻ (pMP3*BII) se generó introduciendo, mediante transformación de protoplastos, el plásmido pMP3*BII en *S. argillaceus* Δ AH-W⁻. El plásmido pMP3*BII ha sido descrito con anterioridad, y contiene una serie de genes que codifican la biosíntesis de nucleosíldifosfato (NDP)-D-digitoxosa (*Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 6644-6652).

La cepa *Streptomyces argillaceus* Δ AH-W⁻ (pMP3*BII) fue depositada con fecha 04/06/2009 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot (Valencia, España) con el número de identificación CECT 7556.

Ejemplo 2

Producción y aislamiento de 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SK (fórmula VII), 3D-desmicarosil-MTM-SDK (fórmula VIII), 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SDK (fórmula IX), 3D-desmicarosil-MTM-SA (fórmula X), 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SA (fórmula XI)

Para la purificación de los nuevos derivados de MTM-SK, MTM-SDK y MTM-SA producidos por *S. argillaceus* Δ AH-W⁻ (pMP3*BII), se cultivó esta cepa en medio R5A sólido (*J. Bacteriol.* 1998, 180, 4929-4937) suplementado con tiostreptona (concentración final 25 μ g/ml). De este modo, se sembraron uniformemente 150 placas de agar con esporas de la cepa recombinante Δ AH-W⁻ (pMP3*BII). Tras 10 días de incubación a 30°C, los cultivos se extrajeron 6 veces con acetato de etilo y los extractos obtenidos fueron secados en vacío. A continuación, el extracto seco fue disuelto en 50 ml de agua destilada para realizar una extracción en fase sólida (SepPak Vac C18, Waters) (*Chem. Biol.* 2002, 9, 519-531). Los compuestos retenidos se eluyeron con un gradiente lineal de metanol y agua (0 a 100% metanol en 60 min, a 10 ml/min), recogiendo fracciones cada 5 minutos. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por HPLC, empleando un equipo cromatográfico Agilent Technologies 1200 Series, usando como solventes acetonitrilo y ácido trifluoroacético (0.1%) en agua y una columna de fase reversa (Zorbax Eclipse XDB-C18, RR, 1.8 μ m, 4.6 x 50 mm, Agilent). Las muestras fueron eluidas empleando un método de tres gradientes lineales, el primero del 10% al 60% de acetonitrilo a lo largo de 5.7 minutos, a continuación hay otro gradiente del 60% al 100% de acetonitrilo durante 0.5 minutos y el tercer gradiente del 100% al 10% de acetonitrilo durante 1.9 minutos, a un flujo de 2 ml/min. La longitud de onda a la que se obtuvieron los cromatogramas fue de 278 nm. Aquellas fraccio-

nes que contenían los compuestos de interés (fracciones del 70% al 100% metanol) fueron mezcladas y evaporadas en el rotavapor. Este extracto seco, previamente disuelto en 10 ml de metanol, fue cromatografiado en una columna XBridge Prep C18 (30 x 150 mm, Waters), utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (35:65) a un flujo de 20 ml/min y se colectaron los picos de interés. Todos los compuestos recogidos fueron repurificados empleando la misma columna e idéntica mezcla de solventes. Cada una de las fracciones obtenidas fue colectada sobre tampón fosfato 0,1M pH 7 y tras cada la purificación, las muestras se diluyeron cuatro veces con agua y se sometieron a extracción en fase sólida para eliminar el ácido de la fase móvil y concentrar los compuestos, los cuales por último fueron liofilizados para su conservación. De este modo fueron aislados seis compuestos, tres de los cuales corresponden a nuevos derivados (Figura 2): 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SK (fórmula VII), 3D-desmicarosil-MTM-SDK (fórmula VIII), 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SDK (fórmula IX) y los tres restantes son compuestos anteriormente descritos: 3D-desmicarosil-MTM-SK, MTM-SK y MTM-SDK (*J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 5745-5753; *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, 1721-1734; US 7,423,008 B2).

Adicionalmente, después de las extracciones con acetato de etilo, los cultivos fueron sometidos a una nueva extracción, esta vez con metanol. El extracto una vez filtrado y secado en el rotavapor, fue procesado de modo similar al descrito al inicio de este ejemplo. De esta manera, fue posible aislar y purificar otros tres compuestos, dos de los cuales corresponden a nuevos derivados: (Figura 3) 3D-desmicarosil-MTM-SA (fórmula X), 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SA (fórmula XI) y el tercer compuesto aislado es MTM-SA, la cual ya fue descrita con anterioridad (*J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 5745-5753).

Los nuevos derivados se identificaron inicialmente mediante análisis por HPLC, comparando el espectro de absorción y el tiempo de retención. A continuación se realizó el análisis de MS para determinar la masa de los nuevos compuestos en un espectrómetro de masas ZQ4000 (Waters-Micromass) mediante ionización de electrospray en modo positivo, con un voltaje de capilar de 3 kV y voltajes de cono de 20 y 100 V. Las masas de los iones moleculares obtenidas para los nuevos derivados fueron: m/z [H^+] 1042 en el caso del 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SK (fórmula VII), m/z [H^+] 910 en el caso del 3D-desmicarosil-MTM-SDK (fórmula VIII), m/z [H^+] 1040 en el caso del 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SDK (fórmula IX), m/z [H^+] 884 en el caso del 3D-desmicarosil-MTM-SA (fórmula X), m/z [H^+] 1014 en el caso del 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM-SA (fórmula XI).

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los espectros fueron registrados a 298K en un espectrofotómetro Bruker Avance 600, empleando acetona- d_6 como disolvente. Las señales del disolvente se utilizaron como referencia interna. Los experimentos de RMN fueron procesados usando el programa Topsin 1.3 (Bruker GMBH, Karlsruhe, Alemania). Todas las asignaciones de RMN están basadas en espectros de 1H , COSY y TOCSY. En aquellos casos en que se estimó necesario se llevaron a cabo también experimentos de ^{13}C , DEPT-135, y HSQC. Las tablas 1 a 5 muestran los datos obtenidos para los compuestos de fórmulas (VII), (VIII), (IX), (X) y (XI).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 355 032 A1

TABLA 1

RMN de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SK (fórmula VII). C₅₀H₇₂O₂₃

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto VII			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
1		202.1	C
2	4.76 d (11.3)	78.0	CH
3	2.50 (solapado)	43.4	CH
4 _{ax}	3.17 dd (15.7, 3.6)	29.7	CH ₂
4 _{ec}	3.00 (solapado)		
4 ^a		135.2	C
5	6.92 (s)	101.2	CH
6		159.7	C
7		110.1	C
7-CH ₃	2.16 (s)	7.6	CH ₃
8		152.2	C
8 ^a		107.2	C
9		164.0	C
9 ^a		107.9	C
10	6.92 (s)	116.5	CH
10 ^a		138.8	C
1'	4.25 dd (3.4, 1.5)	78.9	CH
1'-OCH ₃	3.57 (s)	59.6	CH ₃
2'	4.32 d ancho (3.4)	79.1	CH
3'		209.5	C
4'	2.34 (s)	25.8	CH ₃
1 ^a	5.42 dd (9.6, 1.9)	96.7	CH
2A _{ax}	1.88 ddd (12.0, 12.0, 9.6)	37.1	CH ₂
2A _{ec}	2.50 (solapado)		
3 ^a	3.78 ddd (12.0, 8.9, 5.0)	80.9	CH
4 ^a	3.08 t (8.9)	75.0	CH
5 ^a	3.55 (solapado)	72.3	CH
6 ^a	1.34 d (6.1)	17.6	CH ₃
1B	4.77 dd (9.5 y 1.7)	99.5	CH
2B _{ax}	1.56 ddd (12.0, 12.0, 9.5)	39.6	CH ₂
2B _{ec}	2.20 ddd (12.0, 4.9, 1.7)		
3B	3.55 (solapado)	71.0	CH
4B	2.99 t (9.2)	77.2	CH
5B	3.40 dc (9.2 y 6.2)	72.3	CH
6B	1.32 d (6.2)	17.2	CH ₃
1C	5.13 dd (9.6 y 1.6)	100.4	CH
2C _{ax}	1.62 ddd (12.1, 12.0, 9.6)	37.5	CH ₂
2C _{ec}	2.50 (solapado)		
3C	3.70 (solapado)	81.4	CH
4C	3.03 t (8.9)	75.3	CH
5C	3.33 dc (8.9 y 6.4)	72.3	CH

ES 2 355 032 A1

	6C	1.33 d (6.4)	17.2	CH ₃
	1D	4.70 dd (9.5 y 1.5)	99.8	CH
5	2D _{ax}	1.81 ddd (12.0, 12.0, 9.5)	32.1	CH ₂
	2D _{ec}	1.96 ddd (12.0, 5.0 y 1.5)		
	3D	3.90 ddd (11.9, 5.0, 1.9)	76.5	CH
	4D	3.70 (solapado)	68.5	CH
10	5D	3.70 (solapado)	70.6	CH
	6D	1.31 d (6.2)	16.1	CH ₃
	1E	5.03 dd (9.6 y 1.9)	96.9	CH
15	2E _{ax}	1.70 ddd (13.0, 9.6, 2.8)	38.3	CH ₂
	2E _{ec}	1.92 ddd (13.0, 2.0 y 1.9)		
	3E	4.05 s ancho	67.8	CH
	4E	3.20 dd (9.5, 2.9)	72.8	CH
20	5E	3.70 (solapado)	69.6	CH
	6E	1.23 d (6.2)	16.1	CH ₃

TABLA 2

RMN de 3D-desmicarosil-MTM-SDK (fórmula VIII). C₄₄H₆₀O₂₀

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto VIII				
30	Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
	1		204.1	C
35	2	4.76 d (12.1)	76.9	CH
	3	2.74 t (12.1)	42.3	C
	4 _{ax}	2.95 (solapado)	27.3	CH ₂
	4 _{ec}	2.64 d (15.5)		
40	4 ^a		135.5	C
	5	6.90 (s)	100.9	CH
	6		159.5	C
	7		110.3	C
45	7-CH ₃	2.18 (s)	7.5	CH ₃
	8		152.4	C
	8 ^a		107.4	C
	9		164.5	C
50	9 ^a		107.9	C
	10	6.90 (s)	116.3	CH
	10 ^a		138.5	C
	1'	5.07 d (2.0)	79.6	CH
55	1'-OCH ₃	3.45 (s)	58.4	CH ₃
	2'		198.3	C
	3'		198.3	C
	4'	2.34 (s)	23.6	CH ₃
60	1 ^a	5.39 d (9.7)	96.8	CH
	2A _{ax}	1.87 ddd (12.0, 12.0, 9.7)	37.1	CH ₂
	2A _{ec}	2.48 ddd (12.0, 12.0, 4.9)		
	3 ^a	3.78 ddd (12.0, 9.0, 4.9)	81.3	CH
65	4 ^a	3.08 t (9.0)	74.9	CH
	5 ^a	3.58 (solapado)	72.2	CH

ES 2 355 032 A1

	6 ^a	1.34 d (6.1)	17.5	CH ₃
5	1B	4.76 dd (9.7 y 1.7)	99.5	CH
	2B _{ax}	1.55 ddd (12.0, 12.0, 9.7)	39.5	CH ₂
	2B _{ec}	2.21 ddd (12.0, 5.0, 1.7)		
	3B	3.55 ddd (12.0, 8.9, 5.0)	70.9	CH
	4B	3.00 t (8.9)	77.1	CH
10	5B	3.39 dc (8.9 y 5.9)	72.2	CH
	6B	1.31 d (5.9)	17.2	CH ₃
15	1C	5.10 dd (9.7 y 1.6)	100.6	CH
	2C _{ax}	1.63 ddd (12.0, 12.0, 9.7)	37.5	CH ₂
	2C _{ec}	2.53 ddd (12.0, 5.2, 1.6)		
	3C	3.68 (solapado)	81.6	CH
	4C	3.00 t (8.9)	75.3	CH
20	5C	3.31 dc (8.9, 5.6)	72.2	CH
	6C	1.33 d (5.6)	17.5	CH ₃
25	1D	4.69 d (10.0)	100.0	CH
	2D _{ax}	1.77 ddd (12.0, 12.0, 10.0)	34.8	CH ₂
	2D _{ec}	1.92 ddd (12.0, 4.9 y 1.9)		
	3D	3.80 ddd (12.0, 4.9 y 2.9)	68.4	CH
	4D	3.53 (solapado)	69.7	CH
30	5D	3.70 c ancho (6.0)	70.9	CH
	6D	1.31 d (6.0)	16.1	CH ₃

TABLA 3

RMN de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SDK (fórmula IX). C₅₀H₇₀O₂₃

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto IX				
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad	
45	1	203.8	C	
	2	4.78 d (13.1)	76.8	CH
	3	2.74 t (13.1)	42.4	C
	4 _{ax}	3.05 (solapado)	27.3	CH ₂
50	4 _{ec}	2.65 d ancho (16.3)		
	4 ^a	135.8	C	
	5	6.92 (s)	101.2	CH
	6	159.6	C	
55	7	110.2	C	
	7-CH ₃	2.15 (s)	7.5	CH ₃
	8	154.0	C	
	8 ^a	107.2	C	
60	9	164.0	C	
	9 ^a	108.2	C	
	10	6.92 (s)	116.4	CH
	10 ^a	138.6	C	
65	1'	5.06 d (1.4)	79.7	CH

ES 2 355 032 A1

5	1'-OCH ₃	3.45 (s)	58.4	CH ₃
	2'		198.2	C
	3'		198.3	C
	4'	2.37 (s)	23.7	CH ₃
10	1 ^a	5.38 d (9.2)	96.8	CH
	2A _{ax}	1.89 ddd (12.0, 12.0, 9.2)	37.1	CH ₂
	2A _{ec}	2.55 dd (12.0, 5.0)		
	3 ^a	3.75 (solapado)	80.9	CH
	4 ^a	3.08 t (9.0)	75.0	CH
	5 ^a	3.54 dc (9.0, 6.1)	72.3	CH
15	6 ^a	1.34 d (6.1)	17.8	CH ₃
20	1B	4.75 dd (9.7 y 1.4)	99.5	CH
	2B _{ax}	1.55 ddd (12.0, 12.0, 9.7)	39.6	CH ₂
	2B _{ec}	2.21 ddd (12.0, 4.9, 1.4)		
	3B	3.58 ddd (12.0, 8.9, 4.9)	71.0	CH
	4B	3.00 t (8.9)	77.2	CH
	5B	3.40 dc (8.9 y 6.2)	72.3	CH
25	6B	1.31 d (6.2)	17.2	CH ₃
30	1C	5.10 d (9.4)	100.6	CH
	2C _{ax}	1.62 c ancho (12.0)	37.5	CH ₂
	2C _{ec}	2.55 dd (12.0, 4.8)		
	3C	3.70 (solapado)	81.5	CH
	4C	3.00 t (8.9)	75.3	CH
	5C	3.32 dc (8.9 y 6.2)	72.3	CH
35	6C	1.32 d (6.2)	17.5	CH ₃
40	1D	4.68 s ancho	99.9	CH
	2D _{ax}	1.81 c ancho (12.0)	32.1	CH ₂
	2D _{ec}	1.95 m		
	3D	3.90 (solapado)	76.5	CH
	4D	3.76 s ancho	68.5	CH
	5D	3.72 c ancho (6.2)	70.6	CH
45	6D	1.31 d (6.2)	16.1	CH ₃
50	1E	5.04 dd (9.6 y 1.6)	96.9	CH
	2E _{ax}	1.70 ddd (12.8, 9.6, 2.8)	38.3	CH ₂
	2E _{ec}	2.01 ddd (12.8, 2.0 y 1.6)		
	3E	4.05 d ancho (2.8)	67.8	CH
	4E	3.20 dd (9.2, 2.3)	72.8	CH
	5E	3.75 (solapado)	69.6	CH
55	6E	1.24 d (6.1)	14.7	CH ₃

60

65

ES 2 355 032 A1

TABLA 4

RMN de 3D-desmicarosil-MTM-SA (fórmula X). $C_{42}H_{58}O_{20}$

¹ H-RMN (piridina-d ₅ , 600 MHz). Datos para el compuesto X	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
1	
2	4.80 (solapado parcialmente)
3	3.12 t ancho (11.0)
4 _{ax}	3.50 (solapado)
4 _{ec}	3.19 d ancho (15.3)
4 ^a	
5	6.95 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.50 (s)
8	
8 ^a	
9	
9 ^a	
10	6.44 (s)
10 ^a	
1'	4.89 (s)
1'-OCH ₃	3.80 (s)
2'	
1 ^a	5.54 d (9.5)
2A _{ax}	2.20 c ancho solapado parcialmente (11.4)
2A _{ec}	2.61 (solapado)
3 ^a	4.15 (solapado)
4 ^a	3.55 (solapado)
5 ^a	3.90 (solapado)
6 ^a	1.66 d (5.9)
1B	4.99 d (9.5)
2B _{ax}	2.15 (solapado)
2B _{ec}	2.61 (solapado)
3B	4.15 (solapado)
4B	3.55 (solapado)
5B	3.75 (solapado)
6B	1.60 (solapado)
1C	5.44 d (9.7)
2C _{ax}	1.91 c ancho (10.8)
2C _{ec}	2.74 d ancho (9.7)
3C	3.75 (solapado)
4C	3.47 t solapado parcialmente (9.0)
5C	3.63 dc (9.0 y 6.0)
6C	1.51 d (6.2)
1D	4.79 d (11.0)
2D _{ax}	2.15 (solapado)
2D _{ec}	2.38 cancho (10.6)

ES 2 355 032 A1

3D	4.05 m (señal no resuela)
4D	3.90 s ancho (solapado parcialmente)
5D	3.55 (solapado)
6D	1.60 (solapado)

TABLA 5

RMN de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SA (fórmula XI). $C_{48}H_{68}O_{23}$

^1H -RMN (piridina- d_5 , 600 MHz). Datos para el compuesto XI

Posición	^1H -RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
1	
2	4.80 (solapado)
3	3.15 t ancho (13.7)
4 _{ax}	3.50 (solapado)
4 _{ec}	3.20 d ancho (14.8)
4 ^a	
5	6.94 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.50 (s)
8	
8 ^a	
9	
9 ^a	
10	6.42 (s)
10 ^a	
1'	4.91 (s)
1'-OCH ₃	3.81 (s)
2'	
1 ^a	5.53 d ancho (7.8)
2A _{ax}	2.16 c ancho (10.4)
2A _{ec}	2.61 (solapado)
3 ^a	4.12 (solapado)
4 ^a	3.55 (solapado)
5 ^a	3.87 dc (9.0, 6.2)
6 ^a	1.65 d (5.6)
1B	4.99 d (9.5)
2B _{ax}	2.14 c ancho (11.4)
2B _{ec}	2.61 (solapado)
3B	4.12 (solapado)
4B	3.55 (solapado)
5B	3.75 (solapado)
6B	1.60 (solapado)
1C	5.44 d (9.2)
2C _{ax}	1.93 c ancho (11.0)
2C _{ec}	2.76 d ancho (10.1)
3C	3.75 (solapado)

ES 2 355 032 A1

4C	3.55 (solapado)
5C	3.55 (solapado)
6C	1.48 d (6.1)
1D	4.79 d (11.3)
2D _{ax}	2.20 (solapado)
2D _{ec}	2.32 ancho (11.4)
3D	4.10 (solapado)
4D	4.06 s ancho (solapado parcialmente)
5D	3.55 (solapado)
6D	1.60 (solapado)
1E	5.57 d (9.4)
2E _{ax}	2.01 t ancho (11.5)
2E _{ec}	2.39 d ancho (11.8)
3E	4.45 s ancho
4E	3.20 d ancho solapado parcialmente (10.1)
5E	4.39 dc (9.0, 6.5)
6E	1.60 (solapado)

Ejemplo 3

Bioconversión de MTM utilizando la cepa *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* C10GIV

Para la purificación de los nuevos derivados acetilados de MTM, se realizó un experimento de bioconversión en el cual la cepa *S. griseus* ssp. *griseus* C10GIV fue incubada en presencia de MTM (concentración final 50 µg/ml, actúa como sustrato de la reacción) y CRM (concentración final 2 µg/ml y es el inductor de la acetiltransferasa *CmmA*) (*Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 167-177; *Mol. Microbiol.* 2004, 53, 903-915). De este modo, la cepa recombinante se cultivó en medio R5A empleando un método de cultivo en dos pasos, tal como se ha descrito anteriormente (*J. Bacteriol.* 1998, 180, 4929-4937). En la etapa de producción, se emplearon 5 matraces Erlenmeyer de 2 litros conteniendo 400 ml de medio cada uno, que fueron incubados durante cinco días, a 250 rpm y 30°C. Los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos, el precipitado fue descartado y el sobrenadante se filtró en primer lugar a través de una placa filtrante conteniendo Celite® y a continuación se realizó una segunda filtración empleando un cartucho MiniProfile de 1 µm (Pall). El caldo filtrado se sometió a una extracción en fase sólida (SepPak Vac C18, Waters) (*Chem. Biol.* 2002, 9, 519-531) y los compuestos retenidos se eluyeron con un gradiente lineal de metanol y agua (0 a 100% metanol en 60 min, a 10 ml/min), recogiendo fracciones cada 5 minutos. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por HPLC, empleando el mismo equipo cromatográfico e idéntico método analítico al descrito previamente en el ejemplo 2. Las fracciones conteniendo los compuestos de interés (fracciones del 70% al 90% metanol) fueron mezcladas y evaporadas en el rotavapor. El extracto seco obtenido fue disuelto en 5 ml de metanol y cromatografiado en una columna XBridge Prep C18 (30 x 150 mm, Waters), utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (45:55) a un flujo de 20 ml/min. Los picos de interés se colectaron sobre tampón fosfato 0,1M pH 7, fueron diluidos cuatro veces con agua para ser desalados y concentrados mediante extracción en fase sólida. Por último, estos compuestos fueron liofilizados para su conservación. De este modo fueron aislados dos nuevos compuestos.

Estos nuevos derivados se identificaron inicialmente mediante análisis por HPLC, comparando el espectro de absorción y el tiempo de retención (Figura 4). A continuación se realizó el análisis de MS para determinar la masa de los nuevos compuestos en un espectrómetro de masas ZQ4000 (Waters-Micromass) mediante ionización de electrospray en modo positivo, con un voltaje de capilar de 3 kV y voltajes de cono de 20 y 100 V. Las masas de los iones moleculares obtenidas para los nuevos derivados fueron: m/z [H⁺] 1128 en el caso del compuesto de fórmula XII, es decir, se correspondía con una MTM monoacetilada y m/z [H⁺] 1170 en el caso del compuesto de fórmula XIII, correspondiente con la incorporación de dos grupos acetilo en la molécula de MTM.

ES 2 355 032 A1

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 6 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XII).

TABLA 6

RMN de 4E-acetil-MTM (fórmula XII) C₅₄H₇₈O₂₅

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XII			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	multiplicidad
1		205.0	C
2	4.83 d (11.6)	76.5	CH
3	2.85 (solapado)	42.5	CH
4 _{ax}	3.00 (solapado)	29.6	CH ₂
4 _{ec}	2.70 dd (16.1, 3.3)		
4 ^a		136.4	C
5	6.93 (s)	101.4	CH
6		159.6	C
7		110.4	C

ES 2 355 032 A1

5	7-CH ₃	2.17 (s)	7.5	CH ₃
	8		152.0	C
	8 ^a		107.0	C
	9		164.2	C
	9 ^a		107.5	C
10	10	6.90 (s)	116.7	CH
	10 ^a		138.8	C
	1'	4.86 d ancho (3.0)	81.6	CH
	1'-OCH ₃	3.46 (s)	58.3	CH ₃
	2'		210.9	C
15	3'	4.30 (solapado)	78.8	CH
	4'	4.30 (solapado)	68.0	CH
	5'	1.30 (solapado)	19.2	CH ₃
20	1 ^a	5.42 dd (9.2, 1.8)	96.7	CH
	2A _{ax}	1.87 c ancho solapado parcialmente (10.0)	37.1	CH ₂
	2A _{ec}	2.47 ddd (12.0, 5.0, 1.8)		
	3 ^a	3.80 (solapado)	80.9	CH
	4 ^a	3.08 t (8.7)	75.0	CH
	5 ^a	3.55 dc (9.1, 6.1)	72.2	CH
25	6 ^a	1.30 (solapado)	17.2	CH ₃
30	1B	4.76 dd (9.8, 1.9)	99.5	CH
	2B _{ax}	1.55 (solapado)	39.6	CH ₂
	2B _{ec}	2.20 ddd (11.8, 5.0, 1.9)		
	3B	3.60 (señal compleja)	71.0	CH
	4B	3.00 (señal compleja)	77.2	CH
35	5B	3.39 dc (9.2, 6.2)	72.2	CH
	6B	1.30 (solapado)	17.5	CH ₃
40	1C	5.14 dd (9.6, 1.5)	100.5	CH
	2C _{ax}	1.60 (solapado)	37.6	CH ₂
	2C _{ec}	2.55 ddd (12.0, 5.0, 1.5)		
	3C	3.70 (solapado)	81.5	CH
	4C	3.00 (solapado)	75.3	CH
	5C	3.33 dc (8.8, 5.8)	72.2	CH
45	6C	1.30 (solapado)	17.6	CH ₃
50	1D	4.73 dd (9.8, 2.0)	99.9	CH
	2D _{ax}	1.82 ddd (12.0, 12.0, 9.8)	32.0	CH ₂
	2D _{ec}	1.95 (señal compleja)		
	3D	3.94 s ancho (solapado parcialmente)	76.5	CH
	4D	3.75 señal compleja (solapado)	68.5	CH
	5D	3.73 c ancho solapado parcialmente (6.4)	70.6	CH
55	6D	1.30 (solapado)	16.1	CH ₃
60	1E	5.06 dd (9.7, 2.0)	97.6	CH
	2E _{ax}	1.60 (solapado)	44.2	CH ₂
	2E _{ec}	1.91 dd (13.0, 2.0)		
	3E		69.9	C
	3E-CH ₃	1.14 (s)	26.4	CH ₃
	4E	4.50 d (9.7)	77.4	CH
65	4E-CH ₃	2.10 s (solapado)	19.8	CH ₃
	4E-CO		170.0	C

5E	3.96 dc (9.2, 6.2)	68.2	CH
6E	1.12 d (6.2)	17.2	CH ₃

Ejemplo 4

Bioconversión de MTM-SK utilizando la cepa Streptomyces griseus ssp. griseus C10GIV.

Para la purificación de los nuevos derivados acetilados de MTM-SK, se realizó un experimento de bioconversión en el cual la cepa *S. griseus* ssp. *griseus* C10GIV fue incubada en presencia de MTM-SK (concentración final 50 µg/ml, actúa como sustrato de la reacción) y CRM (concentración final 2 µg/ml, es el inductor de la acetiltransferasa *CmmA*) (*Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 167-177; *Mol. Microbiol.* 2004, 53, 903-915). De este modo, la cepa recombinante se cultivó en medio R5A empleando un método de cultivo en dos pasos, tal como se ha descrito anteriormente (*J. Bacteriol.* 1998, 180, 4929-4937). En la etapa de producción, se emplearon 5 matraces Erlenmeyer de 2 litros conteniendo 400 ml de medio cada uno, que fueron incubados durante cinco días, a 250 rpm y 30°C. Los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos, el precipitado fue descartado y el sobrenadante se filtró en primer lugar a través de una placa filtrante conteniendo Celite® y a continuación se realizó una segunda filtración empleando un cartucho MiniProfile de 1 µm (Pall). El caldo filtrado se sometió a una extracción en fase sólida (SepPak Vac C18, Waters) (*Chem. Biol.* 2002, 9, 519-531) y los compuestos retenidos se eluyeron con un gradiente lineal de metanol y agua (0 a 100% metanol en 60 min, a 10 ml/min), recogiendo fracciones cada 5 minutos. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por HPLC, empleando el mismo equipo cromatográfico e idéntico método analítico al descrito previamente en el ejemplo 2. Las fracciones conteniendo los compuestos de interés (fracciones del 70% al 90% metanol) fueron mezcladas y evaporadas en el rotavapor. El extracto seco obtenido fue disuelto en 5 ml de metanol y cromatografiado en una columna XBridge Prep C18 (30x150 mm, Waters), utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (45:55) a un flujo de 20 ml/min. Los picos de interés se colectaron sobre tampón fosfato 0,1M pH 7, fueron diluidos cuatro veces con agua para ser desalados y concentrados mediante extracción en fase sólida. Por último, estos compuestos fueron liofilizados para su conservación. De este modo fueron aislados dos nuevos compuestos.

Estos nuevos derivados se identificaron inicialmente mediante análisis por HPLC, comparando el espectro de absorción y el tiempo de retención (Figura 5). A continuación se realizó el análisis de MS para determinar la masa de los nuevos compuestos en un espectrómetro de masas ZQ4000 (Waters-Micromass) mediante ionización de electrospray en modo positivo, con un voltaje de capilar de 3 kV y voltajes de cono de 20 y 100 V. Las masas de los iones moleculares obtenidas para los nuevos derivados fueron: m/z [H⁺] 1098 en el caso del compuesto de fórmula XIV, es decir, se correspondía con una MTM-SK monoacetilada y m/z [H⁺] 1140 en el caso del compuesto de fórmula XV, correspondiente con la incorporación de dos grupos acetilo en la molécula de MTM-SK.

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 7 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XIV).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 355 032 A1

TABLA 7

RMN de 4D-acetil-MTM-SK (fórmula XIV) $C_{53}H_{76}O_{24}$

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XIV			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
1		203.1	C
2	4.75 (solapado)	76.5	CH
3	2.50 (solapado)	43.4	CH
4 _{ax}	3.17 d ancho (15.0)	29.6	CH ₂
4 _{ec}	3.00 (solapado)		
4 ^a		136.6	C
5	6.92 (s)	101.3	CH
6		159.5	C
7		110.6	C
7-CH ₃	2.15 (s)	7.5	CH ₃
8		154.2	C
8 ^a		107.8	C
9		165.3	C
9 ^a		108.3	C
10	6.92 (s)	116.6	CH
10 ^a		138.7	C
1'	4.26 (solapado)	78.9	CH
1'-OCH ₃	3.57 (s)	59.6	CH ₃
2'	4.31 d (3.7)	79.1	C
3'		209.5	C
4'	2.34 (s)	25.8	CH
1 ^a	5.42 d (9.0)	96.3	CH
2A _{ax}	1.90 c ancho (10.4)	37.1	CH ₂
2A _{ec}	2.50 (solapado)		
3 ^a	3.80 ddd (12.1, 8.8, 5.2)	80.9	CH
4 ^a	3.09 t (8.8)	75.0	CH

ES 2 355 032 A1

	5 ^a	3.60 (solapado)	72.3 (overlaped)	CH
	6 ^a	1.34 d (solapado)	17.8	CH ₃
5	1B	4.76 dd (9.7 y 1.5)	99.5	CH
	2B _{ax}	1.57 ddd (12.0, 12.0, 9.7)	39.6	CH ₂
	2B _{ec}	2.20 ddd (12.0, 4.9, 1.5)		
	3B	3.55 (solapado)	71.0	CH
10	4B	3.01 t (8.9)	77.2	CH
	5B	3.40 dc (9.0 y 6.2)	72.3 (overlaped)	CH
	6B	1.31 d (6.1)	17.5	CH ₃
15	1C	5.15 solapado (con 4D)	100.4	CH
	2C _{ax}	1.65 (solapado)	37.5	CH ₂
	2C _{ec}	2.53 dd (12.0, 4.9)		
	3C	3.36 (señal no resuelta)	81.5	CH
20	4C	3.05 t (8.9)	75.3	CH
	5C	3.75 (señal no resuelta)	72.3 (overlaped)	CH
	6C	1.34 (solapado)	17.6	CH ₃
25	1D	4.80 d ancho (9.2)	99.7	CH
	2D _{ax}	1.74 c ancho (10.6)	32.7	CH ₂
	2D _{ec}	2.15 (solapado)		
	3D	4.15 (solapado)	72.3	CH
30	4D	5.10 (solapado)	70.6	CH
	4D-CH ₃	2.10 (s)	20.0	CH ₃
	4D-CO		169.7	C
	5D	3.90 (solapado)	69.9	CH
35	6D	1.15 d (6.2)	16.1	CH ₃
	1E	4.93 dd (9.5 y 1.7)	96.6	CH
	2E _{ax}	1.46 dd (13.3, 9.6)	43.8	CH ₂
40	2E _{ec}	1.84 dd (13.3, 1.8)		
	3E		70.3	C
	3E-CH ₃	1.22 (s)	26.7	CH ₃
	4E	2.92 dd (9.2, 7.7) acoplado con 4E-OH	70.4	CH
45	4E-OH	3.89 d (7.7)		
	5E	3.60 (solapado)	72.3	CH
	6E	1.22 d (6.2)	17.2	CH ₃

50

Ejemplo 5

55 *Bioconversión de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM utilizando la cepa Streptomyces griseus ssp. griseus C10GIV*

60 Para la purificación de los nuevos derivados acetilados de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM (*J. Nat. Prod.* 2008, 71, 199-207; WO 2008/096028 A1), se realizó un experimento de bioconversión en el cual la cepa *S. griseus ssp. griseus* C10GIV fue incubada en presencia de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM (concentración final 15 μg/ml, es el sustrato de la reacción) y CRM (concentración final 2 μg/ml, actúa como inductor de la acetiltransferasa *CmmA*) (*Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 167-177; *Mol. Microbiol.* 2004, 53, 903-915). De este modo, la cepa recombinante se cultivó en medio R5A empleando un método de cultivo en dos pasos, tal como se ha descrito anteriormente (*J. Bacteriol.* 1998, 180, 4929-4937). En la etapa de producción, se emplearon 12 matraces Erlenmeyer de 2 litros conteniendo 400 ml de medio cada uno, que fueron incubados durante cinco días, a 250 rpm y 30°C. Los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos, el precipitado fue descartado y el sobrenadante se filtró empleando un cartucho MiniProfile de 1 μm (Pall). El caldo filtrado se sometió a una extracción en fase sólida (SepPak Vac C18, Waters) (*Chem. Biol.* 2002, 9, 519-531) y los compuestos retenidos se eluyeron con un gradiente lineal de

65

ES 2 355 032 A1

metanol y agua (0 a 100% metanol en 60 min, a 10 ml/min), recogiendo fracciones cada 5 minutos. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por HPLC-MS empleando un equipo cromatográfico acoplado a un espectrómetro de masas ZQ4000 (Waters-Micromass), usando como solventes acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua, y una columna de fase reversa (Symmetry C18, 2.1 x 150 mm, Waters). Las muestras fueron eluidas con 10% acetonitrilo durante los primeros 4 minutos, seguido de un gradiente lineal 10-88% de acetonitrilo durante 26 minutos, a un flujo de 0.25 ml/min.

La detección y caracterización espectral de los picos fue realizada con un detector de fotodiodos y software Empower (Waters). Los análisis de MS fueron realizados mediante ionización de electrospray en modo positivo, con un voltaje de capilar de 3 kV y voltajes de cono de 20 y 100 V. Tras su análisis, las fracciones que contenían los compuestos de interés se mezclaron (Figura 6) y desecaron en vacío. El extracto obtenido fue resuspendido en 2 ml de DMSO/Metanol (1:1) y cromatografiado en una columna SunFire C18 (10x250 mm, Waters) con flujo de 7 ml/min, empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo y 0.1% TFA en H₂O (45:55). Cada uno de los compuestos de interés fue repurificado empleando la columna semipreparativa anterior pero utilizando diferentes proporciones de solventes en la fase móvil. Los picos de interés se colectaron sobre tampón fosfato 0,1M pH 7, fueron diluidos cuatro veces con agua para ser desalados y concentrados mediante extracción en fase sólida. Por último, estos compuestos fueron liofilizados para su conservación.

De este modo fueron aislados cinco nuevos compuestos. Las masas de los iones moleculares obtenidas para los nuevos derivados fueron: m/z [H⁺] 1114 en el caso de los compuestos de fórmula XVI, XVII y XVIII es decir, se correspondería con una 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM monoacetilada en tres posiciones diferentes, m/z [H⁺] 1156 en el caso del compuesto de fórmula XIX, correspondiente con la incorporación de dos grupos acetilo en la molécula de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM, m/z [H⁺] 1198 en el caso del compuesto de fórmula XX, correspondiente con la incorporación de tres grupos acetilo en la molécula de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM.

Ejemplo 6

Bioconversión de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SK utilizando la cepa Streptomyces griseus ssp. griseus C10GIV

Para la purificación de los nuevos derivados acetilados de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SK, se realizó un experimento de bioconversión en el cual la cepa *S. griseus* ssp. *griseus* C10GIV fue incubada en presencia de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SK (concentración final 25 μg/ml, actúa como sustrato de la reacción) y CRM (inductor de la acetiltransferasa *CmmA*) (*Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 167-177; *Mol. Microbiol.* 2004, 53, 903-915). De este modo, la cepa recombinante se cultivó en medio R5A empleando un método de cultivo en dos pasos, tal como se ha descrito anteriormente (*J. Bacteriol.* 1998, 180, 4929-4937). En la etapa de producción, se emplearon 2 matraces Erlenmeyer de 2 litros conteniendo 400 ml de medio cada uno, que fueron incubados durante cinco días, a 250 rpm y 30°C. Los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos, el precipitado fue descartado y el sobrenadante se filtró en primer lugar a través de una placa filtrante conteniendo Celite® y a continuación se realizó una segunda filtración empleando un cartucho MiniProfile de 1 μm (Pall). El caldo filtrado se sometió a una extracción en fase sólida (SepPak Vac C18, Waters) (*Chem. Biol.* 2002, 9, 519-531) y los compuestos retenidos se eluyeron con un gradiente lineal de metanol y agua (0 a 100% metanol en 60 min, a 10 ml/min), recogiendo fracciones cada 5 minutos. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por HPLC, empleando el mismo equipo cromatográfico e idéntico método analítico al descrito previamente en el ejemplo 2. Las fracciones conteniendo los compuestos de interés (fracciones del 70% al 90% metanol) fueron mezcladas y evaporadas en el rotavapor. El extracto seco obtenido fue disuelto en 5 ml de metanol y cromatografiado en una columna XBridge Prep C18 (30x150 mm, Waters), utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (45:55) a un flujo de 20 ml/min. Los picos de interés se colectaron sobre tampón fosfato 0,1M pH 7, fueron diluidos cuatro veces con agua para ser desalados y concentrados mediante extracción en fase sólida. Por último, estos compuestos fueron liofilizados para su conservación. De este modo fueron aislados dos nuevos compuestos.

Estos nuevos derivados se identificaron inicialmente mediante análisis por HPLC, comparando el espectro de absorción y el tiempo de retención (Figura 7). A continuación se realizó el análisis de MS para determinar la masa de los nuevos compuestos en un espectrómetro de masas ZQ4000 (Waters-Micromass) mediante ionización de electrospray en modo positivo, con un voltaje de capilar de 3 kV y voltajes de cono de 20 y 100 V. Las masas de los iones moleculares obtenidas para los nuevos derivados fueron: m/z [H⁺] 1084 en el caso del compuesto de fórmula XXI, es decir, se correspondía con una 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SK monoacetilada y m/z [H⁺] 1126 en el caso del compuesto de fórmula XXII, correspondiente con la incorporación de dos grupos acetilo en la molécula de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SK.

Ejemplo 7

Acilación enzimática de MTM catalizada por CAL-B empleando diferentes agentes acilantes

Las acilaciones enzimáticas de MTM catalizadas por CAL-B se llevaron a cabo incubando a 45°C y 250 rpm una suspensión de 150 mg de lipasa en una disolución de 15 mg de MTM en 3 ml del agente acilante corres-

pondiente. Eventualmente, en aquellos casos en que la MTM presentó baja solubilidad en el agente acilante se añadieron 0.5 ml de THF. La conversión de la biotransformación fue monitoreada mediante HPLC empleando el mismo equipo cromatográfico e idéntico método analítico al descrito previamente en el ejemplo 2. Cuando la conversión alcanzó un valor próximo al 90%, el enzima se filtró a vacío en placa filtrante y se lavó con abundante metanol y THF. El filtrado se concentró a vacío y el residuo resultante, previamente disuelto en 5 ml de metanol, fue cromatografiado en una columna XBridge Prep C18 (30x150 mm, Waters), utilizando como fase móvil mezclas de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua a un flujo de 20 ml/min. Los picos de interés se colectaron sobre tampón fosfato 0,1M pH 7, diluidos cuatro veces con agua para ser desalados y concentrados mediante extracción en fase sólida. Por último, los compuestos obtenidos fueron liofilizados para su conservación.

Los nuevos derivados acilados se identificaron inicialmente mediante análisis por HPLC, comparando el espectro de absorción y el tiempo de retención (Figura 8). A continuación, se caracterizaron mediante el análisis de MS y RMN de acuerdo con los ejemplos anteriores.

- Para el caso particular de emplear acetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de un día y se alcanzó una conversión de 95%. Por HPLC se identificaron tres nuevos compuestos los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (45:55) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados los compuestos se identificaron como 4'-acetilmitramicina, 3B-acetilmitramicina y 4',3B-diacetilmitramicina (fórmulas XXIII, XXIV y XXV, respectivamente).

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. Las tablas 8 a 10 muestran los datos obtenidos para los compuestos de fórmula (XXIII), (XXIV) y (XXV).

TABLA 8

RMN de 4'-acetil-MTM (fórmula XXIII)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XXIII			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	multiplicidad
1		203.1	C
2	4.75 (solapado)	76.6	CH
3	2.80 (solapado)	42.0	CH
4 _{ax}	3.15 (solapado)	29.6	CH ₂
4 _{ec}	3.00 (solapado)		
4 ^a		135.2	C
5	6.91 (s)	101.3	CH
6		159.5	C
7		110.4	C
7-CH ₃	2.15 (s)	7.5	CH ₃
8		152.2	C
8a		107.0	C
9		164.0	C
9a		107.8	C
10	6.91 (s)	116.4	CH
10a		138.7	C
1'	4.86 (s ancho)	81.4	CH
1'-OCH ₃	3.41 (s)	58.0	CH ₃
2'		209.4	C

ES 2 355 032 A1

5	3'	4.47 dd (6.7, 2.9) acoplado con OH	76.3	CH
	4'	5.29 dc (5.9, 2.9)	71.0	CH
	4'-CO		169.3	C
	4'-CH ₃	2.05 (s)	19.8	CH ₃
	5'	1.32 (solapado)	15.1	CH ₃
10	1A	5.41 d ancho (9.6)	96.7	CH
	2A _{ax}	1.85 (solapado)	37.1	CH ₂
	2A _{ec}	2.50 (11.7, 5.1, 1.9)		
	3A	3.78 ddd (11.7, 8.8, 5.1)	80.9	CH
	4A	3.07 t (9.0)	74.9	CH
	5A	3.53 dc (9.0, 6.1)	72.3	CH
15	6A	1.32 (solapado)	17.9	CH ₃
20	1B	4.76 d ancho (9.7)	99.5	CH
	2B _{ax}	1.55 (solapado)	39.6	CH ₂
	2B _{ec}	2.18 ddd (11.5, 5.0, 1.5)		
	3B	3.55 (solapado)	71.0	CH
	4B	3.00 (solapado)	77.2	CH
	5B	3.35 dc solapado parcialmente (8.9, 6.2)	72.3	CH
25	6B	1.32 (solapado)	17.5	CH ₃
30	1C	5.11 d ancho (9.7)	100.6	CH
	2C _{ax}	1.70 (señal no resuelta)	37.4	CH ₂
	2C _{ec}	2.50 ddd (12.0, 4.9, 2.0)		
	3C	3.50 (solapado)	81.6	CH
	4C	3.00 (solapado)	75.2	CH
	5C	3.30 (señal no resuelta)	72.3	CH
35	6C	1.32 (solapado)	17.6	CH ₃
40	1D	4.74 d ancho (9.5)	99.9	CH
	2D _{ax}	1.80 (señal no resuelta)	32.1	CH ₂
	2D _{ec}	1.95 (solapado)		
	3D	3.85 (señal no resuelta)	76.4	CH
	4D	3.75 (solapado)	68.4	CH
	5D	3.67 dc (9.0, 6.1)	70.7	CH
45	6D	1.32 (solapado)	16.1	CH ₃
50	1E	4.99 d ancho (9.7)	97.5	CH
	2E _{ax}	1.55 (solapado)	44.0	CH ₂
	2E _{ec}	1.90 (solapado)		
	3E		70.3	C
	3E-CH ₃	1.24 (s)	26.6	CH ₃
	4E	3.00 (solapado)	76.4	CH
55	5E	3.66 dc (9.0, 6.0)	70.6	CH
	6E	1.24 d (6.0)	17.2	CH ₃

60 ESI-MS (XXIII): 463.00, 593.22, 723.33, 867.36, 1127.50.

65

ES 2 355 032 A1

TABLA 9

RMN de 3B-acetil-MTM (fórmula XXIV)

5

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XXIV			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
1		203.6	C
2	4.85 (solapado)	76.5	CH
3	2.80 (solapado)	42.5	CH
4 _{ax}	3.00 (solapado)	29.6	CH ₂
4 _{ec}	2.69 (16.6, 3.5)		
4a		136.2	C
5	6.93 (s)	101.4	CH
6		159.6	C
7		110.4	C
7-CH ₃	2.15 (s)	7.5	CH ₃
8		152.1	C
8a		107.0	C
9		164.1	C
9a		107.7	C
10	6.90 (s)	116.8	CH
10a		138.8	C
1'	4.86 dd (3.8, 1.6)	81.6	CH
1'-OCH ₃	3.50 (s)	58.3	CH ₃
2'		210.8	C
3'	4.29 (solapado)	78.8	CH
4'	4.29 (solapado)	67.9	CH
5'	1.32 (solapado)	19.2	CH ₃
1A	5.42 dd (9.7, 1.9)	96.7	CH
2A _{ax}	1.87 ddd (11.8, 11.7, 9.7)	37.0	CH ₂
2A _{ec}	2.52 ddd (11.7, 5.2, 1.9)		
3A	3.82 ddd (11.8, 8.7, 5.2)	80.8	CH
4A	3.09 t solapado parcialmente(8.7)	75.0	CH
5A	3.57 dc (9.1, 6.1)	72.2	CH
6A	1.32 (solapado)	17.9	CH ₃
1B	4.85 (solapado)	98.7	CH
2B _{ax}	1.55 (solapado)	36.7	CH ₂
2B _{ec}	2.29 ddd (11.5, 5.2, 1.8)		
3B	4.85 (solapado)	73.2	CH
3B-CH ₃	2.03 (s)	20.1	CH ₃
3B-CO		169.9	C
4B	3.20 (señal no resuelta)	73.7	CH
5B	3.52 dc (9.4, 6.2)	72.2	CH
6B	1.32 (solapado)	17.5	CH ₃
1C	5.14 dd (9.7, 1.6)	100.5	CH
2C _{ax}	1.63 ddd (12.0, 12.0 , 9.7)	37.6	CH ₂
2C _{ec}	2.50 ddd (12.0, 4.9, 1.6)		
3C	3.70 (solapado)	81.5	CH
4C	3.00 (solapado)	75.3	CH

ES 2 355 032 A1

	5C	3.34 dc (9.1, 6.1)	72.2	CH
	6C	1.32 (solapado)	17.6	CH ₃
5	1D	4.72 dd (9.8, 1.9)	99.9	CH
	2D _{ax}	1.82 ddd (12.0, 12.0, 9.8)	32.1	CH ₂
	2D _{ec}	1.95 (señal no resuelta)		
	3D	3.90 ddd (12.0, 5.0, 3.0)	76.5	CH
10	4D	3.75 s ancho	68.5	CH
	5D	3.67 c ancho solapado parcialmente(6.3)	70.6	CH
	6D	1.32 (solapado)	16.1	CH ₃
15	1E	4.99 dd (9.6, 2.0)	97.5	CH
	2E _{ax}	1.55 (solapado)	44.0	CH ₂
	2E _{ec}	1.90 dd (13.6, 2,0)		
	3E		70.3	C
20	3E-CH ₃	1.24 (s)	26.6	CH ₃
	4E	3.00 (solapado)	76.4	CH
	5E	3.66 dc (9.2, 6.1)	70.6	CH
	6E	1.25 d (6.1)	17.2	CH ₃
25	ESI-MS (XXIV): 421.20, 551.14, 723.36, 825.29, 1127.43.			

TABLA 10

RMN de 4',3B-diacetil-MTM (fórmula XXV)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XXV				
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad	
1		solapado (205)	C	
2	4.85 (solapado)	76.5	CH	
3	2.80 (solapado)	42.1	CH	
4 _{ax}	3.10 (solapado)	29.4	CH ₂	
4 _{ec}	3.00 (solapado)			
4a		136.1	C	
5	6.91 (s)	101.2	CH	
6		159.2	C	
7		110.4	C	
7-CH ₃	2.14 (s)	7.4	CH ₃	
8		152.3	C	
8a		107.1	C	
9		164.1	C	
9a		107.4	C	
10	6.91 (s)	116.7	CH	
10a		138.5	C	
1'	4.85 (solapado)	81.6	CH	
1'-OCH ₃	3.42 (s)	58.1	CH ₃	
2'		209.3	C	
3'	4.50 d (2.9)	76.5	CH	
4'	5.30 dc (6.0, 2.9)	70.5	CH	
4'-CO		169.2	C	
4'-CH ₃	2.05 (s)	20.1	CH ₃	
5'	1.32 (solapado)	15.1	CH ₃	

ES 2 355 032 A1

5	1A	5.40 m (señal no resuelta)	96.7	CH
	2A _{ax}	1.95 (solapado)	37.4	CH ₂
	2A _{ec}	2.49 m (señal no resuelta)		
	3A	3.80 (señal no resuelta)	80.8	CH
	4A	3.08 t solapado parcialmente (8.8)	75.0	CH
	5A	3.53 (solapado)	72.2	CH
10	6A	1.32 (solapado)	17.9	CH ₃
15	1B	4.85 (solapado)	98.7	CH
	2B _{ax}	1.60 (solapado)	37.0	CH ₂
	2B _{ec}	2.30 ddd (11.8, 5.0, 2.0)		
	3B	4.85 (solapado)	73.2	CH
	3B-CH ₃	1.98 (s)	20.2	CH ₃
	3B-CO		169.8	C
20	4B	3.25 m (señal no resuelta)	73.7	CH
	5B	3.53 (solapado)	72.2	CH
	6B	1.32 (solapado)	17.5	CH ₃
25	1C	5.11 d ancho (9.3)	100.6	CH
	2C _{ax}	1.63 ddd (12.0, 12.0, 9.3)	37.6	CH ₂
	2C _{ec}	2.55 m (señal no resuelta)		
	3C	3.70 (solapado)	81.5	CH
	4C	3.05 (solapado)	75.3	CH
30	5C	3.30 dc (9.1, 6.1)	72.2	CH
	6C	1.32 (solapado)	17.6	CH ₃
35	1D	4.74 m (señal no resuelta)	99.9	CH
	2D _{ax}	1.80 ddd (12.0, 12.0, 9.7)	32.1	CH ₂
	2D _{ec}	2.00 (solapado)		
	3D	3.85 m (señal no resuelta)	76.5	CH
	4D	3.74 s ancho	68.4	CH
40	5D	3.70 (solapado)	70.6	CH
	6D	1.32 (solapado)	16.1	CH ₃
45	1E	5.00 d ancho (9.2)	97.6	CH
	2E _{ax}	1.55 (solapado)	44.0	CH ₂
	2E _{ec}	1.90 (solapado)		
	3E		70.3	C
	3E-CH ₃	1.25 (s)	26.6	CH ₃
50	4E	2.97 d (9.1)	76.4	CH
	5E	3.68 (9.1, 6.1)	70.5	CH
	6E	1.24 d (6.1)	17.2	CH ₃

55 ESI-MS (XXV): 463.07, 593.22, 765.43, 867.29, 1169.48.

60 - Para el caso particular de emplear acetato de 2,2,2-trifluoroetilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de 4 días y se alcanzó una conversión de 70%. Por HPLC se identificaron tres derivados acilados (Figura 9) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (45:55) a un flujo de 20 ml/min. Los tres compuestos aislados resultaron ser idénticos a aquellos obtenidos con el acetato de etilo (XXIII, XXIV y XXV) aunque en esta ocasión el rendimiento fue sensiblemente inferior.

65 - Para el caso particular de emplear cloroacetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 60%. Por HPLC se identificaron tres nuevos compuestos (Figura 10) con tiempos de retención de 4.21, 4.49 y 4.82 minutos (fórmulas XXVI, XXVII y XXVIII, respectivamente).

- Para el caso particular de emplear propanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 95%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 11) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados los compuestos se identificaron como 4'-propanoilmitramicina y 4',3B-dipropanoilmitramicina (fórmulas XXIX y XXX, respectivamente).

ESI-MS (XXIX): 477.13, 607.24, 737.22, 881.31, 1141.76.

ESI-MS (XXX): 477.06, 607.11, 793.29, 881.31, 1197.51.

- Para el caso particular de emplear butanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cuatro días y se alcanzó una conversión de 95%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 12) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (60:40) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados los compuestos se identificaron como 4'-butanoilmitramicina y 4',3B-butanoilmitramicina (fórmulas XXXI y XXXII, respectivamente).

ESI-MS (XXXI): 491.31, 621.08, 751.17, 895.39, 1155.78, 1172.99.

ESI-MS (XXXII): 491.24, 621.22, 820.30, 895.41, 1225.60.

- Para el caso particular de emplear levulinato de acetoxima como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 20%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 13) con un tiempo de retención de 4.00 minutos (fórmula XXXIII).

- Para el caso particular de emplear decanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 14) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (55:45) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 4'-decanoilmitramicina (fórmula XXXIV).

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 11 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XXXIV).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 355 032 A1

TABLA 11

RMN de 4'-decanoil-MTM (fórmula XXXIV)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto XXXIV	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
1	
2	4.75 (solapado)
3	2.82 t (12.0)
4 _{ax}	3.20 (solapado)
4 _{ec}	3.00 (solapado)
4 ^a	
5	6.88 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.15 (s)
8	
8 ^a	
9	
9 ^a	
10	6.91 (s)
10 ^a	
1'	4.91 (s ancho)
1'-OCH ₃	3.40 (s)
2'	
3'	4.44 d (2,5)
4'	5.30 dc (5.8, 2.5)
4'-CO	
5'	1.32 (solapado)
6'-CO	
7'	2.10 (solapado)
8'	1.46 m (señal no resuelta)
9'	1.30 (solapado)
10'	1.30 (solapado)
11'	1.30 (solapado)
12'	1.30 (solapado)
13'	1.30 (solapado)
14'	1.30 (solapado)
15'	0.89 t (7.1)
1 ^a	5.40 d ancho (9.2)
2A _{ax}	1.90 (solapado)
2A _{ec}	2.46 (12.0, 5.1, 1.9)
3 ^a	3.78 (solapado)

ES 2 355 032 A1

5	4 ^a	3.15 t (9.0)
	5 ^a	3.53 dc (9.0, 6.1)
	6 ^a	1.30 (solapado)
10	1B	4.75 (solapado)
	2B _{ax}	1.55 (solapado)
	2B _{ec}	2.20 ddd (11.8, 5.0, 1.5)
	3B	3.55 (12.0, 8.9, 5.0)
	4B	3.00 (solapado)
	5B	3.50 (solapado)
15	6B	1.30 (solapado)
20	1C	5.10 d ancho (9.0)
	2C _{ax}	1.70 c ancho (11.0)
	2C _{ec}	2.53 ddd (12.0, 5.9, 2.0)
	3C	3.55 (solapado)
	4C	3.00 (solapado)
	5C	3.25 dc (9.1, 6.0)
25	6C	1.30 (solapado)
30	1D	4.75 (solapado)
	2D _{ax}	1.80 c ancho (11.0)
	2D _{ec}	1.90 (solapado)
	3D	3.87 (señal no resuelta)
	4D	3.75 s ancho (solapado parcialmente)
	5D	3.75 (solapado)
35	6D	1.30 (solapado)
40	1E	5.00 d ancho (9.4)
	2E _{ax}	1.55 (solapado)
	2E _{ec}	1.90 (solapado)
	3E	
	3E-CH ₃	1.25 (s)
	4E	3.00 (solapado)
45	5E	3.70 (solapado)
	6E	1.30 (solapado)

50 ESI-MS (XXXIV): 575.22, 705.30, 835.37, 979.37, 1240.76.

- Para el caso particular de emplear dodecanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 70%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 15) con un tiempo de retención de 6.32 minutos (fórmula XXXV).

55 - Para el caso particular de emplear benzoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de nueve días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 16) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 4'-benzoilmitramicina (fórmula XXXVI).

60 La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 12 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XXXVI).

65

ES 2 355 032 A1

TABLA 12

RMN de 4'-benzoil-MTM (fórmula XXXVI)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto XXXVI		
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	
1		
2	4.70 (solapado)	
3	2.80 (solapado)	
4 _{ax}	3.10 (solapado)	
4 _{ec}	3.00 (solapado)	
4 ^a		
5	6.33 (s ancho)	
6		
7		
7-CH ₃	2.15 (s)	
8		
8 ^a		
9		
9 ^a		
10	6.63 (s ancho)	
10 ^a		
1'	4.85 (s ancho)	
1'-OCH ₃	3.32 (s)	
2'		
3'	4.61 dd (6.5, 2,0) acoplado con OH	
4'	5.66 dc (6.4, 2.0)	
orto (2H)	7.95 d (7.4)	
para (1H)	7.42 t (7.4)	
meta (2H)	7.32 t (7.4)	
5'	1.48 d (6.4)	
1 ^a	5.39 d ancho (9.4)	
2A _{ax}	1.92 (solapado)	
2A _{ec}	2.48 (12.0, 5.0, 1.9)	
3 ^a	3.80 br señal no resuelta (solapado)	
4 ^a	3.09 t (8.8)	
5 ^a	3.54 dc (8.8, 6.1)	
6 ^a	1.32 (solapado)	
1B	4.77 dd (9.0, 1.8)	
2B _{ax}	1.57 (solapado)	
2B _{ec}	2.20 ddd (11.5, 5.0, 1.8)	
3B	3.60 (solapado)	

ES 2 355 032 A1

4B	3.00 (solapado)
5B	3.41 dc (9.1, 6.1)
6B	1.32 (solapado)
1C	5.08 d ancho (9.2)
2C _{ax}	1.19 c ancho (10.1)
2C _{ec}	2.51 ddd (12.0, 4.9, 2.0)
3C	3.60 (solapado)
4C	3.00 (solapado)
5C	3.30 (solapado)
6C	1.32 (solapado)
1D	4.67 (solapado)
2D _{ax}	1.80 (señal no resuelta)
2D _{ec}	1.92 (solapado)
3D	3.85 señal no resuelta (solapado parcialmente)
4D	3.74 (s ancho)
5D	3.70 (solapado)
6D	1.32 (solapado)
1E	5.00 d ancho (8.5)
2E _{ax}	1.57 (solapado)
2E _{ec}	1.92 (solapado)
3E	
3E-CH ₃	1.24 (s)
4E	3.00 (solapado)
5E	3.70 (solapado)
6E	1.22 d (6.0)

- Para el caso particular de emplear crotonato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de 7 días y se alcanzó una conversión de 25%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 17) con un tiempo de retención de 4.18 minutos (fórmula XXXVII).

- Para el caso particular de emplear carbonato de dialilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 50%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 18) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 3B-(prop-2-eniloxycarbonil)-mitramicina (fórmula XXXVIII) en lugar del esperado 3B-aliloxycarbonilmitramicina. La formación de este producto puede ser consecuencia de una isomerización catalizada por el ácido trifluoroacético contenido en la fase móvil de la cromatografía preparativa.

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 13 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XXXVIII).

ES 2 355 032 A1

TABLA 13

RMN de 3B-(prop-2-eniloxycarbonil)-MTM (fórmula XXXVIII)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto XXXVIII	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
1	
2	4.70 (señal no resuelta)
3	2.85 (solapado)
4 _{ax}	3.02 d ancho (15.0)
4 _{ec}	2.75 d ancho (15.0)
4 ^a	
5	6.90 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.10 (s)
8	
8 ^a	
9	
9 ^a	
10	6.90 (s)
10 ^a	
1'	4.85 (solapado)
1'-OCH ₃	3.46 (s)
2'	
3'	4.30 (solapado)
4'	4.30 (solapado)
5'	1.32 (solapado)
1 ^a	5.40 d ancho (señal no resuelta)
2Aax	1.90 (solapado)
2Aec	2.50 d ancho (señal no resuelta)
3 ^a	3.85 (solapado)
4 ^a	3.08 t (8.7)
5 ^a	3.55 (solapado)
6 ^a	1.32 (solapado)
1B	4.85 (solapado)
2Bax	1.60 (solapado)
2Bec	2.31 ddd (11.5, 5.0, 2.0)
3B	4.85 (solapado)
3B-1	5.88 dd (15.2, 1.0)
3B-2	6.99 dc (15.2, 6.5)
3B-3	2.00 (solapado)
3B-CO	
4B	3.30 (solapado)

ES 2 355 032 A1

	5B	3.55 (solapado)
	6B	1.32 (solapado)
5	1C	5.14 d ancho (9.1)
	2Cax	1.60 (solapado)
	2Cec	2.55 ddd (12.0, 5.0, 1.8)
	3C	3.70 (solapado)
10	4C	3.00 (solapado)
	5C	3.30 (solapado)
	6C	1.32 (solapado)
15	1D	4.70 d ancho (9.2)
	2Dax	1.75 ddd (12.0, 12.0, 10.0)
	2Dec	1.85 (señal no resuelta)
	3D	3.90 (solapado con OH)
20	4D	3.75 s ancho
	5D	3.70 (solapado)
	6D	1.32 (solapado)
25	1E	4.98 dd (9.6, 2.0)
	2Eax	1.60 (solapado)
	2Eec	1.90 (solapado)
	3E	
30	3E-CH3	1.24 (s)
	4E	3.00 (solapado)
	5E	3.67 dc (9.0, 6.1)
	6E	1.25 d (6.4)

35 - Para el caso particular de emplear el carbonato mixto de alilo y oxima como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 10%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 19) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. El compuesto aislado resultó ser idéntico a aquel obtenido con carbonato de dialilo como agente acilante (XXXVIII).

40 - Para el caso particular de emplear carbonato de vinileno como agente acilante el tiempo de reacción fue de 3 días y se alcanzó una conversión mayor de 95%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 20) con tiempos de reacción 3.11 y 4.13 minutos (fórmulas XXXIX y XL).

45 Ejemplo 8

Acetilación enzimática de 4'-Benzoil-MTM catalizada por CAL-B y empleando acetato de vinilo como agente acilante

50 La acetilación enzimática de la 4'-benzoi-MTM se llevó a cabo de forma análoga a como se ha expuesto en el ejemplo X1 empleando para este caso particular la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) como biocatalizador y acetato de vinilo como agente acilante. El tiempo de reacción fue de cuatro días y se alcanzó una conversión mayor de 95%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 21) el cual se identificó mediante espectrometría de masas como 3B-acetil-4'-benzoi-MTM (fórmula XLI).

55 Ejemplo 9

Acilación enzimática de MTM catalizada por CAL-A empleando diferentes agentes acilantes

60 Las acilaciones enzimáticas de MTM catalizadas por CAL-A se llevaron a cabo de forma análoga a como se ha expuesto en el ejemplo 7 pero empleando en este caso la lipasa A de *Candida antarctica* (CAL-A) como biocatalizador. Del mismo modo, el protocolo de purificación, aislamiento y caracterización de los nuevos derivados acilados es idéntico al anteriormente descrito en el ejemplo 7.

65 - Para el caso particular de emplear acetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de un día y se alcanzó una conversión de 95%. Por HPLC se identificaron dos derivados acilados (Figura 22) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados se identificaron los nuevos compuestos como 4'-acetilmitramicina y 3B-acetilmitramicina de acuerdo al ejemplo anterior (fórmula XXIII y XXIV).

ES 2 355 032 A1

- Para el caso particular de emplear cloroacetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de 4 días y se alcanzó una conversión de 10%. Por HPLC (Figura 23) se identificaron dos nuevos compuestos con tiempos de retención de 4.54 y 4.88 minutos (fórmulas XLII y XLIII, respectivamente).

- Para el caso particular de emplear propanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 95%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 24) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados los compuestos se identificaron como 3B-propanoilmitramicina y 4B-propanoilmitramicina (fórmulas XLIV y XLV, respectivamente).

ESI-MS (XLIV): 421.21, 551.31, 737.31, 825.29, 1141.51.

ESI-MS (XLV): 421.15, 551.20, 737.32, 825.30, 1141.51.

- Para el caso particular de emplear butanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de tres días y se alcanzó una conversión de 95%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 25) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (60:40) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados los compuestos se identificaron como 3B-butanoilmitramicina y 4B-butanoilmitramicina (fórmulas XLVI y XLVII, respectivamente).

ESI-MS (XLVI): 421.07, 551.17, 750.90, 825.36, 1155.30.

ESI-MS (XLVII): 421.34, 551.11, 751.57, 825.43, 1155.77.

- Para el caso particular de emplear decanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cuatro días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 26) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (55:45) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados los compuestos se identificaron como 3B-decanoilmitramicina y 4B-decanoilmitramicina (fórmulas XLVIII y XLIX, respectivamente).

ESI-MS (XLVIII): 421.14, 551.24, 825.36, 835.39, 1239.52.

ESI-MS (XLIX): 421.14, 551.31, 825.36, 835.46, 1239.74.

- Para el caso particular de emplear benzoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de 5 días y se alcanzó una conversión de 20%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 27) con un tiempo de retención de 5.65 minutos (fórmula L).

- Para el caso particular de emplear crotonato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 28) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 3B-crotonoilmitramicina (fórmulas LI).

ESI-MS (LI): 421.14, 551.17, 749.29, 825.36, 1153.46.

- Para el caso particular de emplear carbonato de dialilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 95%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 29) idéntico al obtenido en el ejemplo anterior empleando CAL-B como biocatalizador (XXXVIII).

- Para el caso particular de emplear anhídrido succínico como agente acilante el tiempo de reacción fue de tres días y se alcanzó una conversión de 85%. Por HPLC se identificaron cinco nuevos compuestos (Figura 30) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (45:55) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados los compuestos se identificaron como 4'-(3-carboxipropanoil)-mitramicina, 4B-(3-carboxipropanoil)-mitramicina, 4',4B-di-(3-carboxipropanoil)-mitramicina, 3B-(3-carboxipropanoil)-mitramicina y 4',3B-di-(3-carboxipropanoil)-mitramicina (fórmulas LII, LIII, LIV, LV y LVI, respectivamente).

ESI-MS (LII): 521.11, 651.09, 925.16, 1185.23.

ESI-MS (LIII): 421.31, 551.29, 781.26, 825.30, 1185.42.

ESI-MS (LIV): 521.24, 651.32, 881.26, 925.46, 1285.54.

ESI-MS (LV): 421.18, 551.23, 781.13, 825.43, 1185.60.

ESI-MS (LVI): 521.27, 651.24, 881.40, 925.49, 1285.71.

- Para el caso particular de emplear adipato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de seis días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 31) el cual se purificó

ES 2 355 032 A1

empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (55:45) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 3B-(5-viniloxycarbonil)-pentanoilmitramicina (fórmula LVII).

ESI-MS (LVII): 421.25, 551.36, 825.41, 835.12, 1239.92.

- Para el caso particular de emplear sorbato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cuatro días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 32) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (55:45) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 3B-(2,4-hexadienoil)-mitramicina (fórmula LVIII).

ESI-MS (LVIII): 421.32, 551.31, 775.63, 825.63, 1180.13.

- Para el caso particular de emplear carbonato de vinileno como agente acilante el tiempo de reacción fue de 3 días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 33) con tiempos de retención de 3.13 y 4.36 minutos (fórmulas LIX y LX, respectivamente).

Ejemplo 10

20 Acilación enzimática de MTM-SK catalizada por CAL-B empleando diferentes agentes acilantes

Las acilaciones enzimáticas de MTM-SK catalizadas por CAL-B se llevaron a cabo de forma análoga a como se ha expuesto en el ejemplo 7 pero empleando en este caso mitramicina SK como sustrato de partida. Del mismo modo, el protocolo de purificación, aislamiento y caracterización de los nuevos derivados acilados es idéntico al anteriormente descrito en el ejemplo 7.

- Para el caso particular de emplear acetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de tres días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 34) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 3B-acetilmitramicina SK (fórmula LXI).

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 14 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (LXI).

TABLA 14

RMN de 3B-acetil-MTM-SK (fórmula LXI)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto LXI	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
1	
2	4.76 d (10.9)
3	2.50 (solapado)
4 _{ax}	3.17 dd (16.4, 3.1)
4 _{ec}	3.00 (solapado)
4 ^a	
5	6.92 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.16 (s)
8	
8 ^a	
9	
9 ^a	
10	6.92 (s)
10 ^a	
1'	4.25 d ancho, solapado parcialmente (3.2)
1'-OCH ₃	3.56 (s)
2'	4.32 d solapado parcialmente (3.2)

ES 2 355 032 A1

	3'	
	4'	2.34 (s)
5	1 ^a	5.44 d (8.9)
	2A _{ax}	1.90 (solapado)
	2A _{ec}	2.50 (solapado)
10	3 ^a	3.84 ddd (11.8, 8.9, 5.2)
	4 ^a	3.10 t (8.9)
	5 ^a	3.59 dc (8.9, 6.1)
	6 ^a	1.32 d (solapado)
15	1B	4.87 dd (9.7 y 1.9)
	2B _{ax}	1.55 (solapado)
	2B _{ec}	2.29 ddd (12.1, 5.2, 1.9)
20	3B	4.83 ddd (11.8, 9.2, 5.2)
	3B-Ac	2.05 (s)
	4B	3.27 dt (9.1, 5.0) acoplado con 4B-OH
	4B-OH	4.58 d (5.0)
25	5B	3.53 dc (9.1 y 6.1)
	6B	1.32 d (solapado)
30	1C	5.14 dd (9.5 y 1.9)
	2C _{ax}	1.60 ddd (solapado)
	2C _{ec}	2.50 (solapado)
	3C	3.70 (solapado)
	4C	3.02 t (9.1)
35	5C	3.33 dc (8.9 y 6.3)
	6C	1.32 d (solapado)
40	1D	4.67 d ancho (solapado parcialmente)
	2D _{ax}	1.79 c ancho (10.2)
	2D _{ec}	1.90 d ancho (solapado)
	3D	3.90 (solapado)
	4D	3.70 (solapado)
45	5D	3.74 s ancho
	6D	1.32 d (solapado)
50	1E	4.98 dd (9.5 y 1.9)
	2E _{ax}	1.60 (solapado)
	2E _{ec}	1.90 dd (13.5, 2.0)
	3E	
	3E-CH ₃	1.24 (s)
55	4E	2.97 dd (9.2, 7.8) acoplado con 4E-OH
	4E-OH	3.90 d solapado parcialmente (7.8)
	5E	3.65 dc (9.0 y 6.2)
	6E	1.24 d (6.2)

- Para el caso particular de emplear cloroacetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 40%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 35) con tiempos de retención de 4.72 y 5.05 minutos (fórmulas LXII y LXIII, respectivamente).

- Para el caso particular de emplear propanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 80%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 36) con tiempos de retención de 5.12 y 6.07 minutos (fórmulas LXIV y LXV, respectivamente).

ES 2 355 032 A1

- Para el caso particular de emplear butanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 50%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 37) con tiempos de retención de 4.96 y 5.55 minutos (fórmulas LXVI y LXVII, respectivamente).

- 5 - Para el caso particular de emplear carbonato de dialilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 60%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 38) con un tiempo de retención de 5.30 minutos (fórmula LXVIII).

10 Ejemplo 11

Acilación enzimática de MTM-SK catalizada por CAL-A empleando diferentes agentes acilantes

15 Las acilaciones enzimáticas de MTM-SK catalizadas por CAL-A se llevaron a cabo de forma análoga a como se ha expuesto en el ejemplo 7 pero empleando en este caso mitramicina SK como sustrato de partida y CAL-A como biocatalizador. Del mismo modo, el protocolo de purificación, aislamiento y caracterización de los nuevos derivados acilados es idéntico al anteriormente descrito en el ejemplo 7.

20 - Para el caso particular de emplear acetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificaron dos nuevos derivados acilados (Figura 39) los cuales se purificaron empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislados los compuestos se identificaron como 3B-acetilmitramicina SK (fórmula LXI, identificado en el ejemplo anterior) y 4B-acetilmitramicina SK (fórmula LXIX).

25 ESI-MS (LXIX): 391.10, 521.22, 693.22, 795.33, 1098.50.

- Para el caso particular de emplear cloroacetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 6%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 40) con tiempos de retención de 4.75 y 5.08 minutos (fórmulas LXX y LXXI, respectivamente).

30 - Para el caso particular de emplear decanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 70%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 41) con tiempos de retención de 6.64 y 6.86 minutos (fórmulas LXXII y LXXIII, respectivamente).

35 - Para el caso particular de emplear benzoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 15%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 42) con un tiempo de retención de 5.96 minutos (fórmula LXXIV).

40 - Para el caso particular de emplear crotonato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 75%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 43) con un tiempo de retención de 5.46 minutos (fórmula LXXV).

45 - Para el caso particular de emplear carbonato de dialilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 75%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 44) con un tiempo de retención de 5.41 minutos (fórmula LXXVI).

- Para el caso particular de emplear anhídrido succínico como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificaron tres nuevos compuestos (Figura 45) con tiempos de retención de 4.17, 4.34 y 4.51 minutos (fórmulas LXXVII, LXXVIII y LXXIX, respectivamente).

50

Ejemplo 12

Acilación enzimática de MTM-SDK catalizada por CAL-B empleando diferentes agentes acilantes

55 Las acilaciones enzimáticas de MTM-SDK catalizadas por CAL-B se llevaron a cabo de forma análoga a como se ha expuesto en el ejemplo 7 pero empleando en este caso mitramicina SDK como sustrato de partida. Del mismo modo, el protocolo de purificación, aislamiento y caracterización de los nuevos derivados acilados es idéntico al anteriormente descrito en el ejemplo 7.

60 - Para el caso particular de emplear acetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 46) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (60:40) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 3B-acetilmitramicina SDK (fórmula LXXX).

65 La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 15 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (LXXX).

ES 2 355 032 A1

TABLA 15

RMN de 3B-acetil-MTM-SDK (fórmula LXXX)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto LXXX	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
1	
2	4.78 d ancho (11.5)
3	2.75 (señal no resuelta)
4 _{ax}	3.03 d ancho (14.8)
4 _{ec}	2.64 d ancho (14.8)
4 ^a	
5	6.87 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.10 (s)
8	
8 ^a	
9	
9 ^a	
10	6.87 (s)
10 ^a	
1'	5.06 s ancho
1'-OCH ₃	3.45 (s)
2'	
3'	
4'	2.37 (s)
1 ^a	5.40 d (9.1)
2A _{ax}	1.90 (solapado)
2A _{ec}	2.50 dd (12.0, 5.0)
3 ^a	3.83 ddd (11.9, 8.9, 5.0)
4 ^a	3.09 t (8.8)
5 ^a	3.55 dc solapado parcialmente (8.9, 6.2)
6 ^a	1.32 d (solapado)
1B	4.85 (solapado)
2B _{ax}	1.60 (solapado)
2B _{ec}	2.28 ddd (12.0, 5.0, 1.8)
3B	4.82 ddd (11.8, 9.2, 5.2)
3B-Ac	2.10 (s)
4B	3.26 dt (9.1, 4.0) acoplado con 4B-OH
4B-OH	4.50 d (4.0)
5B	3.52 dc solapado parcialmente (9.0 y 6.2)

ES 2 355 032 A1

	6B	1.32 d (solapado)
5	1C	5.10 d ancho (9.1)
	2C _{ax}	1.60 (solapado)
	2C _{ec}	2.55 (12.0, 5.2, 1.9)
	3C	3.70 (solapado)
	4C	3.00 (solapado)
10	5C	3.30 (señal no resuelta)
	6C	1.32 d (solapado)
15	1D	4.85 (solapado)
	2D _{ax}	1.79 c ancho (10.0)
	2D _{ec}	1.90 (solapado)
	3D	3.90 (solapado)
	4D	3.70 (solapado)
20	5D	3.74 s ancho
	6D	1.32 d (solapado)
25	1E	4.99 dd (9.5 y 1.8)
	2E _{ax}	1.60 (solapado)
	2E _{ec}	1.91 dd (13.4, 1.8)
	3E	
	3E-CH ₃	1.24 (s)
30	4E	3.00 (solapado)
	4E-OH	4.00 d (7.8) acoplado con 4E
	5E	3.67 dc (9.1 y 6.0)
	6E	1.24 d (6.0)
35	- Para el caso particular de emplear cloroacetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 35%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 47) con un tiempo de retención de 5.48 minutos (fórmula LXXXI).	
40	- Para el caso particular de emplear propanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de siete días y se alcanzó una conversión de 65%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 48) con un tiempo de retención de 5.56 minutos (fórmula LXXXII).	
45	- Para el caso particular de emplear butanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 25%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 49) con tiempos de retención de 5.46 y 5.99 minutos (fórmulas LXXXIII y LXXXIV, respectivamente).	
50	- Para el caso particular de emplear carbonato de dialilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de cinco días y se alcanzó una conversión de 25%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 50) con un tiempo de retención de 5.72 minutos (fórmula LXXXV).	

Ejemplo 13

Acilación enzimática de MTM-SDK catalizada por CAL-A empleando diferentes agentes acilantes

- 55 Las acilaciones enzimáticas de MTM-SDK catalizadas por CAL-A se llevaron a cabo de forma análoga a como se ha expuesto en el ejemplo 7 pero empleando en este caso mitramicina SDK como sustrato de partida y CAL-A como biocatalizador. Del mismo modo, el protocolo de purificación, aislamiento y caracterización de los nuevos derivados acilados es idéntico al anteriormente descrito en el ejemplo 7.
- 60 - Para el caso particular de emplear acetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de tres días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificaron dos nuevos derivados acilados (Figura 51) con tiempos de retención de 4.89 minutos (fórmula LXXXVI) y 5.21 minutos (descrito en el ejemplo anterior con la fórmula LXXX).
- 65 - Para el caso particular de emplear cloroacetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 3%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 52) con un tiempo de retención de 5.45 minutos (fórmula LXXXVII).

ES 2 355 032 A1

- Para el caso particular de emplear crotonato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de 4 días y se alcanzó una conversión de 75%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 53) con un tiempo de retención de 5.78 minutos (fórmula LXXXVIII).

5 - Para el caso particular de emplear carbonato de dialilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de 4 días y se alcanzó una conversión de 80%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 54) con un tiempo de retención de 5.73 minutos (fórmula LXXXIX).

10 - Para el caso particular de emplear anhídrido succínico como agente acilante el tiempo de reacción fue de 2 días y se alcanzó una conversión de 60%. Por HPLC se identificaron dos nuevos compuestos (Figura 55) con tiempos de retención de 4.59 y 4.77 minutos (fórmulas XC y XCI, respectivamente).

Ejemplo 14

15 *Acilación enzimática de CRM catalizada por CAL-B empleando diferentes agentes acilantes*

Las acilaciones enzimáticas de CRM catalizadas por CAL-B se llevaron a cabo de forma análoga a como se ha expuesto en el ejemplo 7 pero empleando en este caso cromomicina A₃ como sustrato de partida. Del mismo modo, el protocolo de purificación, aislamiento y caracterización de los nuevos derivados acilados es idéntico al anteriormente descrito en el ejemplo 7.

20 - Para el caso particular de emplear acetato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 95%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 56) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (50:50) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 4'-acetilcromomicina A₃ (fórmula XCII).

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 16 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XCII).

TABLA 16

RMN de 4'-acetil-CRM (fórmula XCII)

¹H-RMN (acetona-d₆, 600 MHz) y ¹³C-RMN (acetona-d₆, 150 MHz). Datos para el compuesto XCII

Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
1		203.5	C
2	4.80 (solapado)	76.6	CH
3	2.80 (solapado)	42.0	CH
4 _{ax}	2.55 (solapado)	26.9	CH ₂
4 _{ec}	3.00 (solapado)		
4a		136.8	C
5	6.88 (s)	101.4	CH
6		159.3	C
7		110.5	C
7-CH ₃	2.20 (s)	7.5	CH ₃
8		155.7	C
8a		108.1	C
9		164.9	C
9a		107.8	C
10	6.92 (s)	117.1	CH
10a		138.5	C
1'	4.86 (s ancho)	81.3	CH
1'-OCH ₃	3.54 (s)	61.0	CH ₃
2'		211.3	C
3'	4.48 dd (6.5, 2.9) acoplado con OH	76.3	CH
4'	5.30 dc (6.0, 2.9)	70.7	CH
4'-CO		169.2	C
4'-CH ₃	1.95 (s)	19.9	CH ₃
5'	1.33 (solapado)	15.2	CH ₃

ES 2 355 032 A1

5	1A	5.47 d ancho (9.5)	97.1	CH
	2A _{ax}	2.10 (solapado)	32.9	CH ₂
	2A _{ec}	2.15 (solapado)		
	3A	4.17 ddd (11.0, 6.2, 3.0)	69.7	CH
	4A	5.21 d (2.5)	67.5	CH
	4A-CH ₃	2.15 (s)	20.1	CH ₃
10	4A-CO		170.0	C
	5A	4.04 c ancho (6.4)	69.4	CH
	6A	1.20 d (6.2)	16.1	CH ₃
15	1B	5.07 (solapado)	95.0	CH
	2B _{ax}	1.59 dd (12.3, 4.7)	32.2	CH ₂
	2B _{ec}	1.90 m (señal compleja)		
	3B	3.99 ddd (10.8, 6.0, 3.0)	66.1	CH
	4B	3.22 s ancho	81.6	CH
	4B-OCH ₃	3.41 (s)	58.0	CH ₃
	5B	3.93 c ancho (6.8)	67.0	CH
	6B	1.21 d (6.1)	17.2	CH ₃
25	1C	5.13 d ancho (9.7)	100.6	CH
	2C _{ax}	1.70 c ancho (10.4)	37.4	CH ₂
	2C _{ec}	2.60 (solapado))		
	3C	3.72 (solapado)	81.6	CH
	4C	3.00 (solapado)	75.2	CH
	5C	3.33 dc (9.0, 6.2)	72.1	CH
	6C	1.31 d (6.2)	17.4	CH ₃
35	1D	4.80 (solapado)	99.4	CH
	2D _{ax}	1.49 c ancho (10.7)	36.5	CH ₂
	2D _{ec}	2.40 d ancho (10.3)		
	3D	3.72 (solapado)	76.1	CH
	4D	3.13 m (señal no resuelta)	74.9	CH
	5D	3.45 dc (9.0, 6.1)	72.4	CH
	6D	1.33 (solapado)	17.6	CH ₃
45	1E	5.07 (solapado)	94.4	CH
	2E _{ax}	2.00 (solapado)	43.9	CH ₂
	2E _{ec}	2.10 (solapado)		
	3E		70.6	C
	3E-CH ₃	1.42 (s)	22.7	CH ₃
	4E	4.68 d (9.7)	79.3	CH
	4E-CH ₃	2.05 (s)	20.3	CH ₃
	4E-CO		170.3	C
55	5E	4.11 dc (10.0, 6.2)	65.7	CH
	6E	1.12 d (6.2)	16.6	CH ₃

60 - Para el caso particular de emplear propanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (Figura 57) con un tiempo de retención de 3.62 minutos (fórmula XCIII).

65 - Para el caso particular de emplear butanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 58) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (60:40) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 4'-butanoilcromomicina A₃ (fórmula XCIV).

ES 2 355 032 A1

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 17 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XCIV).

TABLA 17

RMN de 4'-butanoil-CRM (fórmula XCIV)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XCIV			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
1		202.0	C
2	4.80 (solapado)	76.4	CH
3	2.80 (solapado)	42.0	CH
4 _{ax}	2.55 (solapado)	26.9	CH ₂
4 _{ec}	3.00 (solapado)		
4a		136.9	C
5	6.89 (s)	101.5	CH
6		159.1	C
7		110.6	C
7-CH ₃	2.17 (s)	7.5	CH ₃
8		155.4	C
8a		108.1	C
9		165.0	C
9a		107.8	C
10	6.93 (s)	117.2	CH
10a		141.3	C
1'	4.84 (s ancho)	81.3	CH
1'-OCH ₃	3.54 (s)	61.0	CH ₃
2'		209.4	C
3'	4.48 dd (6.4, 2.4) acoplado con OH	76.2	CH
4'	5.32 dc (6.0, 2.7)	70.5	CH
5'	1.32 (solapado)	15.3	CH ₃
6'		171.9	C
7'	2.22 t (5.9)	35.6	CH ₂
8'	1.50 (solapado)	18.0	CH ₂
9'	0.84 t (7.3)	13.0	CH ₃
1A	5.46 d ancho (8.9)	97.2	CH
2A _{ax}	2.05 (solapado)	32.9	CH ₂
2A _{ec}	2.15 (solapado)		
3A	4.15 (solapado))	69.7	CH
4A	5.22 (s ancho)	67.5	CH

ES 2 355 032 A1

5	4A-CH ³	2.15 (s)	19.9	CH ₃
	4A-CO		169.9	C
	5A	3.93 c ancho (6.5)	69.4	CH
	6A	1.20 d (6.5)	16.1	CH ₃
10	1B	5.07 (solapado)	95.0	CH
	2B _{ax}	1.58 dd (12.5, 4.4)	33.1	CH ₂
	2B _{ec}	1.90 m (señal compleja)		
	3B	3.98 ddd (10.5, 6.0, 3.3)	66.1	CH
15	4B	3.21 s ancho	81.6	CH
	4B-OCH ₃	3.41 (s)	58.1	CH ₃
	5B	4.02 c ancho (6.2)	67.0	CH
	6B	1.22 d (6.2)	17.2	CH ₃
20	1C	5.13 d ancho (9.3)	100.5	CH
	2C _{ax}	1.70 (señal no resuelta)	37.4	CH ₂
	2C _{ec}	2.55 (solapado)		
	3C	3.70 (solapado)	81.6	CH
25	4C	3.00 (solapado)	75.3	CH
	5C	3.35 dc (9.0, 6.0)	72.1	CH
	6C	1.32 (solapado)	17.4	CH ₃
30	1D	4.80 (solapado)	99.4	CH
	2D _{ax}	1.49 c ancho (10.4)	36.5	CH ₂
	2D _{ec}	2.40 s ancho (señal no resuelta)		
	3D	3.70 (solapado)	76.0	CH
35	4D	3.12 m (señal no resuelta)	74.9	CH
	5D	3.45 dc (9.0, 6.0)	72.4	CH
	6D	1.32 (solapado)	17.6	CH ₃
40	1E	5.07 (solapado)	94.5	CH
	2E _{ax}	1.95 (solapado)	43.9	CH ₂
	2E _{ec}	2.00 (solapado)		
	3E		69.5	C
45	3E-CH ₃	1.43 (s)	22.7	CH ₃
	4E	4.68 d (9.7)	79.3	CH
	4E-CH ₃	2.06 (s)	20.1	CH ₃
	4E-CO		170.2	C
50	5E	4.11 dc (9.8, 6.0)	65.7	CH
	6E	1.12 d (6.0)	16.5	CH ₃

55 - Para el caso particular de emplear decanoato de vinilo como agente acilante el tiempo de reacción fue de dos días y se alcanzó una conversión de 90%. Por HPLC se identificó un único derivado acilado (Figura 59) el cual se purificó empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (70:30) a un flujo de 20 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 4'-decanoilcromomicina A₃ (fórmula XCV).

60 La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 18 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XCV).

65

ES 2 355 032 A1

TABLA 18

RMN de 4'-decanoil-CRM (fórmula XCV)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto XCV	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)
1	
2	4.82 d (11.6)
3	2.85 (señal compleja)
4 _{ax}	2.55 dd (15.4, 11.8)
4 _{ec}	3.07 brd (16.0)
4 ^a	
5	6.85 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.17 (s)
8	
8 _a	
9	
9 _a	
10	6.95 (s)
10 _a	
1'	4.92 s (1.3)
1'-OCH ₃	3.54 (s)
2'	
3'	4.45 s ancho
4'	5.30 dc (6.0, 2.7)
5'	1.34 d (6.0)
6'	
7'	2.29 t (7.4)
8'	1.60 (solapado)
9'	1.20 (solapado)
10'	1.20 (solapado)
11'	1.20 (solapado)
12'	1.20 (solapado)
13'	1.20 (solapado)
14'	1.20 (solapado)
15'	0.89 t (7.3)
1A	5.50 dd (9.6, 2.2)
2A _{ax}	2.05 (solapado)
2A _{ec}	2.15 (solapado)
3A	4.15 ddd (12.2, 4.8, 3.3)
4A	5.22 d (2.8)
4A-CH ₃	2.15 (s)
4A-CO	
5A	3.91 c ancho (6.6)

ES 2 355 032 A1

	6A	1.20 d (6.6)
5	1B	5.06 d (3.2)
	2B _{ax}	1.60 (solapado)
	2B _{ec}	1.90 (señal compleja)
	3B	3.98 ddd (11.9, 4.4, 2.9)
	4B	3.22 s ancho
10	4B-OCH ₃	3.40 (s)
	5B	4.05 c ancho (6.4)
	6B	1.21 d (6.4)
15	1C	5.11 dd (9.7, 1.7)
	2C _{ax}	1.70 (señal compleja)
	2C _{ec}	2.56 ddd (11.3, 5.2, 1.7)
	3C	3.72 (solapado)
20	4C	3.04 t (9.0)
	5C	3.33 dc (9.0, 6.2)
	6C	1.30 d (6.2)
25	1D	4.81 (solapado)
	2D _{ax}	1.50 (solapado)
	2D _{ec}	2.41 ddd (12.4, 5.0, 1.8)
	3D	3.72 (solapado)
30	4D	3.13 t (9.0)
	5D	3.47 dc (9.0, 6.3)
	6D	1.33 d (6.3)
35	1E	5.09 dd (4.0, 1.5)
	2E _{ax}	1.95 dd (12.0, 4.0)
	2E _{ec}	2.00 dd (12.0, 1.5)
	3E	
40	3E-CH ₃	1.43 (s)
	4E	4.68 d (9.7)
	4E-CH ₃	2.07 (s)
	4E-CO	
45	5E	4.11 dc (9.8, 6.4)
	6E	1.12 d (6.4)

Ejemplo 15

50 *Actividad antitumoral de los compuestos de fórmula (VII), (VIII), (IX), (XII), (XIII), (XIV), (XVI), (XVII), (XVIII), (XIX), (XX), (XXXI), (XXXVIII), (XLVI), (LI), (LII), (LIII), (LV), (LXI), (LXVIII), (LXIX)*

Cultivo Celular

55 Los derivados de MTM y CRM se ensayaron frente a una serie de líneas celulares procedentes de tumores. Todas las líneas celulares tumorales se obtuvieron a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC): A549 (carcinoma de pulmón humano); H116 (adenocarcinoma de colon); PSN1 (adenocarcinoma pancreático) y T98G (glioblastoma humano). Las células fueron cultivadas en medio RPMI conteniendo glutamina (2 mM), penicilina (50 IU/ml) y estreptomycin (50 µg/ml). En el caso de las líneas A549 y H116 el medio fue suplementado con 5% FBS.

60 En el caso de las líneas PSN1 y T98G el medio se suplementó con 10% FBS.

Ensayo de proliferación celular

65 Para evaluar el efecto citotóxico de los diferentes compuestos se han realizado estudios de viabilidad celular, mediante un ensayo basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Esta reducción metabólica es llevada a cabo por el enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables, y da como resultado la formación de formazán, un producto coloreado cuya concentración puede ser determinada por espectrofotometría.

El ensayo se realizó esencialmente según la técnica descrita por Mosmann, (*J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55). Las células tumorales se incubaron en placas "microtiter" de 96 pocillos, en un volumen total de 200 μ L de medio completo (4×10^3 células por pocillo en el caso de la línea A549 y 6×10^3 células por pocillo en el caso de las líneas H116, PSN1 y T98G). A continuación se añadieron a cada pocillo diluciones seriadas en DMSO del compuesto a ensayar (10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.05 μ g/ml, 0.01 μ g/ml, y 0.005 μ g/ml). Tras 2 días de incubación (a 37°C, 5% de CO₂ en una atmósfera húmeda), se añadieron a cada pocillo 50 μ L de MTT (1 mg/mL en PBS), y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Tras este periodo de incubación, el formazán resultante se resuspendió en 100 μ L de DMSO y se midió espectrofotométricamente a 490 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

TABLA 19

Ensayo de la actividad antitumoral de derivados de ácidos aureólicos de fórmula (VII), (VIII), (IX), (XII), (XIII), (XIV), (XVI), (XVII), (XVIII), (XIX), (XX), (XXXI), (XXXVIII), (XLVI), (LI), (LII), (LIII), (LV), (LXI), (LXVIII), (LXIX) frente a diversas líneas celulares tumorales. Como referencia se incluyen también los datos obtenidos con MTM, MTM-SK, MTM-SDK, 3D-desmicarosil-MTM-SK, y 3D-desmicarosil-3D- β -D-digitoxosil-MTM. Los valores numéricos hacen referencia al IC₅₀ (μ M), o concentración a la que el compuesto ensayado inhibe el 50% del crecimiento celular en comparación con células no tratadas

Compuestos	Líneas celulares (tipo de cáncer)			
	A549 (pulmón)	H116 (colón)	PSN1 (próstata)	T98G (glioblastoma)
MTM	0,046	0,0092	0,0092	0,069
MTM-SK	0,0094	0,0094	0,0094	0,0473
MTM-SDK	0,0094	0,0094	0,0094	0,0474
3D-desmicarosil-MTM-SK	1	0,5	1	>1
3D-desmicarosil-3D- β -D-Digitoxosil-MTM	0,0466	0,0466	0,0466	0,069
(VII)	0,05	0,01	0,1	0,3
(VIII)	0,05	0,05	0,1	0,3
(IX)	0,005	0,005	0,005	0,01
(XII)	0,05	0,01	0,05	0,3
(XIII)	0,01	0,003	0,01	0,05
(XIV)	0,05	0,01	0,05	0,75
(XVI)	0,0449	0,0089	0,0089	0,4716
(XVII)	0,0449	0,0449	0,0089	0,0674
(XVIII)	0,0449	0,0449	0,0089	0,0898
(XIX)	0,0432	0,0432	0,0086	0,2121
(XX)	0,0417	0,0083	0,0083	0,309
(XXXI)	0,043	0,043	0,043	0,043
(XXXVIII)	0,008	0,008	0,004	0,043
(XLVI)	0,433	0,043	0,043	0,043
(LI)	0,043	0,043	0,043	0,087
(LII)	0,42	0,42	0,42	0,844
(LIII)	4,21	0,844	0,633	0,844
(LV)	4,21	4,21	0,422	4,21
(LXI)	0,045	0,009	0,0065	0,045
(LXVIII)	0,0065	0,004	0,009	0,004
(LXIX)	0,009	0,009	0,045	0,004

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Estructura de la mitramicina y la cromomicina A₃.

Figura 2: Análisis por HPLC de un extracto de acetato de etilo de *S. argillaceus* ΔAH W⁻ (pMP3*B2). Identificador de los picos: 1 = desmicarosil-3D-MTM-SK; 2 = 3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM-SK [fórmula (VII)]; 3 = MTM-SK; 4 = desmicarosil-3D-MTM-SDK [fórmula (VIII)]; 5 = 3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM-SDK [fórmula (IX)]; 6 = MTM-SDK.

Figura 3: Análisis por HPLC de un extracto de metanol de *S. argillaceus* ΔAH W⁻ (pMP3*B2). Identificador de los picos: 1 = desmicarosil-3D-MTM-SA [fórmula (X)]; 2 = 3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM-SA [fórmula (XI)]; 3 = MTM-SA.

Figura 4: Análisis por HPLC de la bioconversión de MTM utilizando *S. griseus* C10GIV. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = acetil-MTM [fórmula (XII)]; 3 = diacetil-MTM [fórmula (XIII)].

Figura 5: Análisis por HPLC de la bioconversión de MTM-SK utilizando *S. griseus* C10GIV. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = acetil-MTM-SK [fórmula (XIV)]; 3 = diacetil-MTM_SK [fórmula (XV)].

Figura 6: Análisis por HPLC de la bioconversión de 3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM empleando *S. griseus* C10GIV.

Identificador de los picos: 1 = 3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM; 2 = acetil-3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM pico 1 [fórmula (XVI)]; 3 = acetil-3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM pico 2 [fórmula (XVII)]; 4 = acetil-3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM pico 3 [fórmula (XVIII)]; 5 = diacetil-3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM [fórmula (XIX)]; 6 = triacetil-3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM [fórmula (XX)].

Figura 7: Análisis por HPLC de la bioconversión de 3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM-SK empleando *S. griseus* C10GIV. Identificador de los picos: 1 = 3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM-SK; 2 = acetil-3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM-SK [fórmula (XXI)]; 3 = diacetil-3D-desmicarosil-3D-b-D-digitoxosil-MTM-SK [fórmula (XXII)].

Figura 8: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con acetato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 4'-acetil-MTM [fórmula (XXIII)]; 3 = 3B-acetil-MTM [fórmula (XXIV)]; 4 = 4',3B-diacetil-MTM [fórmula (XXV)].

Figura 9: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con acetato de 2,2,2-trifluoroetilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 4'-acetil-MTM [fórmula (XXIII)]; 3 = 3B-acetil-MTM [fórmula (XXIV)]; 4 = 4',3B-diacetil-MTM [fórmula (XXV)].

Figura 10: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con cloroacetato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = compuesto de fórmula XXVI; 3 = compuesto de fórmula XXVII; 4 = compuesto de fórmula XXVIII.

Figura 11: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con propanoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 4'-propanoil-MTM [fórmula (XXIX)]; 3 = 4',3B-dipropanoil-MTM [fórmula (XXX)].

Figura 12: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con butanoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = 4'-butanoil-MTM [fórmula (XXXI)]; 2 = 4',3B-dibutanoil-MTM [fórmula (XXXII)].

Figura 13: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con levulinato de acetoxima catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = compuesto de fórmula XXXIII.

Figura 14: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con decanoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 4'-decanoil-MTM [fórmula (XXXIV)].

Figura 15: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con dodecanoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = compuesto de fórmula XXXV.

Figura 16: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con benzoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 4'-benzoil-MTM [fórmula (XXXVI)].

Figura 17: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con crotonato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = compuesto de fórmula XXXVII.

Figura 18: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con carbonato de dialilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-alliloxicarbonil-MTM [fórmula (XXXVIII)].

Figura 19: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con carbonato mixto de alilo y oxima catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-alliloxicarbonil-MTM [fórmula (XXXVIII)].

Figura 20: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con carbonato de vinileno catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = compuesto de fórmula XXXIX; 2 = compuesto de fórmula XL.

Figura 21: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de 4'-Bz-MTM con acetato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = 4'-Bz-MTM [fórmula (XXXVI)]; 2 = 3B-acetil-4'-benzoil-MTM [fórmula (XLI)].

Figura 22: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con acetato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 4'-acetil-MTM [fórmula (XXIII)]; 3 = 3B-acetil-MTM [fórmula (XXIV)].

Figura 23: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con cloroacetato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = compuesto de fórmula XLII; 3 = compuesto de fórmula XLIII.

Figura 24: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con propanoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-propanoil-MTM [fórmula (XLIV)]; 3 = 4B-propanoil-MTM [fórmula (XLV)].

Figura 25: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con butanoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-butanoil-MTM [fórmula (XLVI)]; 3 = 4B-butanoil-MTM [fórmula (XLVII)].

Figura 26: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con decanoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-decanoil-MTM [fórmula (XLVIII)]; 3 = 4B-decanoil-MTM [fórmula (XLIX)].

Figura 27: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con benzoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = compuesto de fórmula L.

Figura 28: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con crotonato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-crotonoil-MTM [fórmula (LI)].

Figura 29: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con carbonato de dialilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-aliloxicarbonil-MTM [fórmula (XXXVIII)].

Figura 30: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con anhídrido succínico catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 4'-(3-carboxipropanoil)-MTM [fórmula (LII)], 2 = 4B-(3-carboxipropanoil)-MTM [fórmula (LIII)], 3 = 4',4B-di-(3-carboxipropanoil)-MTM [fórmula (LIV)], 4 = 3B-(3-carboxipropanoil)-MTM [fórmula (LV)], 5 = 4',3B-di-(3-carboxipropanoil)-MTM [fórmula (LVI)].

Figura 31: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con adipato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-adipoil-MTM [fórmula (LVII)].

Figura 32: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con sorbato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = 3B-(2,4-hexadienoil)-MTM [fórmula (LVIII)].

Figura 33: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM con carbonato de vinileno catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM; 2 = compuesto de fórmula LIX; 3 = compuesto de fórmula LX.

Figura 34: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con acetato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = 3B-acetil-MTM-SK [fórmula (LXI)].

Figura 35: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con cloroacetato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXII; 3 = compuesto de fórmula LXIII.

Figura 36: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con propanoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXIV; 3 = compuesto de fórmula LXV.

Figura 37: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con butanoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXVI; 3 = compuesto de fórmula LXVII.

Figura 38: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con carbonato de dialilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXVIII.

Figura 39: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con acetato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = 3B-acetil-MTM-SK [fórmula (LXI)]; 3 = 4B-acetil-MTM-SK [fórmula (LXIX)].

5 Figura 40: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con cloroacetato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXX; 3 = compuesto de fórmula LXXI.

Figura 41: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con decanoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXXII; 3 = compuesto de fórmula LXXIII.

10 Figura 42: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con benzoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXXIV.

15 Figura 43: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con crotonato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXXV.

Figura 44: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con carbonato de dialilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXXVI.

20 Figura 45: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SK con anhídrido succínico catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SK; 2 = compuesto de fórmula LXXVII; 3 = compuesto de fórmula LXXVIII; 4 = compuesto de fórmula LXXIX.

25 Figura 46: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con acetato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = 3B-acetil-MTM-SDK [fórmula (LXXX)].

Figura 47: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con cloroacetato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula LXXXI.

30 Figura 48: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con propanoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula LXXXII.

35 Figura 49: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con butanoato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula LXXXIII; 3 = compuesto de fórmula LXXXIV.

Figura 50: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con carbonato de dialilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula LXXXV.

40 Figura 51: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con acetato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula LXXXVI; 3 = compuesto de fórmula LXXX.

Figura 52: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con cloroacetato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula LXXXV.

45 Figura 53: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con crotonato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula LXXXVIII.

50 Figura 54: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con carbonato de dialilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula LXXXIX.

Figura 55: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de MTM-SDK con anhídrido succínico catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = MTM-SDK; 2 = compuesto de fórmula XC; 3 = compuesto de fórmula XCI.

55 Figura 56: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de CRM con acetato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = CRM; 2 = 4'-acetil-CRM [fórmula (XCII)].

Figura 57: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de CRM con propanoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = CRM; 2 = 4'-propanoil-CRM [fórmula (XCIII)].

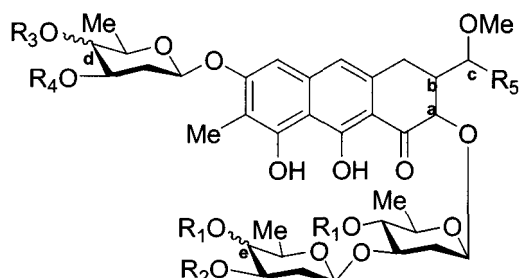
60 Figura 58: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de CRM con butanoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = CRM; 2 = 4'-butanoil-CRM [fórmula (XCIV)].

65 Figura 59: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de CRM con decanoato de vinilo catalizada por CAL-A. Identificador de los picos: 1 = CRM; 2 = 4'-decanoil-CRM [fórmula (XCV)].

REIVINDICACIONES

1. Compuesto con fórmula general (I):

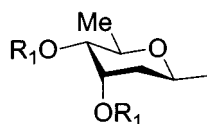
(I)



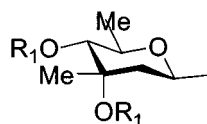
donde,

R₁ es hidrógeno o un grupo protector,

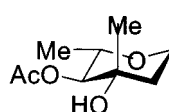
R₂ es hidrógeno, o un grupo protector, o un monosacárido de fórmula (II),



o un monosacárido de fórmula (III),

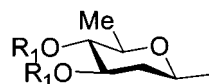


o un monosacárido de fórmula (IV),

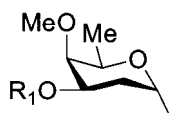


R₃ es hidrógeno o un grupo acetilo,

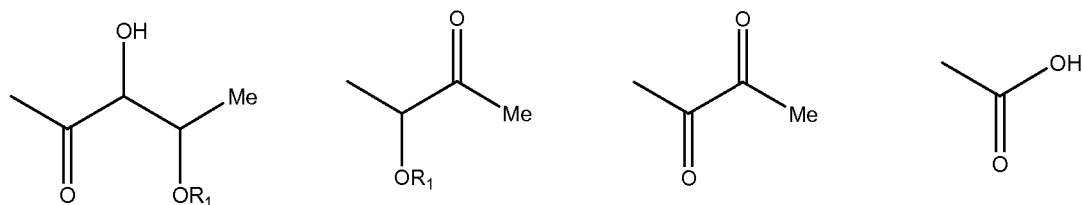
R₄ es un monosacárido de fórmula (V),



o un monosacárido de fórmula (VI)

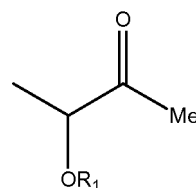


R₅ puede ser seleccionado entre los siguientes sustituyentes:



teniendo en consideración que si R₂ es el monosacárido de fórmula (III) o el monosacárido de fórmula (IV), al me-

nos un R₁ debe ser un grupo protector; y considerando igualmente que si R₂ es hidrógeno y R₅ es

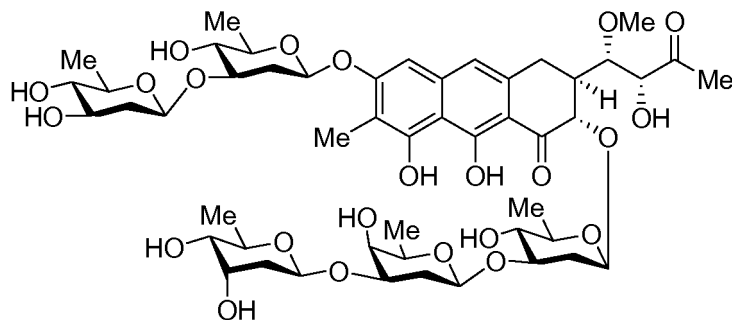


entonces, al menos un R₁ debe ser un grupo protector;

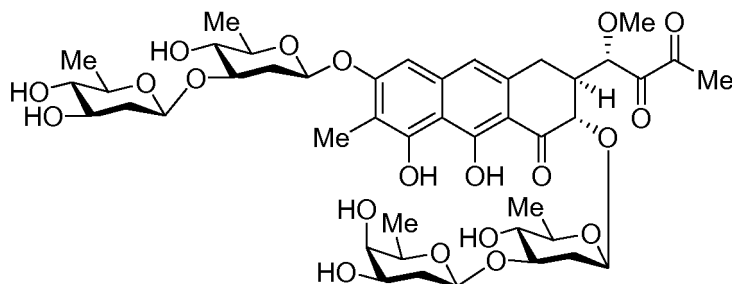
teniendo además en cuenta que la estereoquímica de los carbonos a, b y c, así como la de los centros quirales presentes en R₅ puede ser R, S, o una mezcla de ambos, y que los sustituyentes de los carbonos d y e pueden estar tanto en posición axial como en ecuatorial.

2. Compuesto, según la reivindicación 1, donde el grupo protector se selecciona entre: un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalquilo heterocíclico, un grupo hidroxialquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo alcoxialquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo alquilarilo, un grupo éster, un grupo carbonato, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo uretano, un grupo sililo, un grupo sulfoxo o una combinación de cualquiera de ellos.

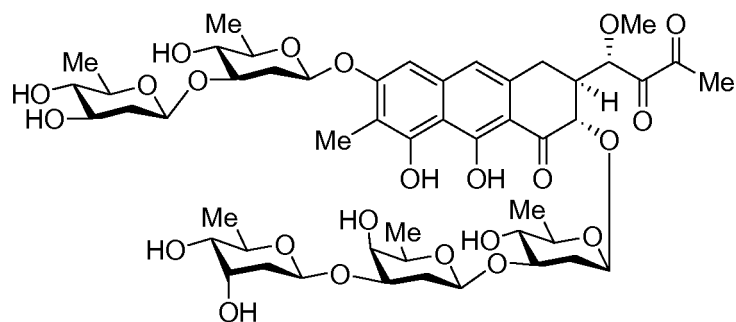
3. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula VII:



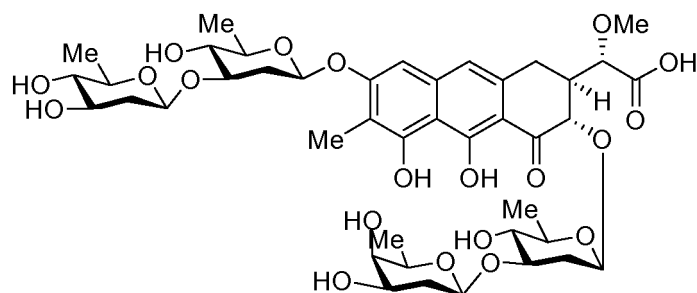
4. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula VIII:



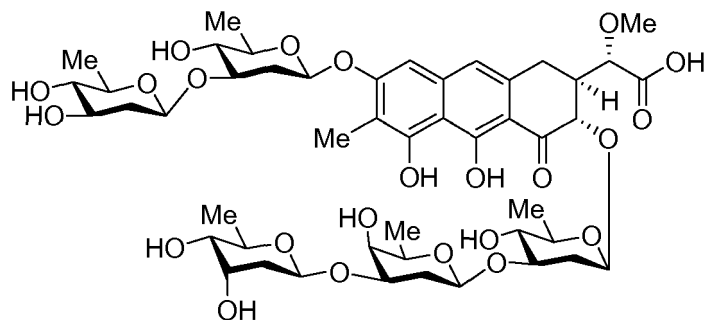
5. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula IX:



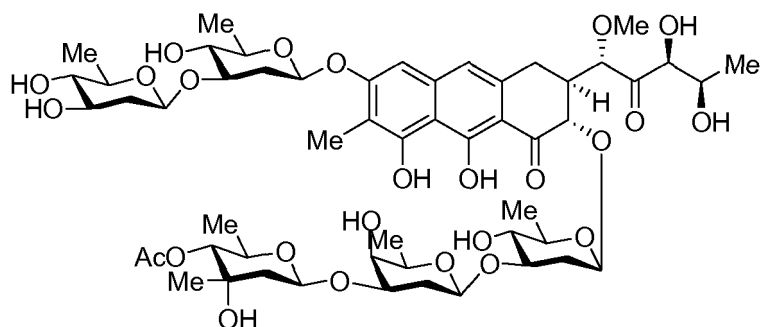
6. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula X:



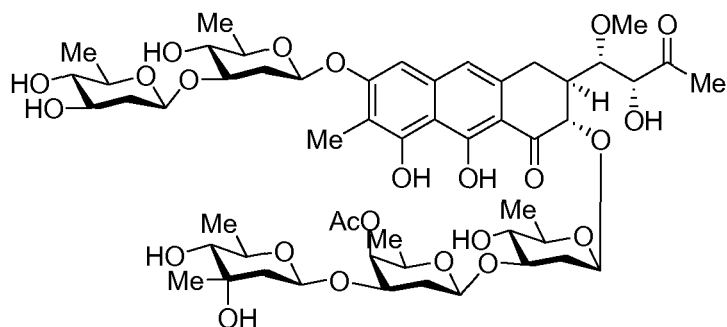
7. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XI:



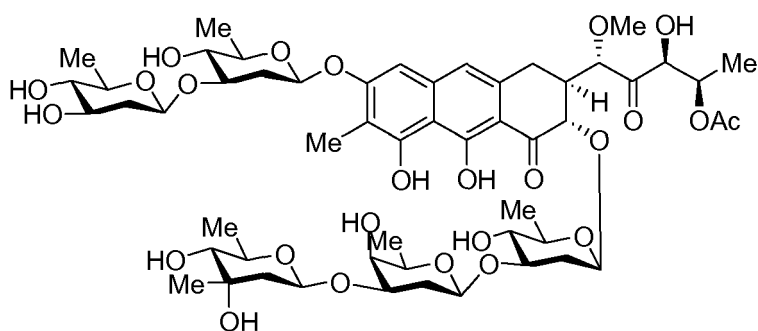
8. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XII:



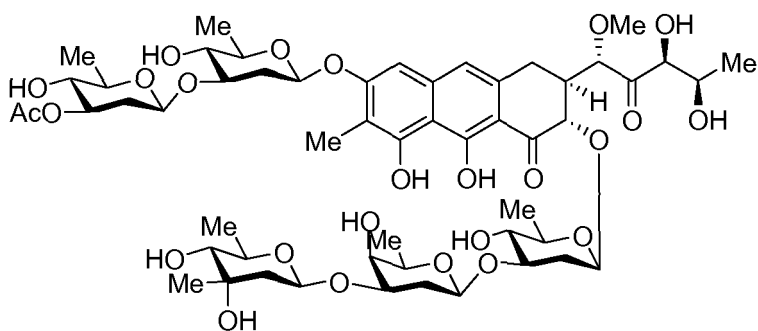
9. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XIV:



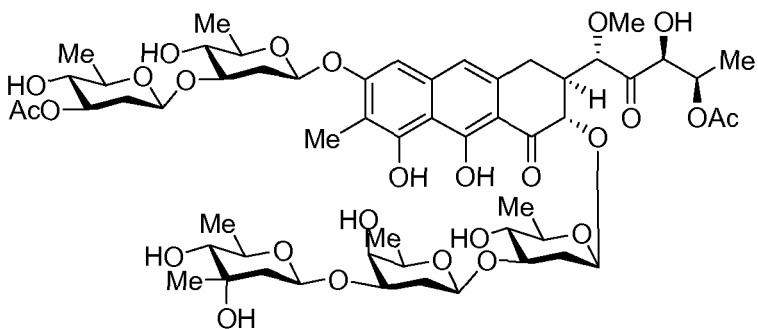
10. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXIII:



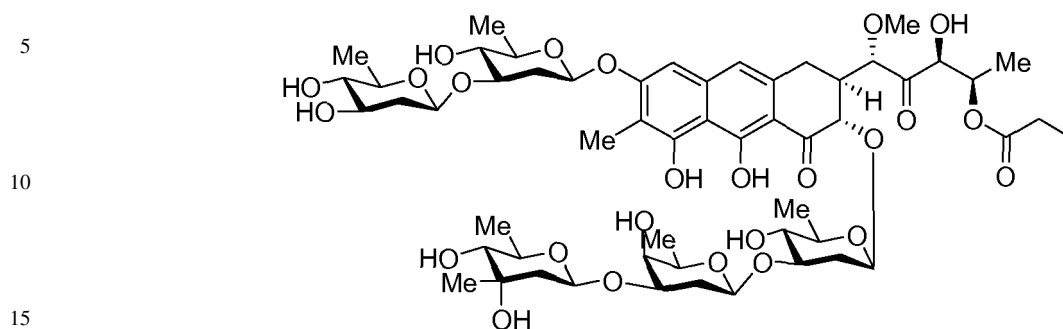
11. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXIV:



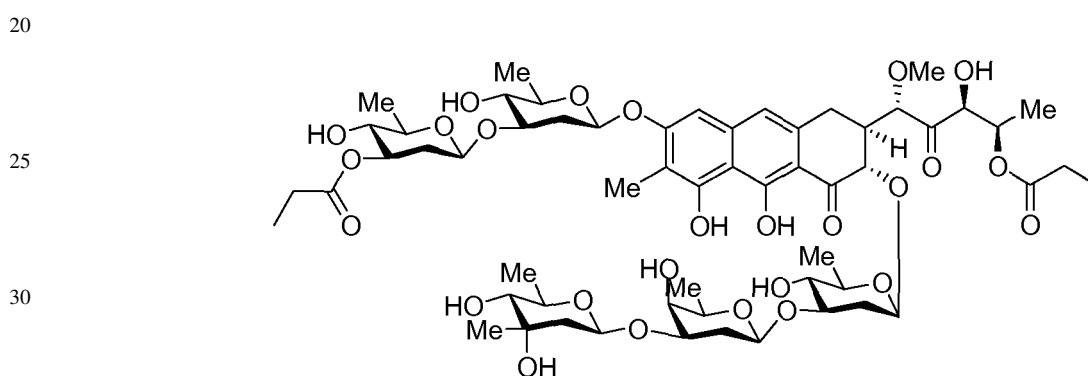
12. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXV:



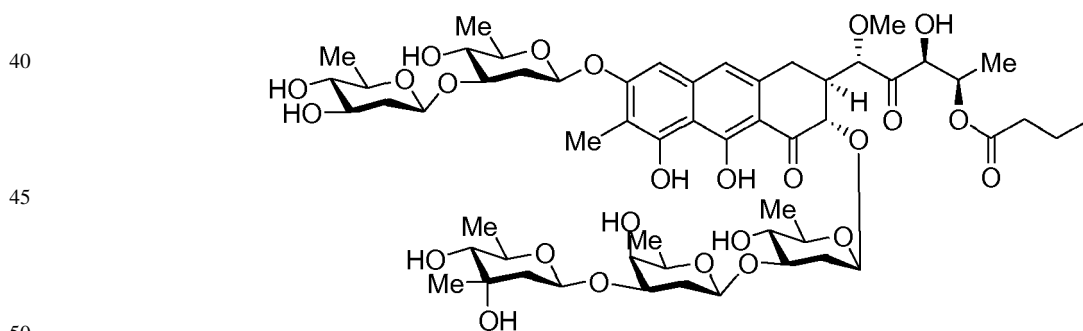
13. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXIX:



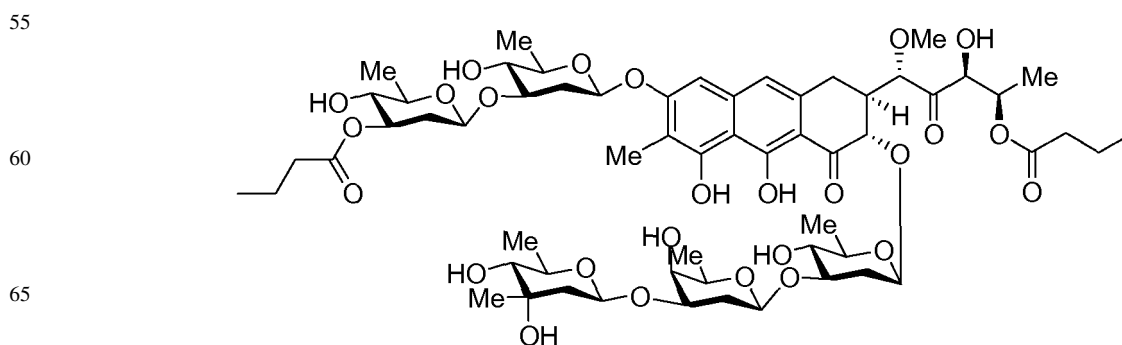
14. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXX:



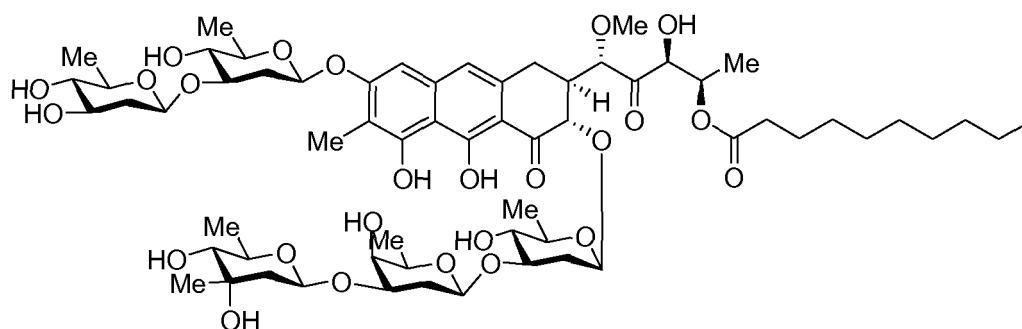
15. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXXI:



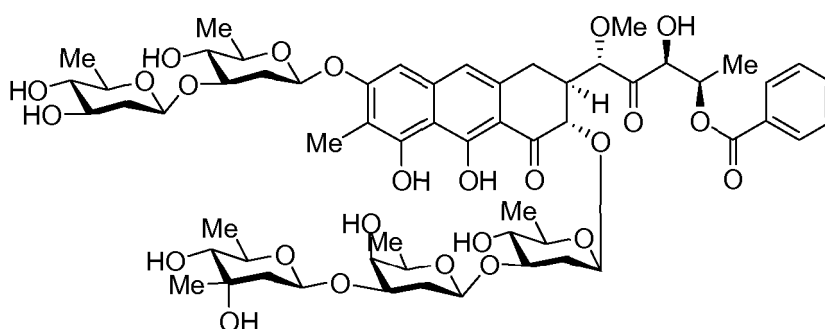
16. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXXII:



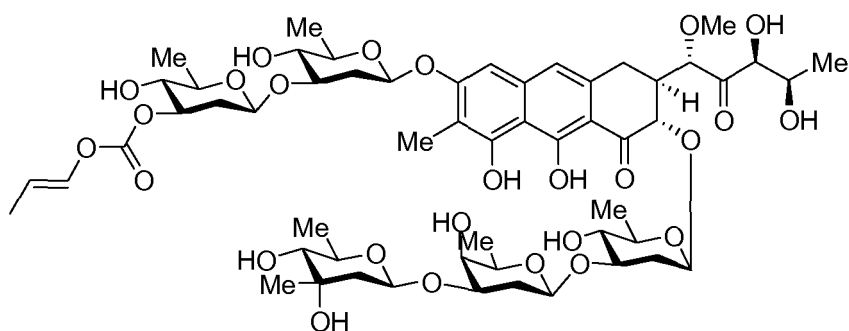
17. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXXIV:



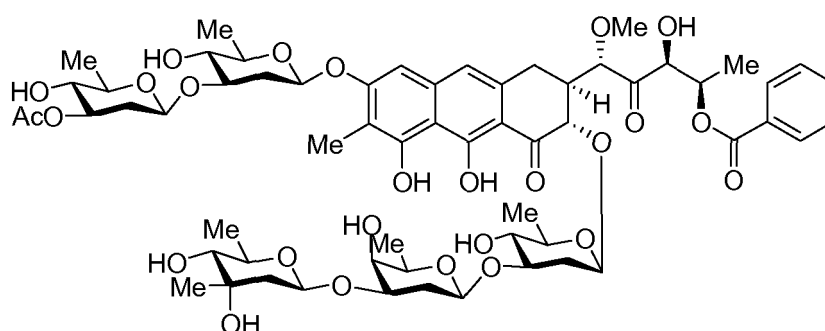
18. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXXVI:



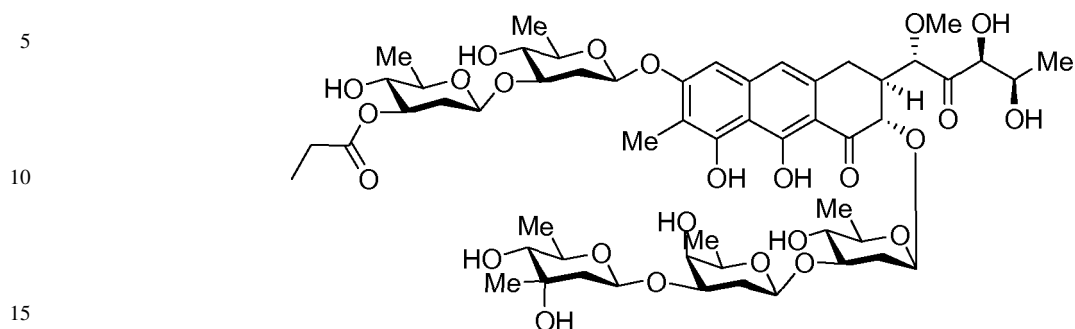
19. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XXXVIII:



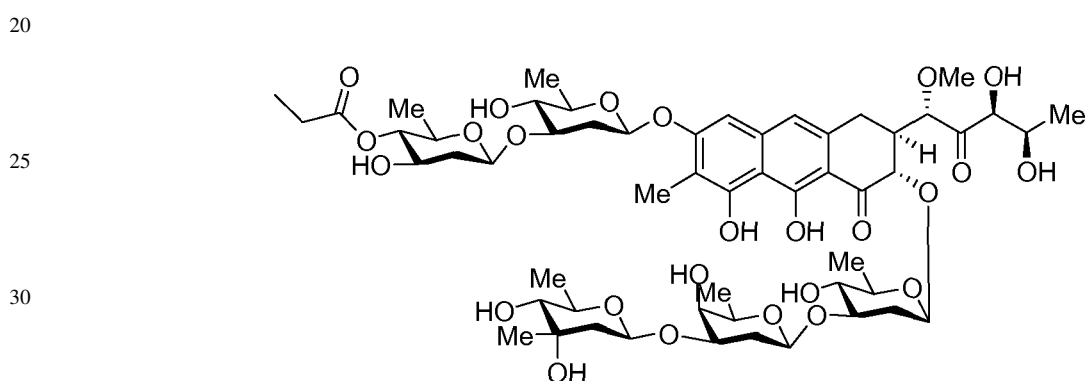
20. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XLI:



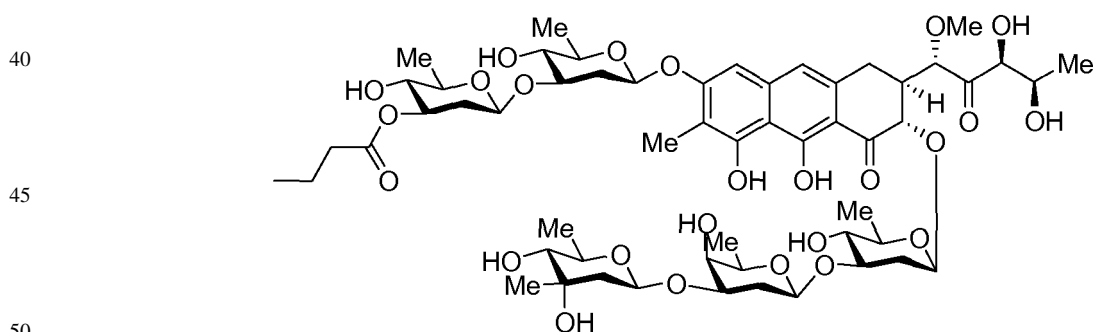
21. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XLIV:



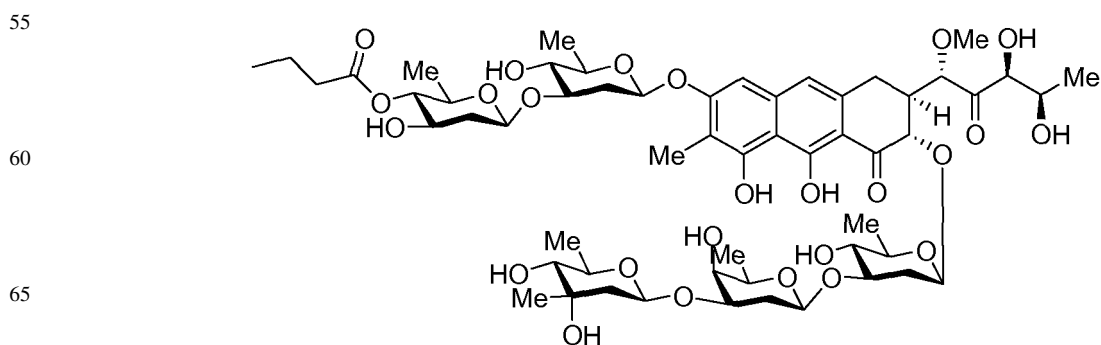
22. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XLV:



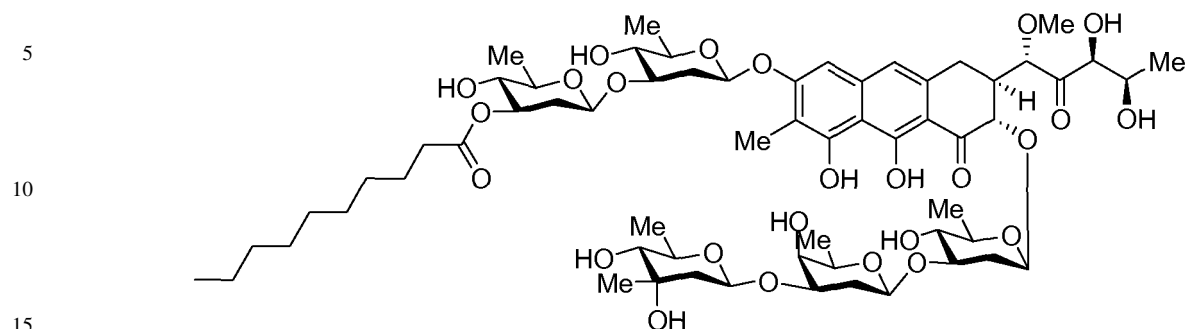
23. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XLVI:



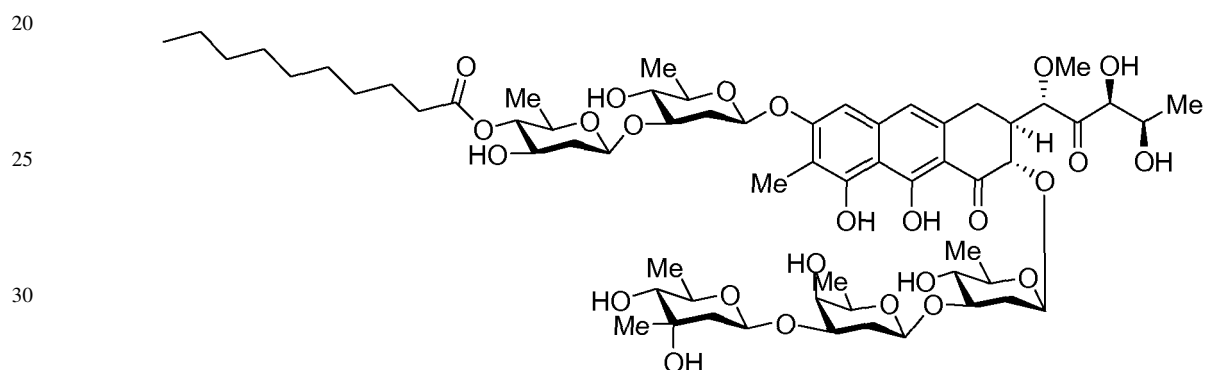
24. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XLVII:



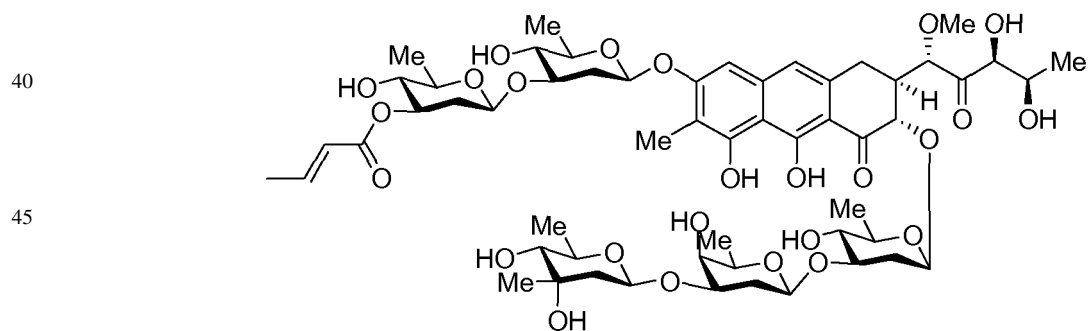
25. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XLVIII:



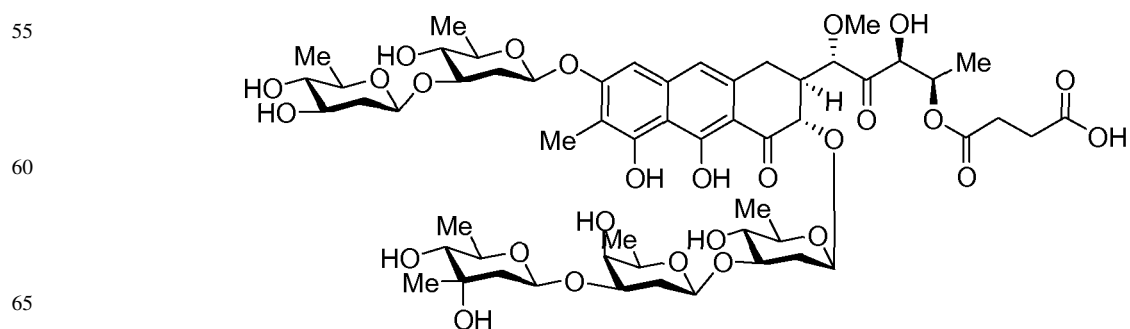
26. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XLIX:



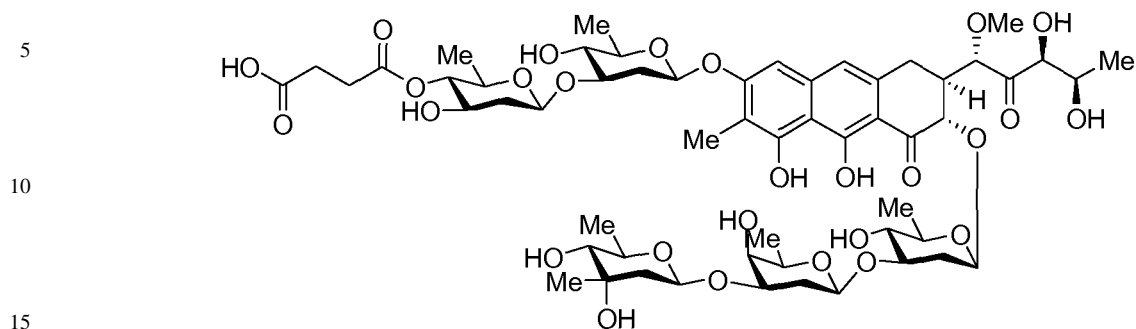
27. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LI:



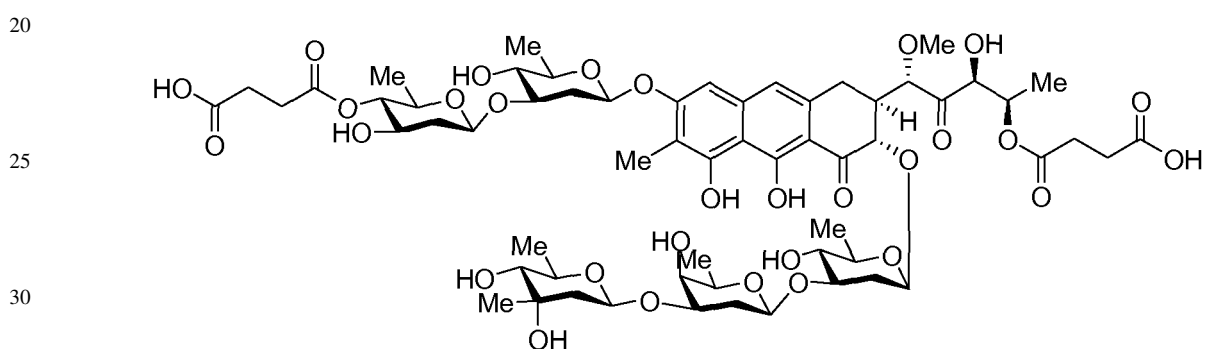
28. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LII:



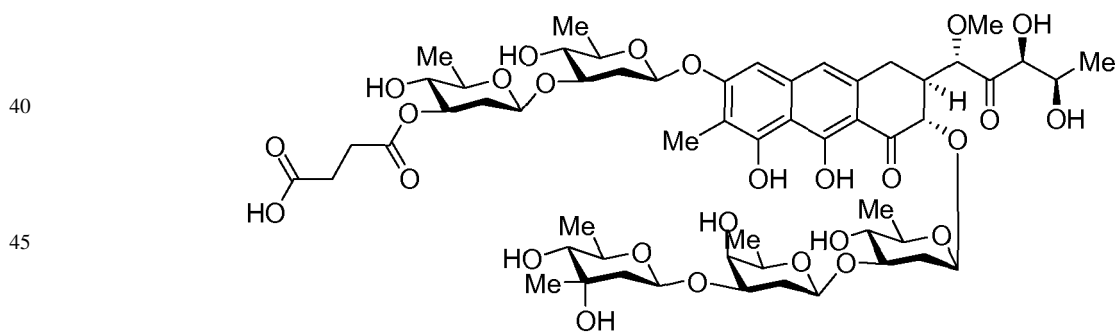
29. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LIII:



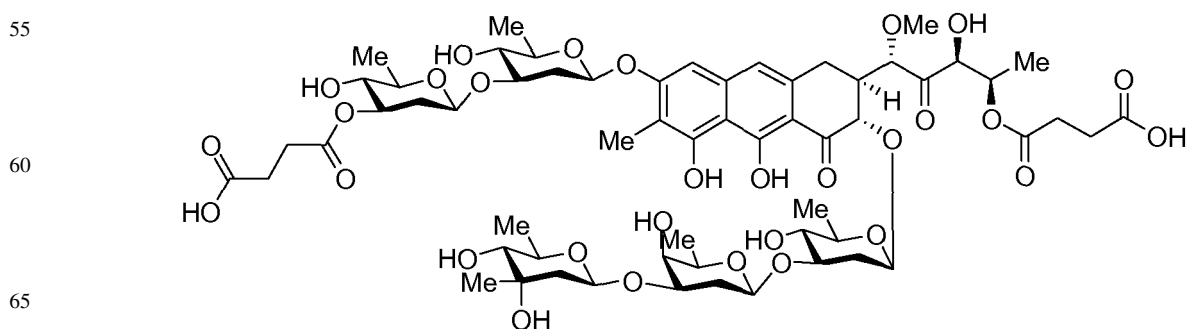
30. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LIV:



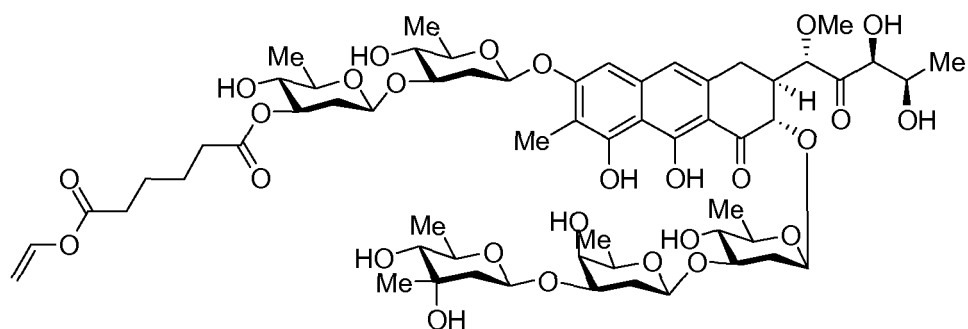
31. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LV:



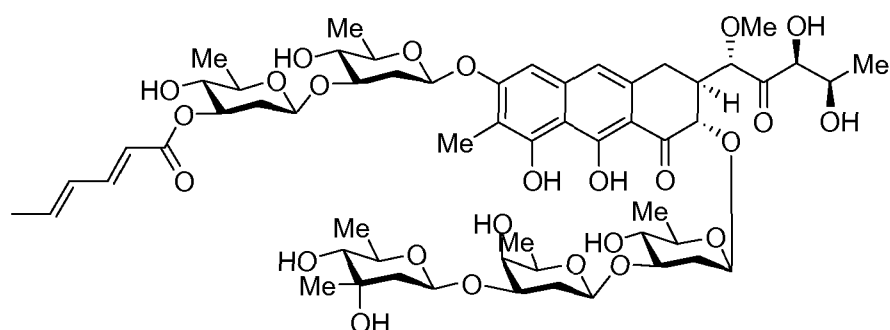
32. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LVI:



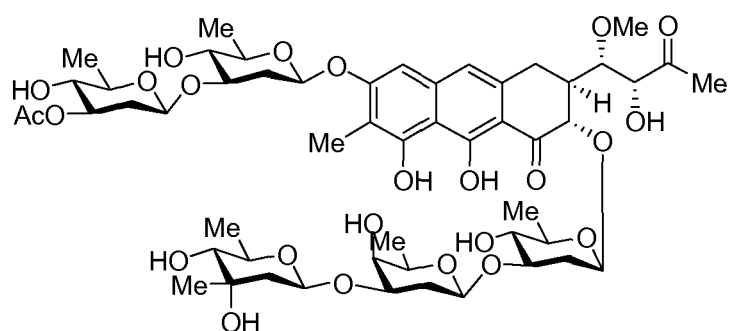
33. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LVII:



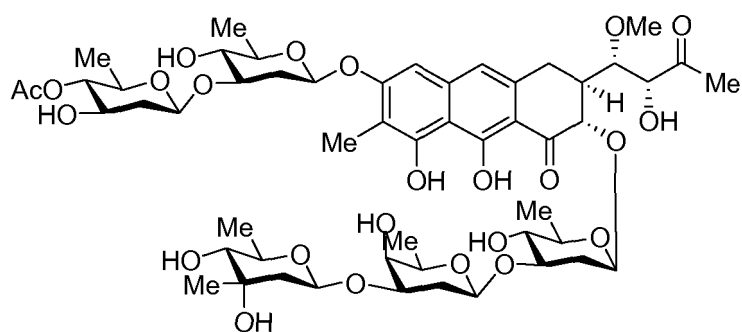
34. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LVIII:



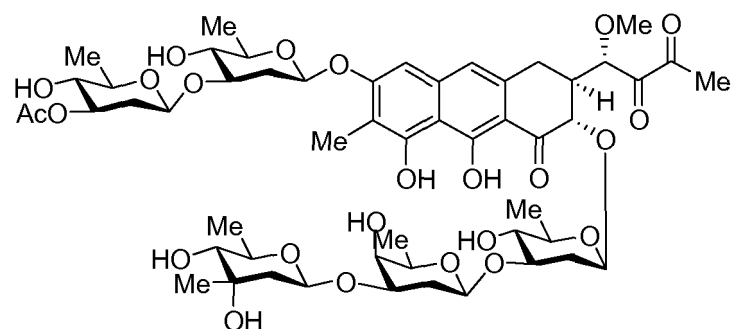
35. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LXI:



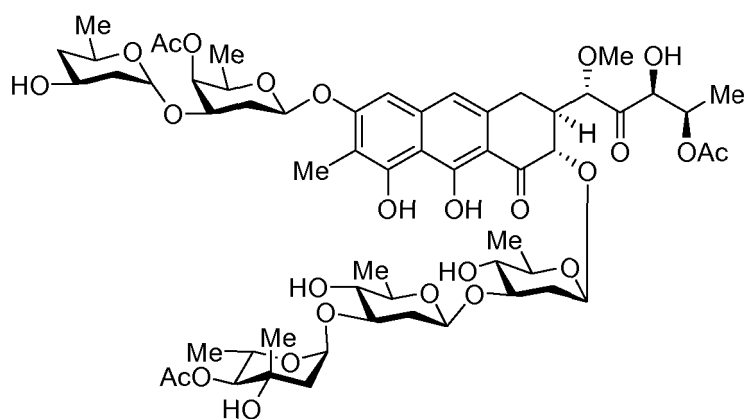
36. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LXIX:



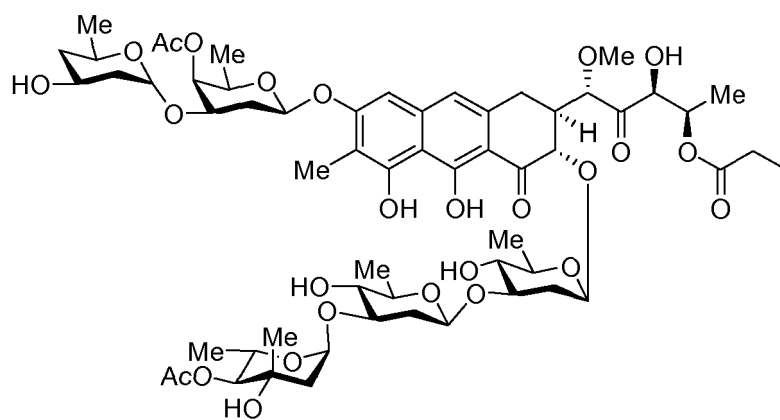
37. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula LXXX:



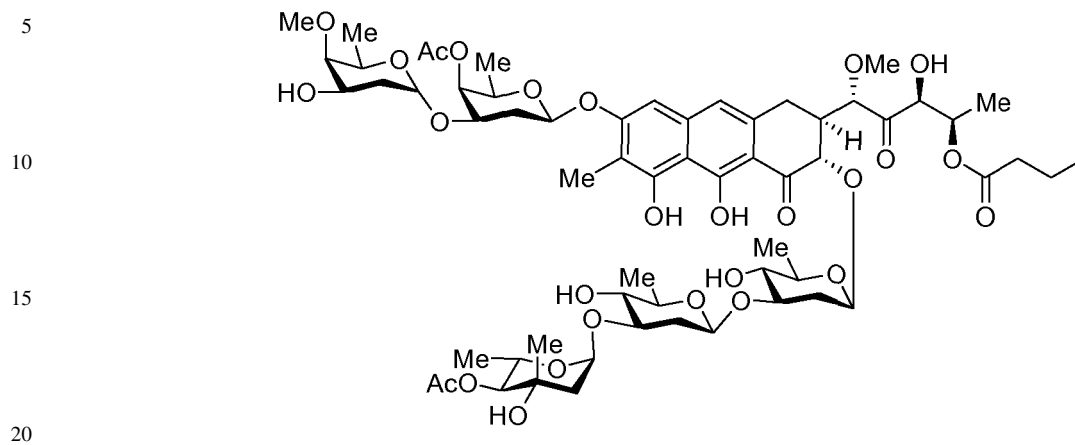
38. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XCII:



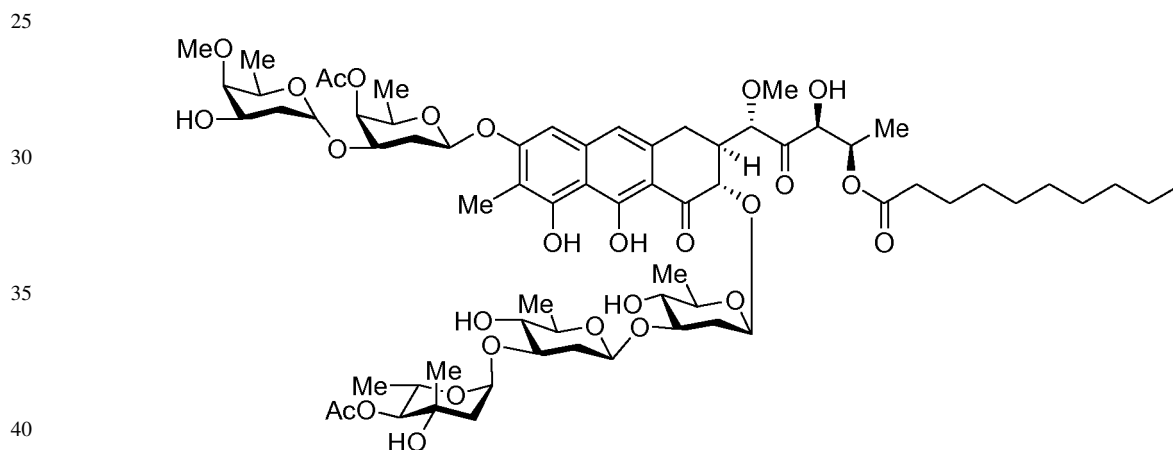
39. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XCIII:



40. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XCIV:



41. Compuesto, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fórmula XCV:



42. Uso de al menos uno los compuestos de las reivindicaciones 1 a 41 para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del cáncer, de la enfermedad de Paget o de enfermedades neurológicas.

43. Composición farmacéutica **caracterizada** por comprender al menos uno de los compuestos de las reivindicaciones 1 a 41 y sales farmacéuticamente aceptables.

44. Cepa bacteriana *Streptomyces argillaceus* ΔAH-W⁻ (pMP3*BII), **caracterizada** por tener inactivados los genes *mtmA*, *mtmH* y *mtmW*, así como por poseer un ácido nucleico adicional que codifica enzimas activos para la biosíntesis de azúcares que no están presentes en *Streptomyces argillaceus* ATCC12956.

45. Cepa bacteriana, según la reivindicación 44, **caracterizada** por poseer un ácido nucleico adicional contenido en el plásmido pMP3*BII, el cual codifica enzimas activos para la biosíntesis del azúcar D-digitoxosa y sus intermediarios biosintéticos.

46. Procedimiento para obtener la cepa bacteriana de las reivindicaciones 44 ó 45, que comprende la introducción del plásmido pMP3*BII en *Streptomyces argillaceus* ΔAH-W⁻, que codifica enzimas activos para la biosíntesis de azúcares que no están presentes en *Streptomyces argillaceus* ATCC12956.

47. Procedimiento para la obtención de derivados de ácidos aureólicos de acuerdo con la fórmula (I) que comprende:

- 65
- Incubación de una cepa bacteriana de las reivindicaciones 44 ó 45 en un medio de cultivo apropiado; y
 - Aislamiento de derivados de ácidos aureólicos de fórmula (I) del caldo de cultivo.

ES 2 355 032 A1

48. Procedimiento para la obtención de derivados acilados de ácidos aureólicos, que comprende

a. Incubación de la cepa bacteriana *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* C10GIV en presencia de un ácido aureólico de fórmula (I); y

b. Aislamiento de derivados de ácidos aureólicos de fórmula (I) del caldo de cultivo.

49. Procedimiento para la obtención de derivados acilados de ácidos aureólicos, que comprende reaccionar un ácido aureólico de fórmula (I) con un agente acilante en presencia de una hidrolasa.

50. Procedimiento, según la reivindicación 49, donde la enzima es una lipasa.

51. Procedimiento, según la reivindicación 50, donde la enzima es la fracción A o B de la lipasa *Candida antarctica*.

52. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51, donde la enzima está inmovilizada sobre un soporte.

53. Procedimiento, según la reivindicación 52, donde el soporte sobre el que se inmoviliza la lipasa es una resina epoxiacrílica activada con grupos deca-octilo.

54. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 49 a 53, donde el agente acilante es un éster, anhídrido o carbonato.

55. Procedimiento, según la reivindicación 54, donde el agente acilante se selecciona del grupo que consiste en acetato de vinilo, acetato de trifluoroetilo, cloroacetato de vinilo, propanoato de vinilo, butanoato de vinilo, levulinato de acetoxima, decanoato de vinilo, dodecanoato de vinilo, benzoato de vinilo, crotonato de vinilo, carbonato de dialilo, carbonato mixto de alilo y oxima, carbonato de vinileno, anhídrido succínico, adipato de vinilo y sorbato de vinilo.

56. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 49 a 55, donde la reacción se realiza empleando como disolvente el propio agente acilante.

57. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 49 a 56, donde la reacción se realiza empleando como disolvente tetrahidrofurano si el agente acilante es sólido o si la solubilidad del ácido aureólico en el agente acilante es baja.

FIG. 1

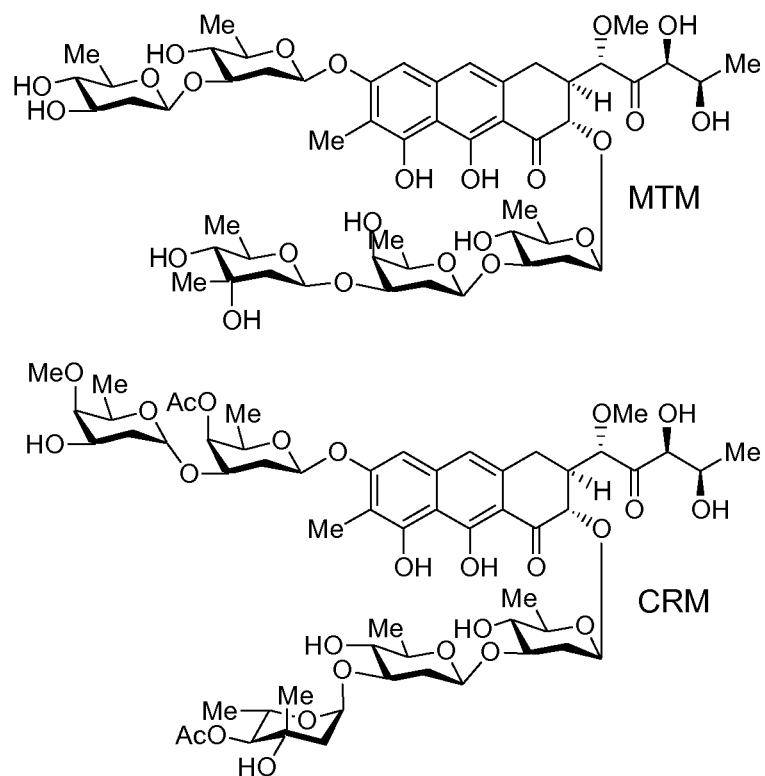


FIG. 2

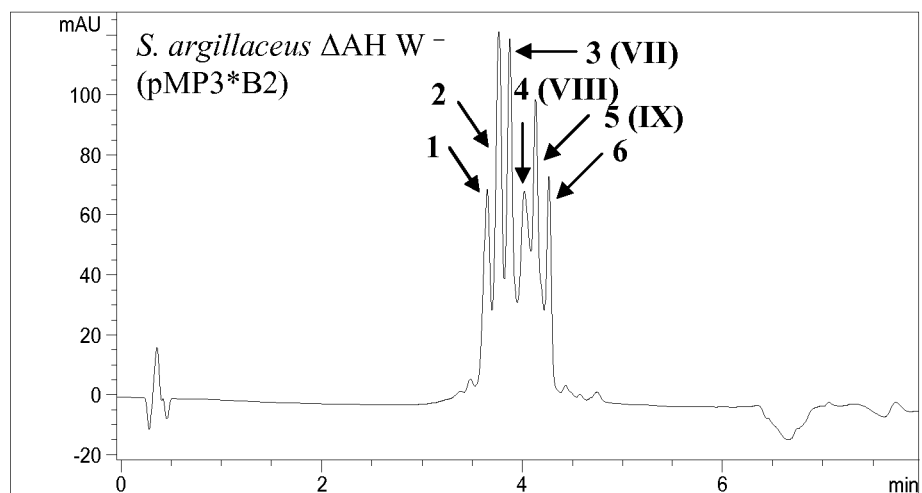


FIG.3

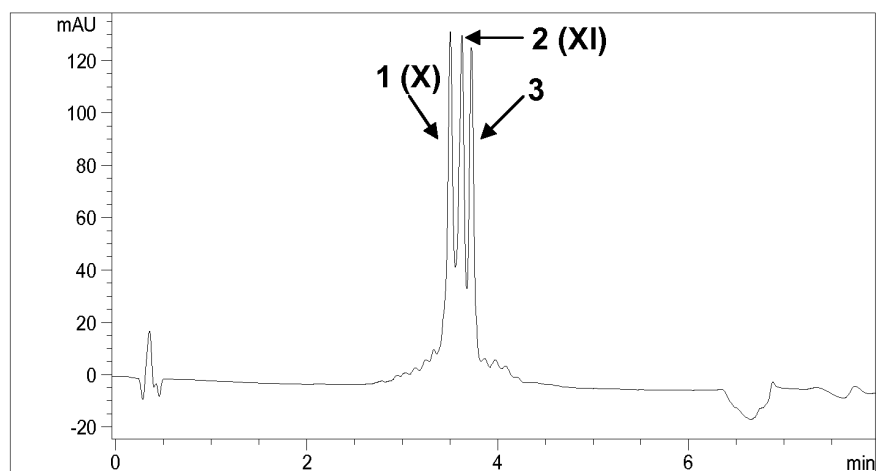


FIG.4

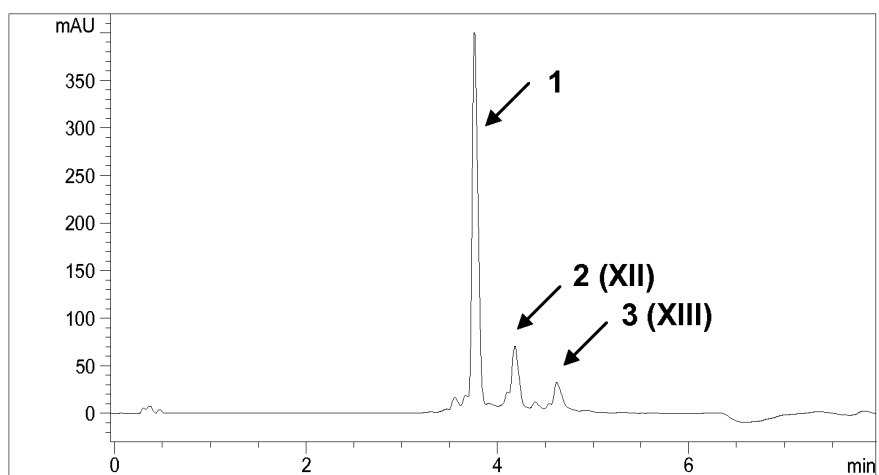


FIG. 5

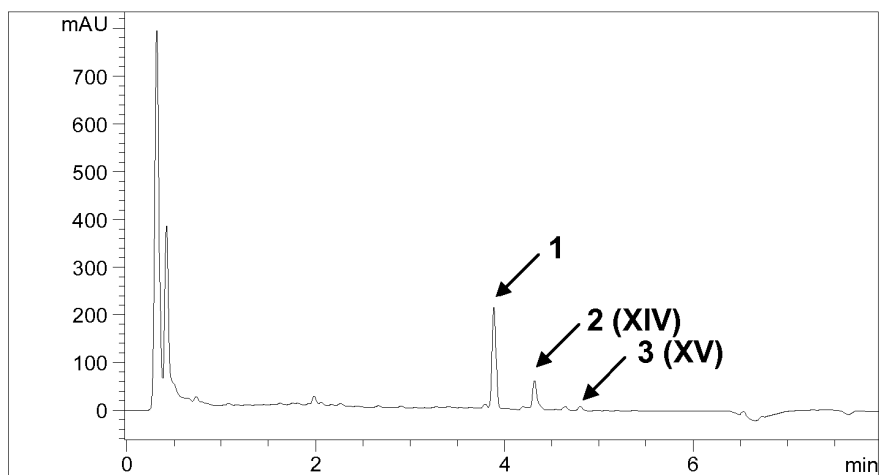


FIG.6

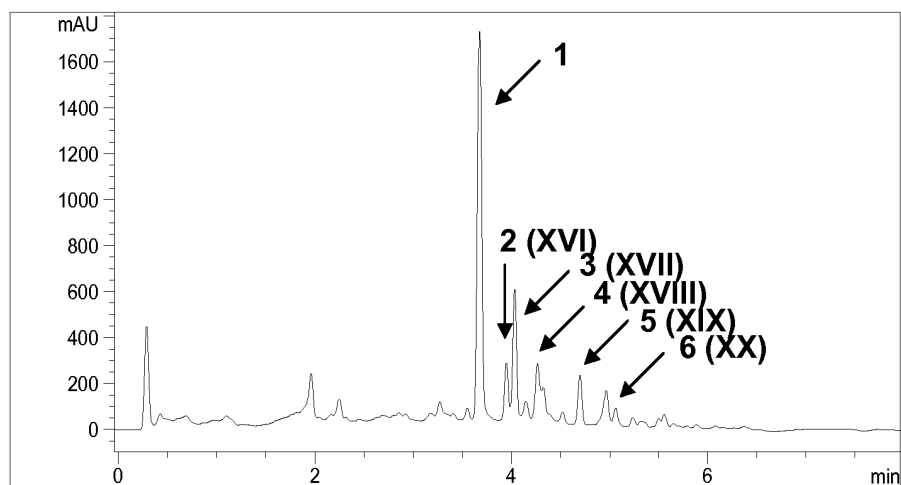


FIG. 7

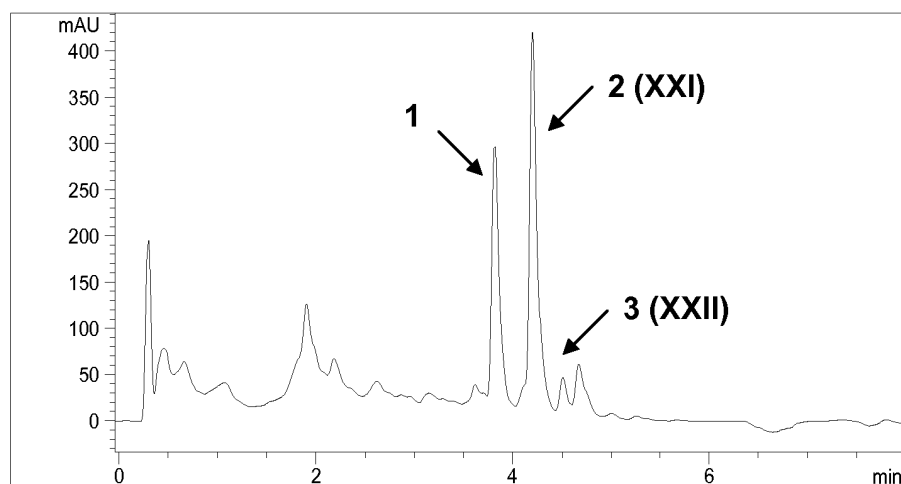


FIG.8

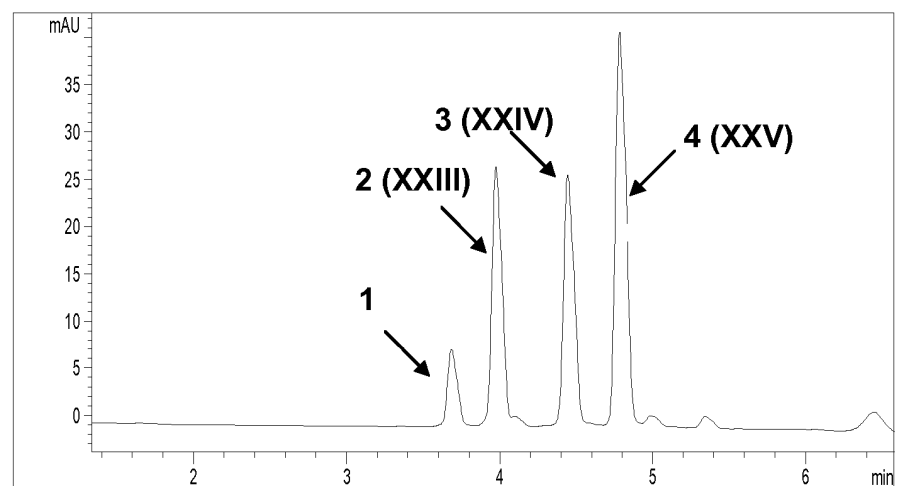


FIG. 9

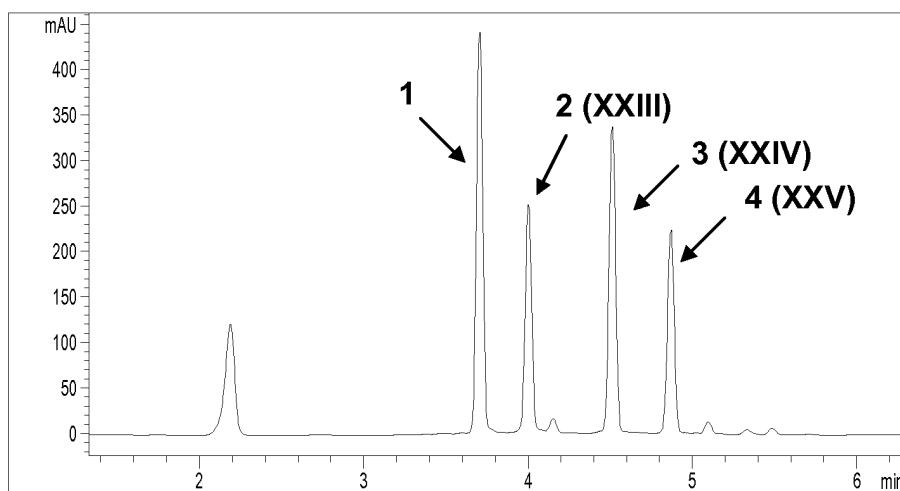


FIG. 10

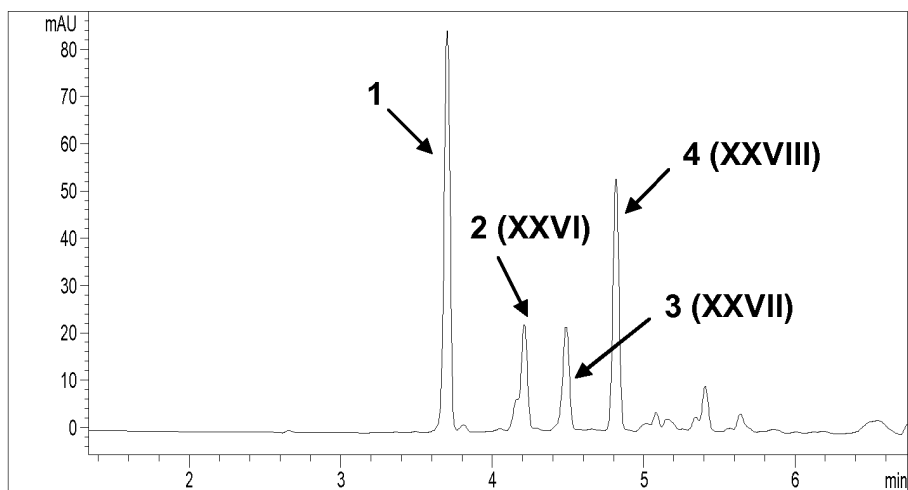


FIG. 11

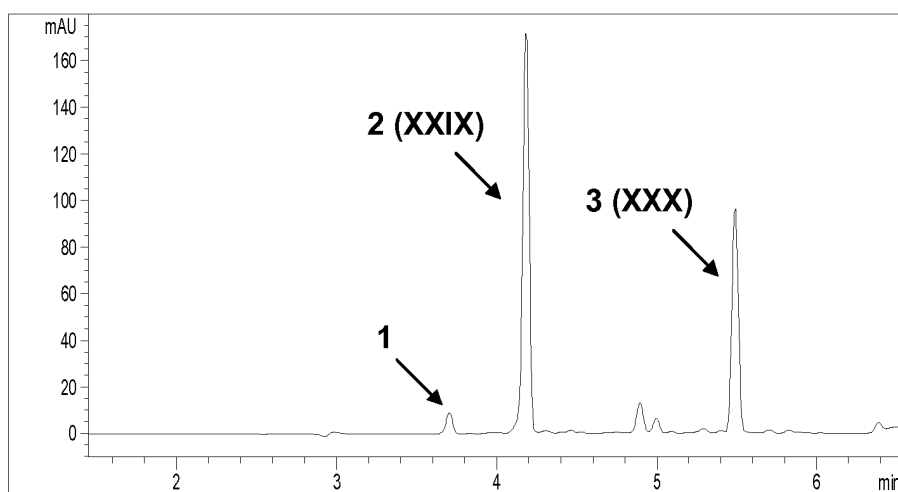


FIG. 12

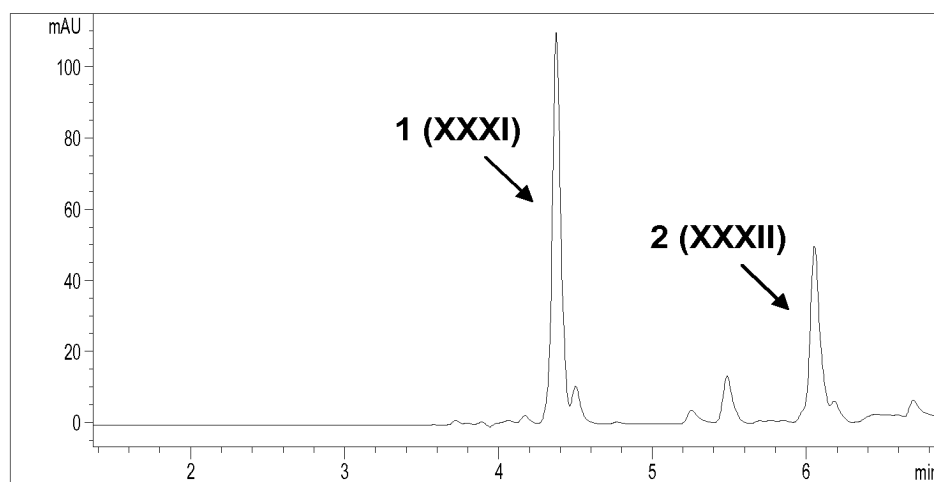


FIG. 13

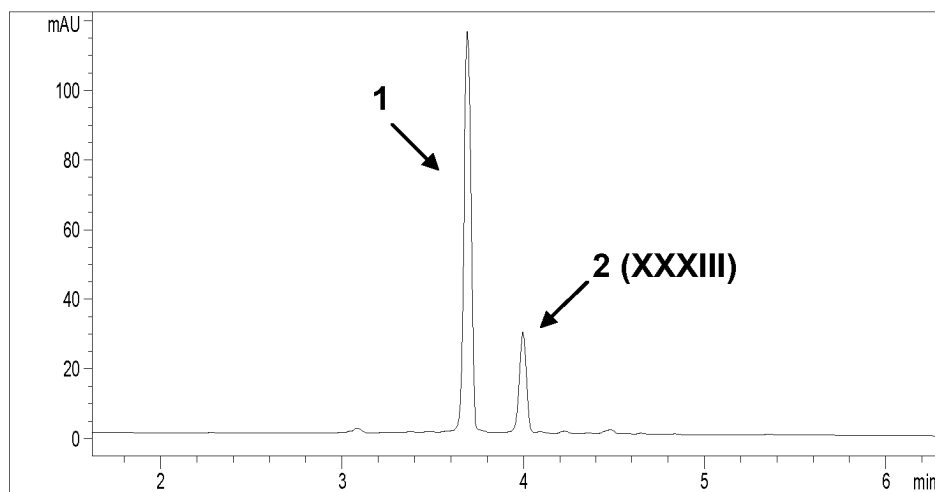


FIG. 14

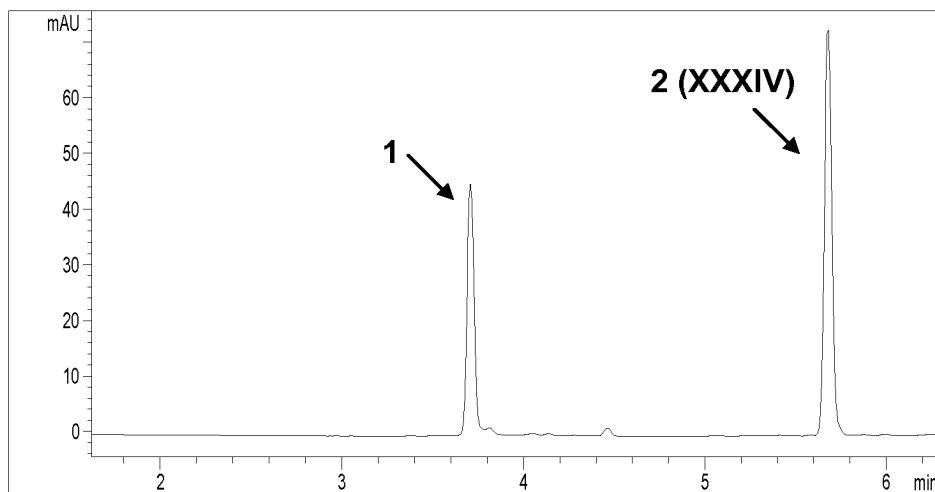


FIG. 15

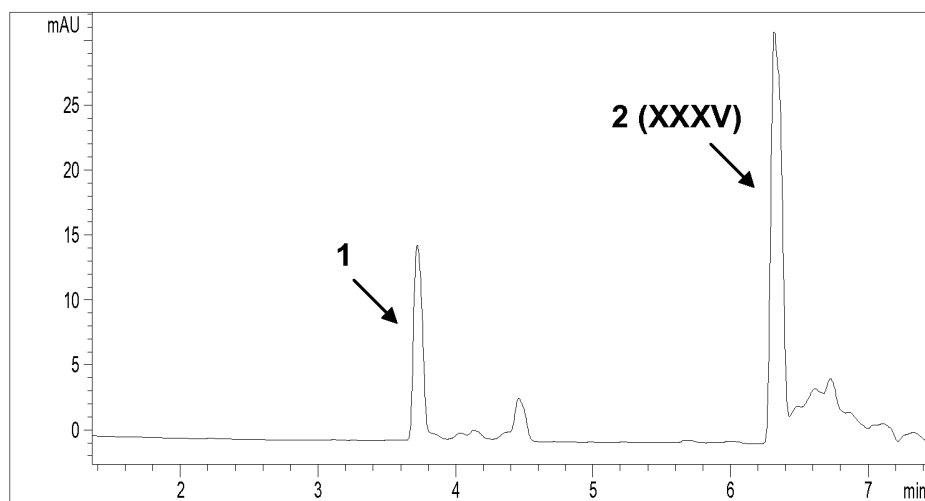


FIG. 16

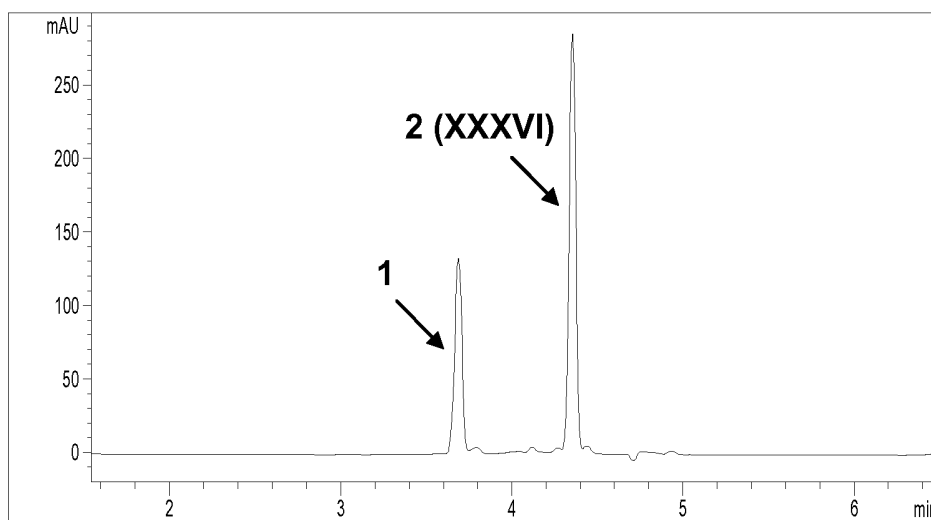


FIG. 17

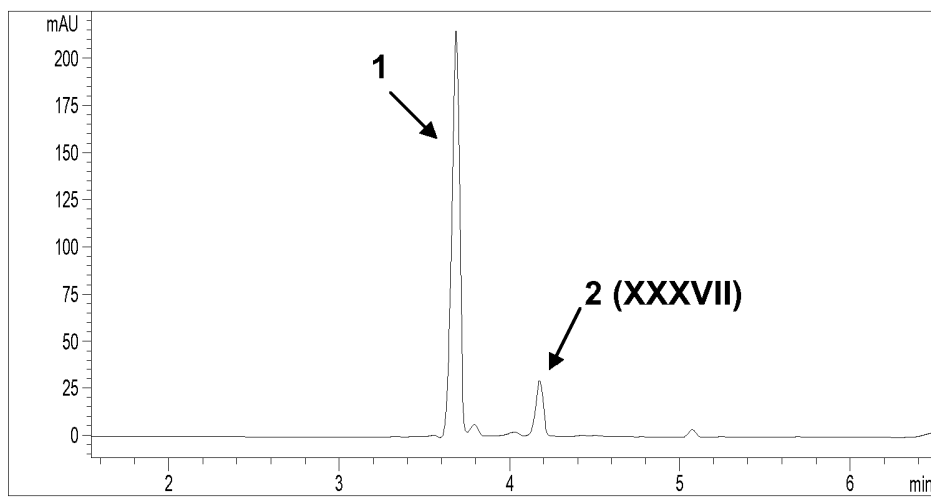


FIG. 18

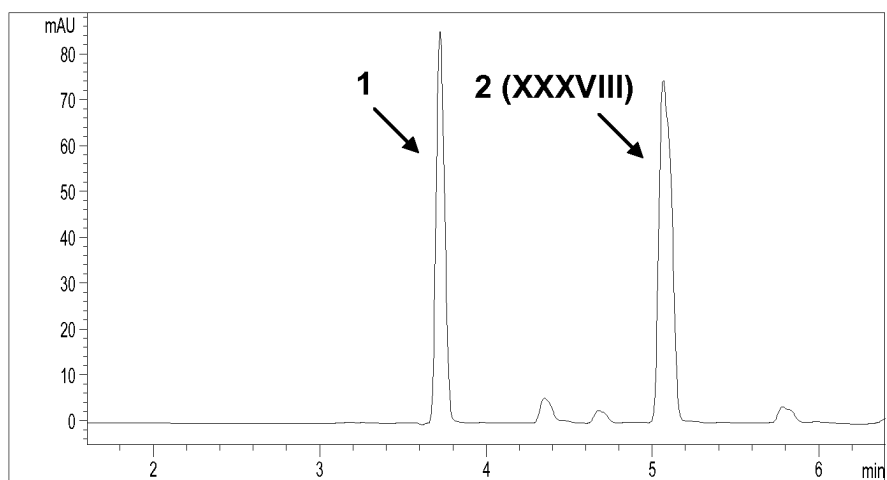


FIG. 19

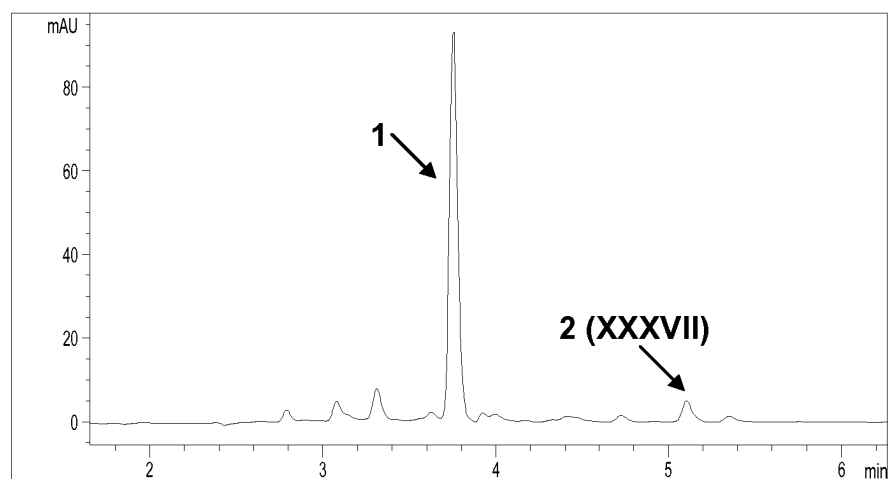


FIG. 20

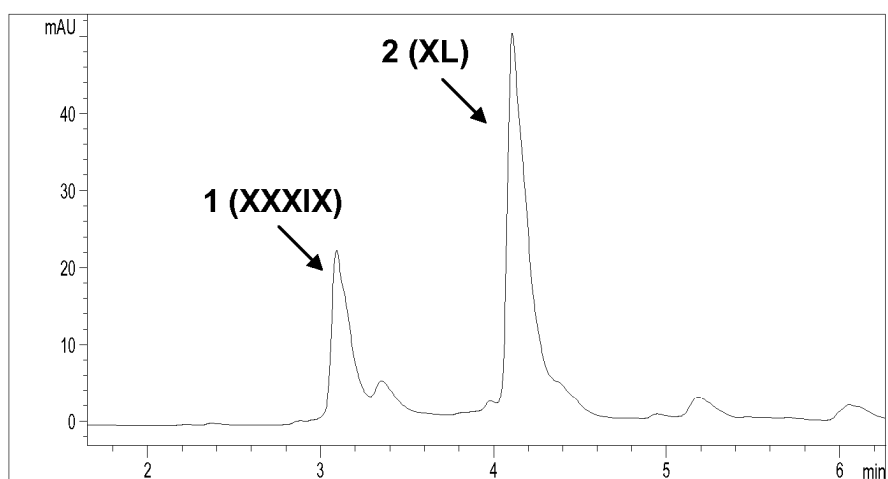


FIG. 21

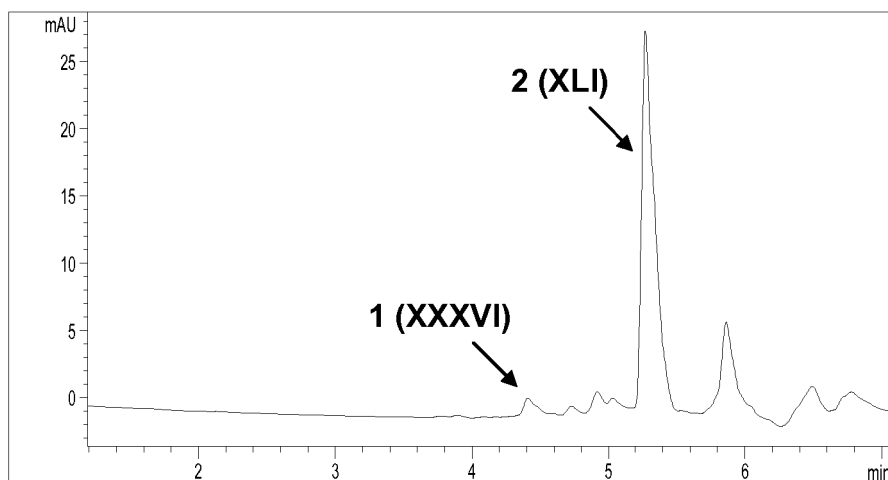


FIG. 22

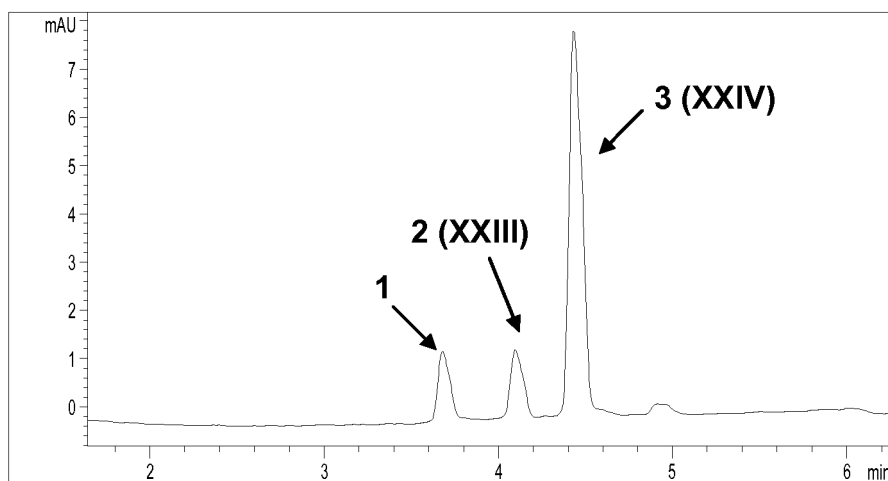


FIG. 23

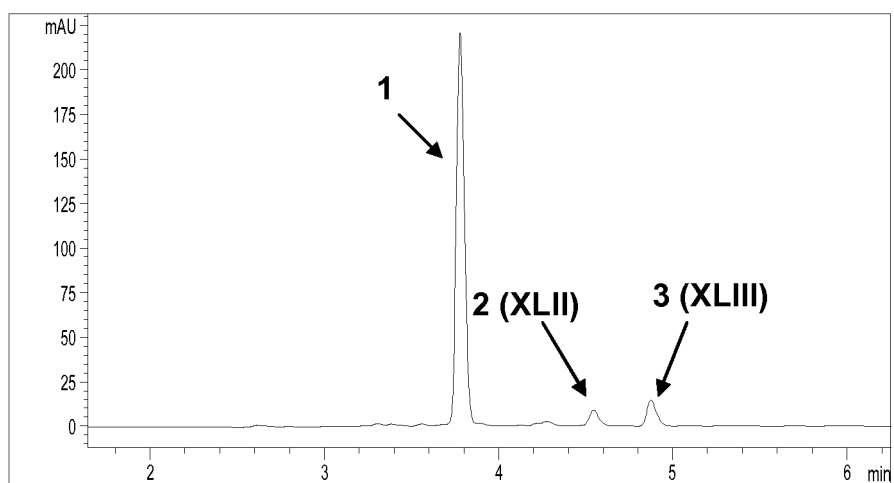


FIG. 24

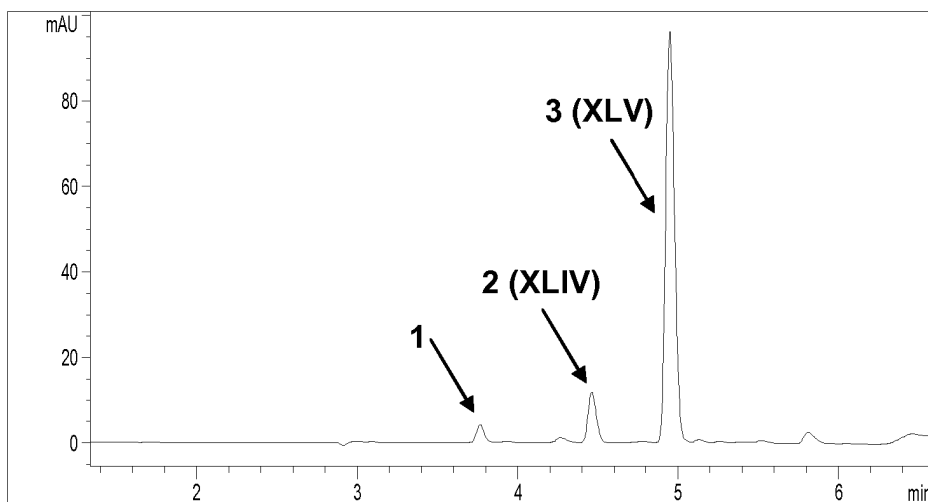


FIG. 25

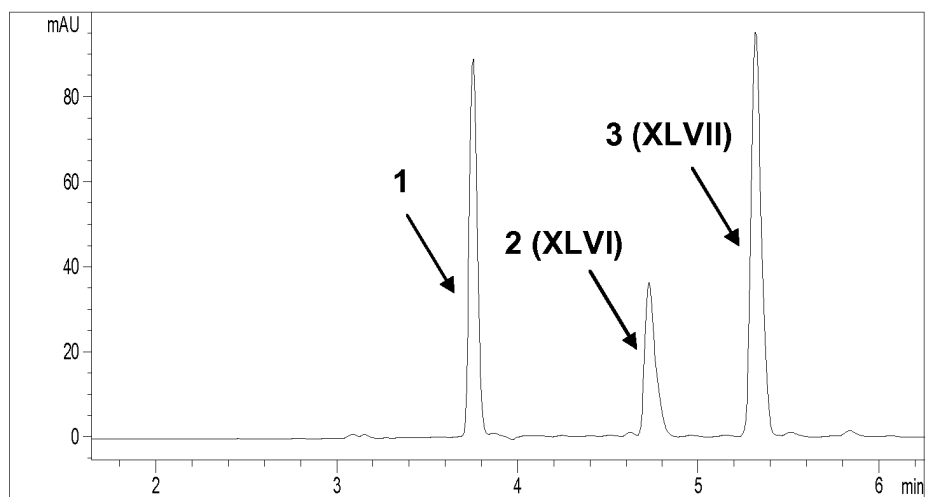


FIG. 26

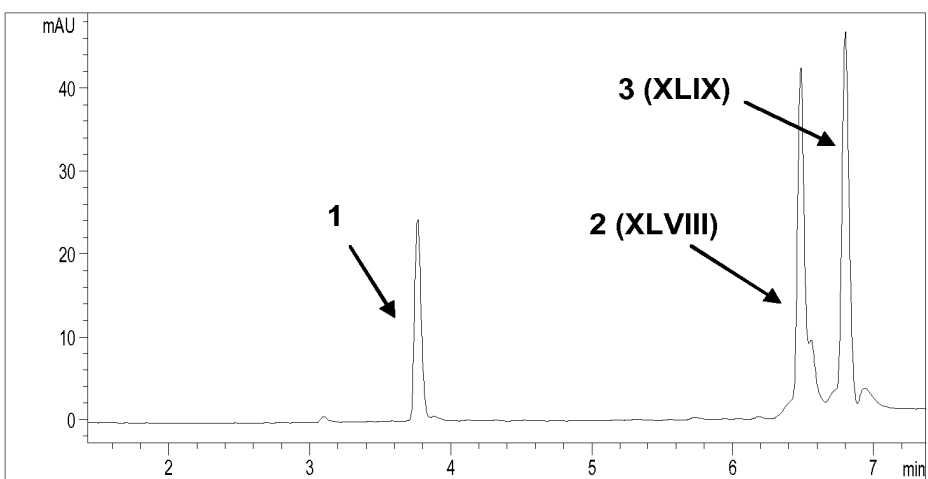


FIG. 27

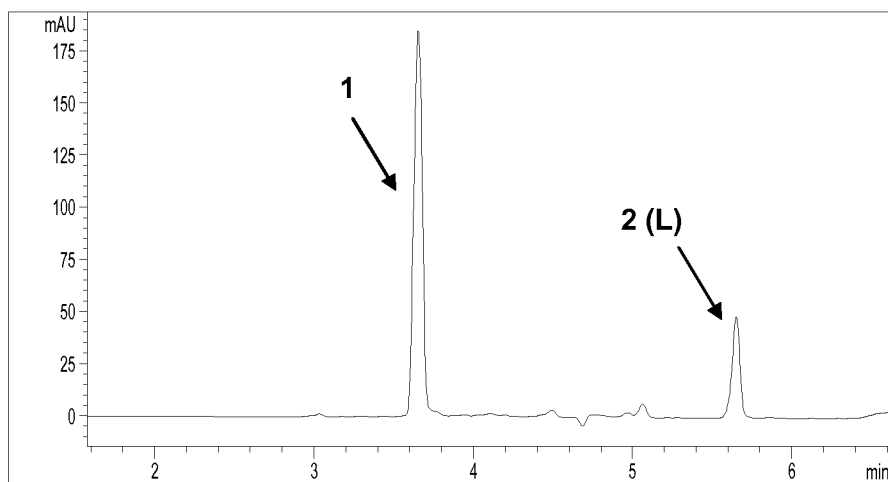


FIG. 28

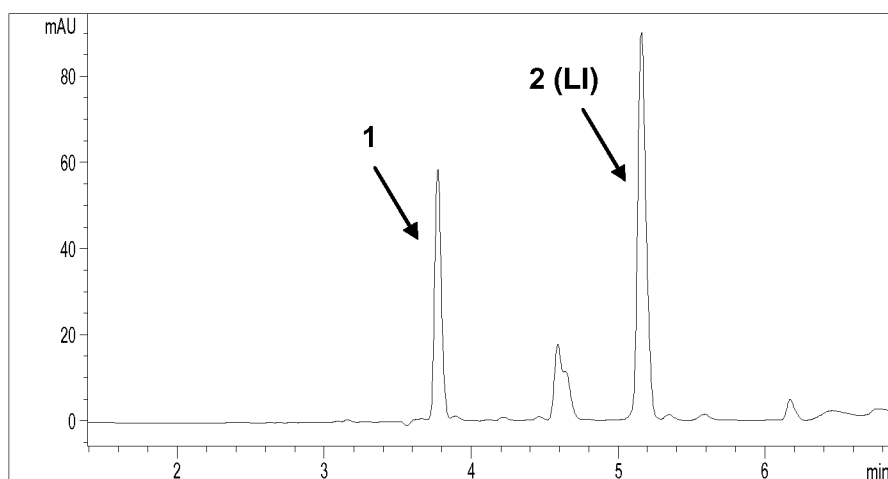


FIG. 29

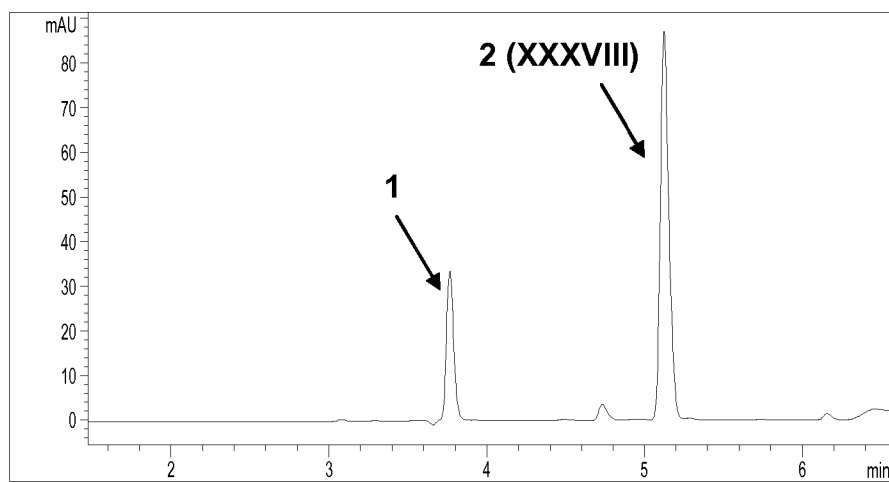


FIG. 30

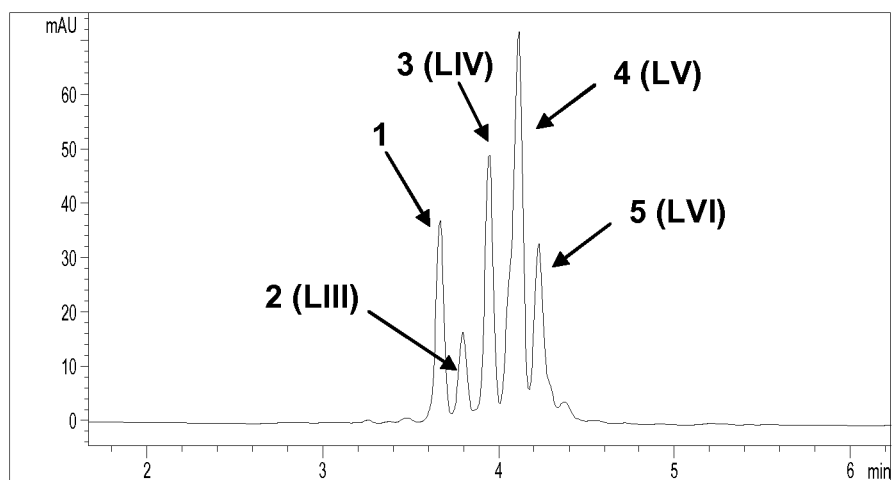


FIG. 31

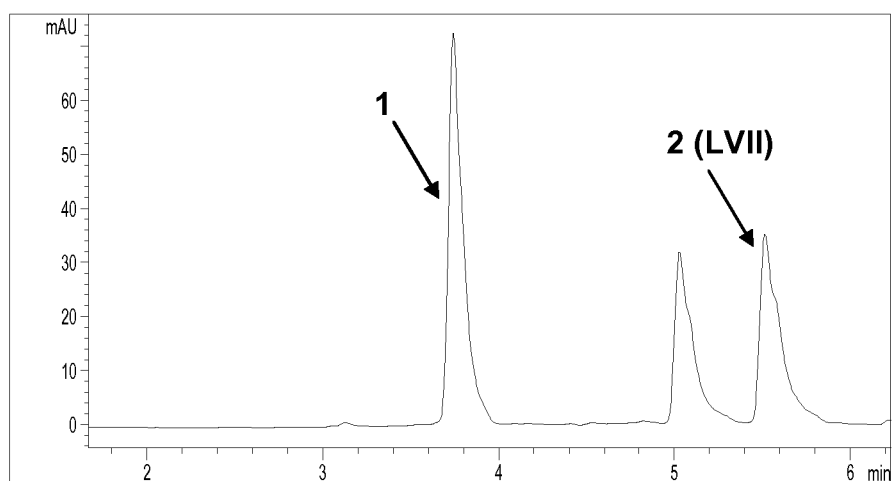


FIG. 32

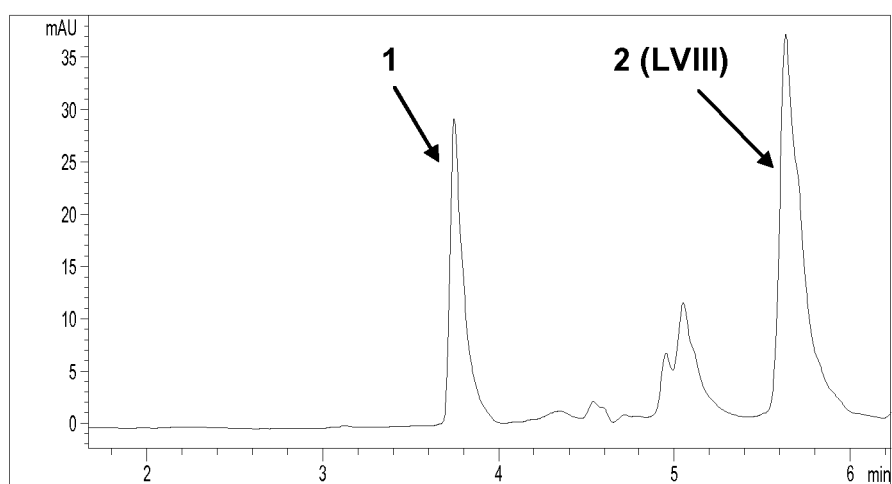


FIG. 33

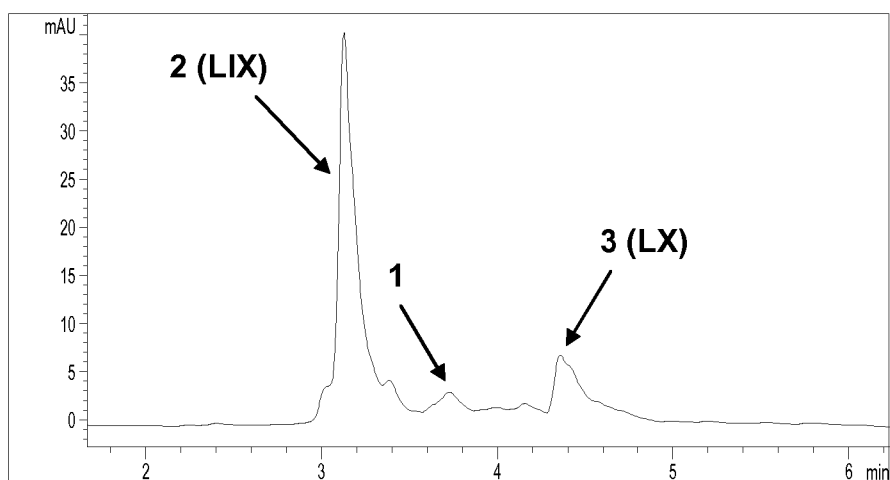


FIG. 34

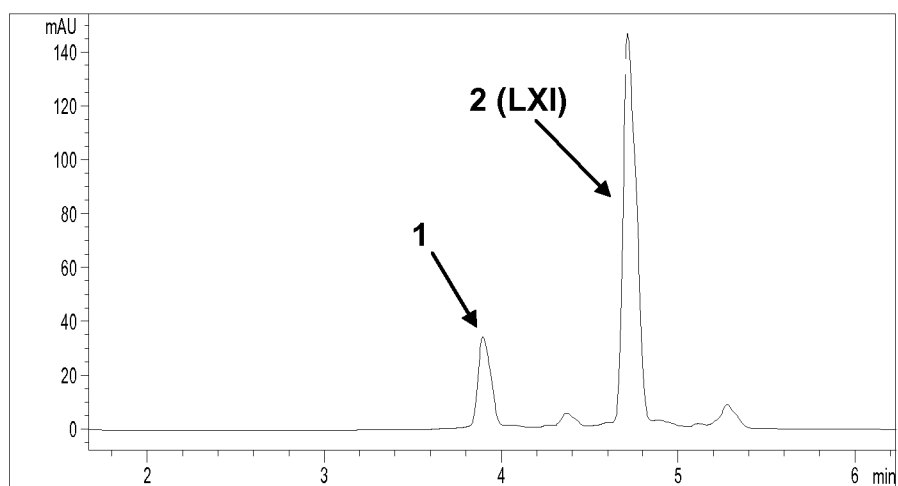


FIG. 35

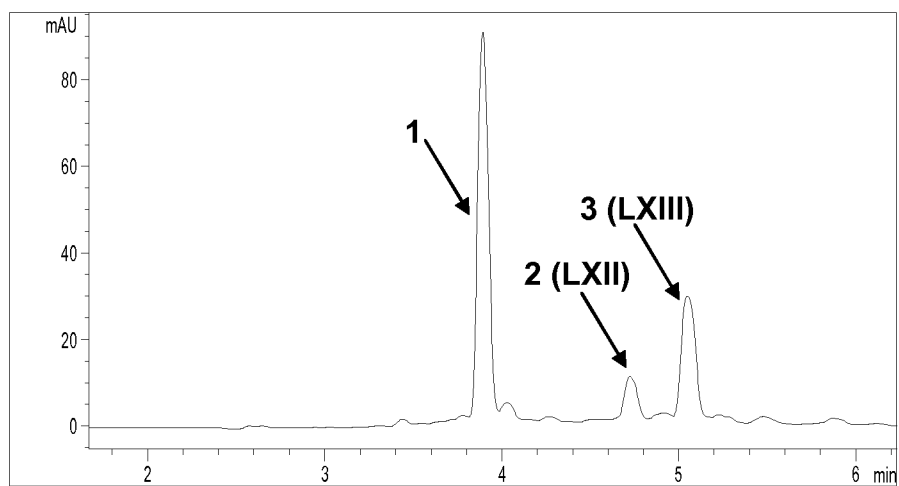


FIG. 36

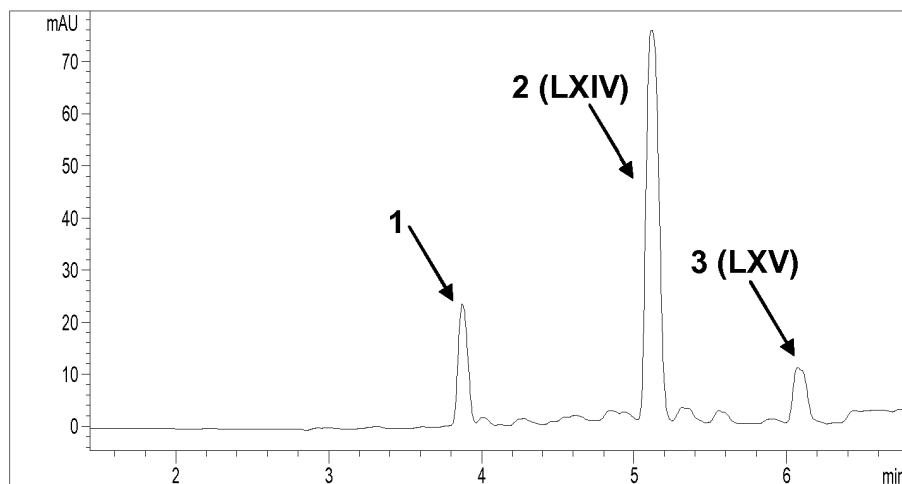


FIG. 37

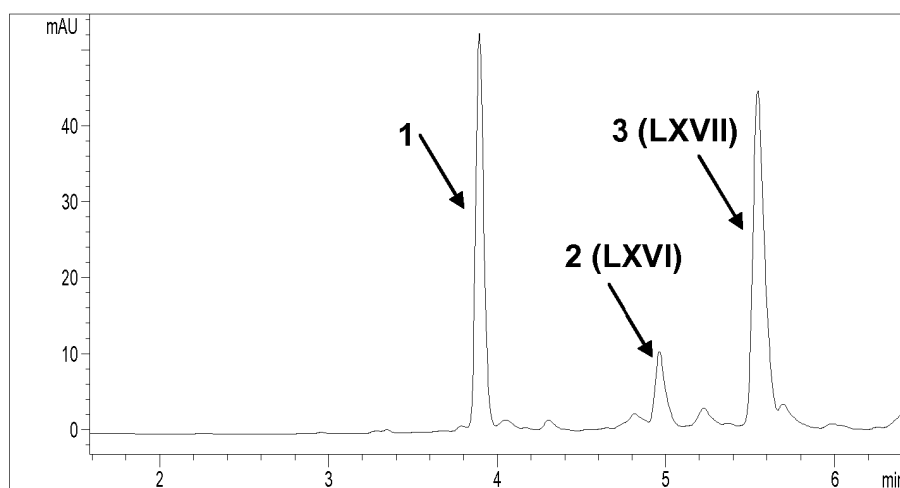


FIG. 38

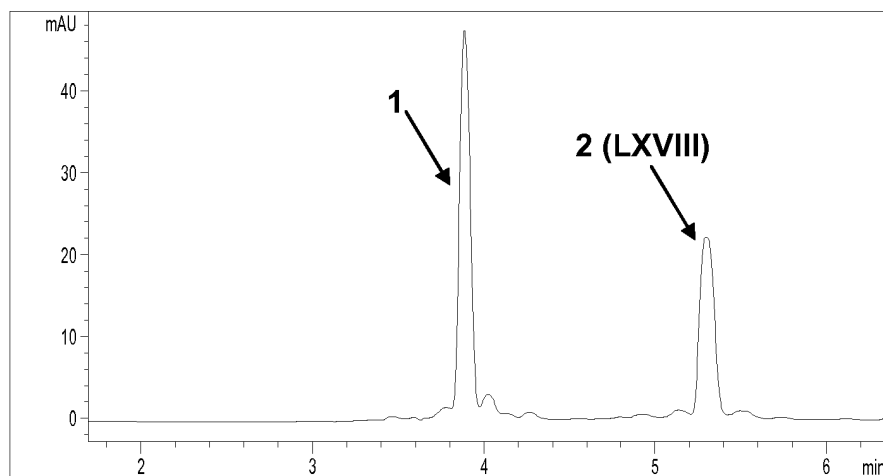


FIG. 39

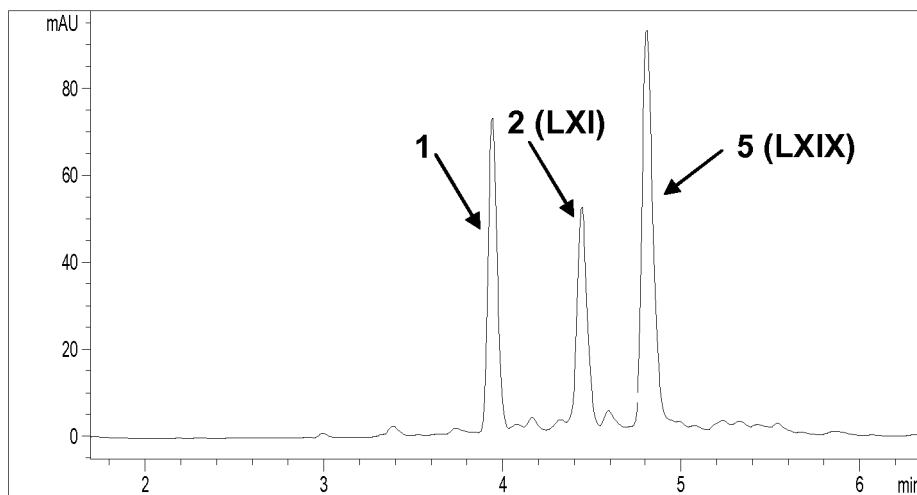


FIG. 40

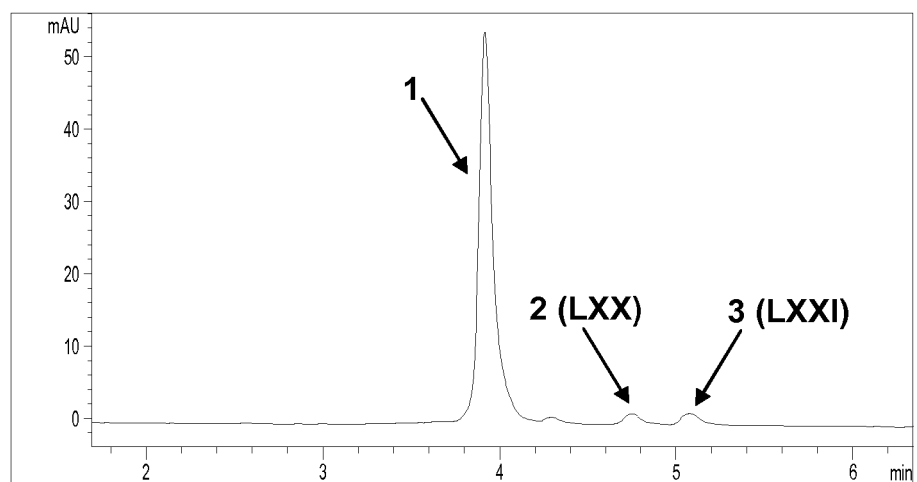


FIG. 41

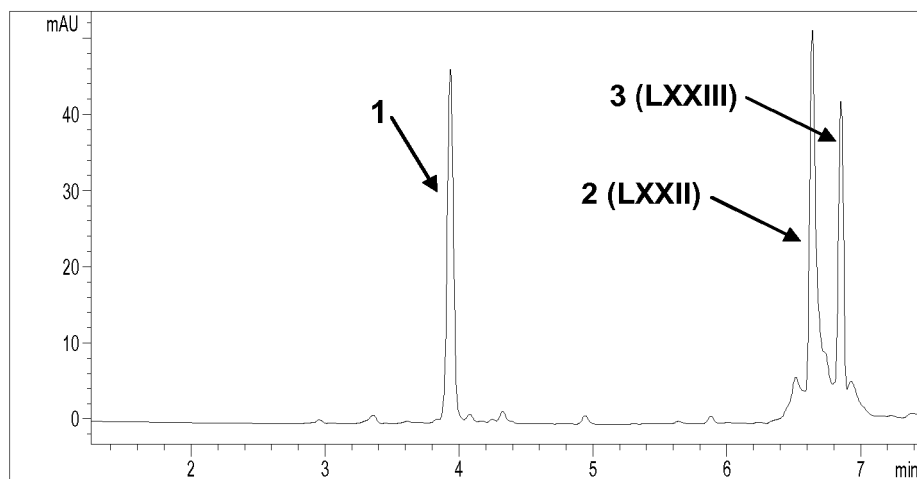


FIG. 42

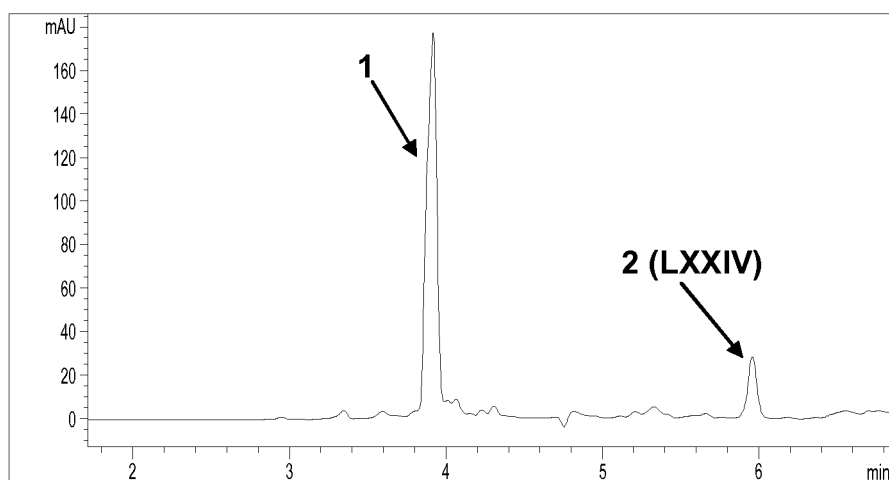


FIG. 43

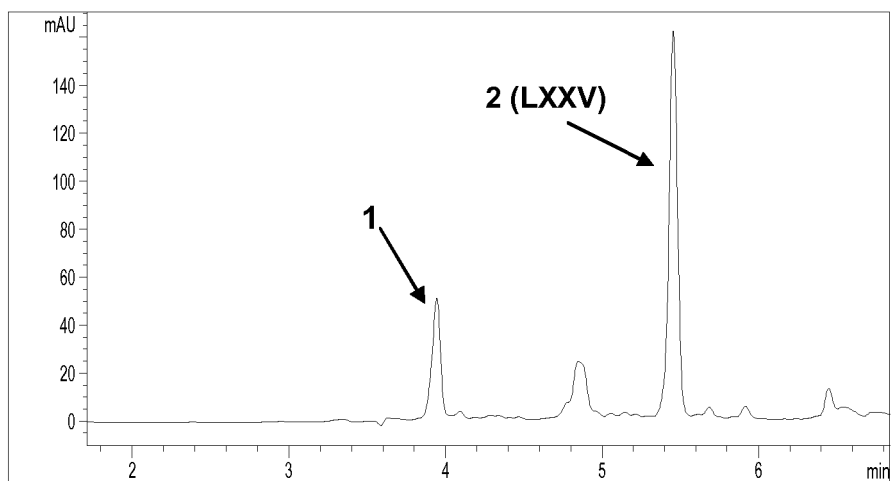


FIG. 44

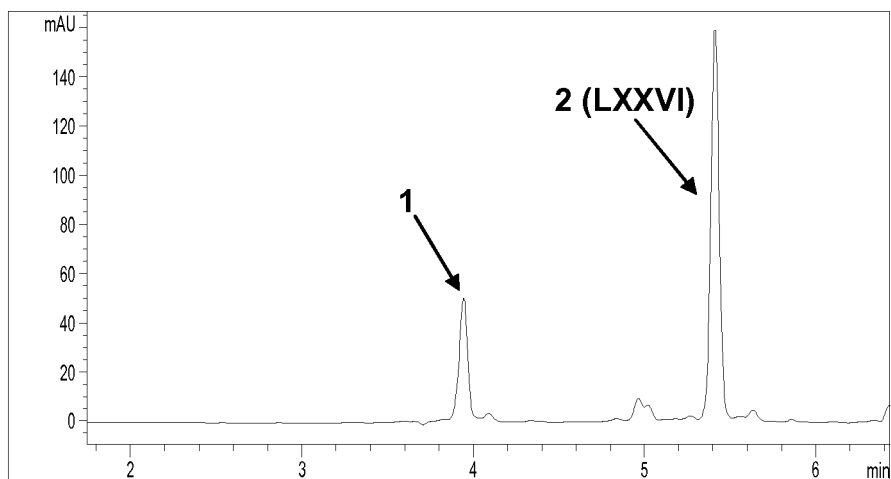


FIG. 45

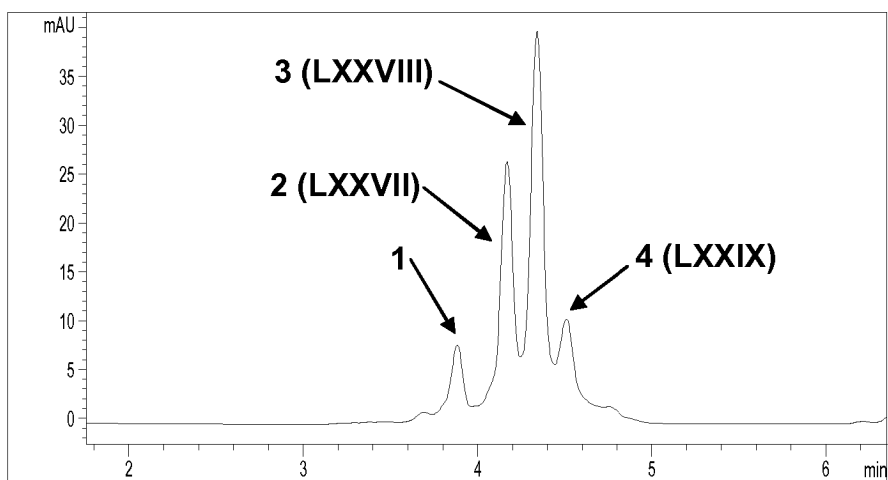


FIG. 46

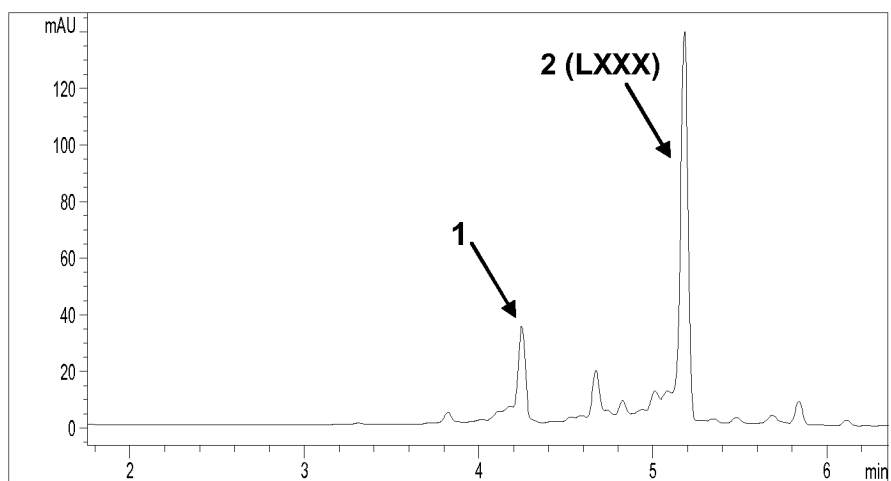


FIG. 47

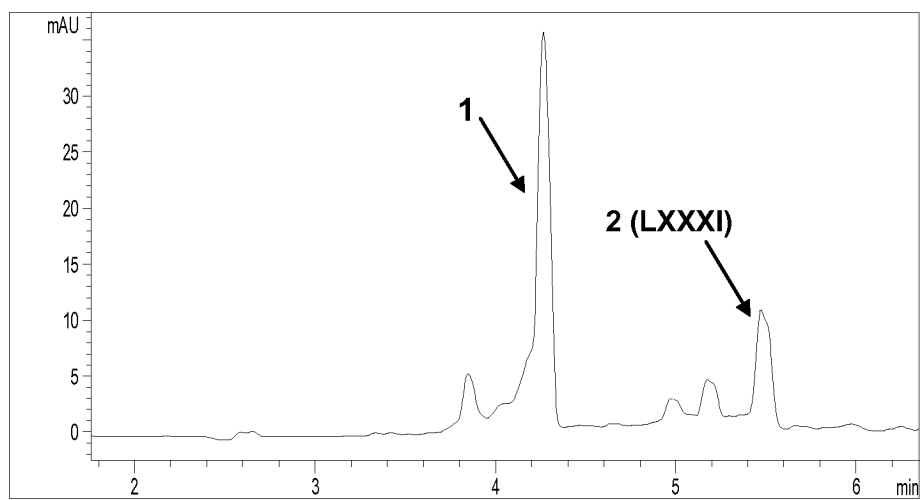


FIG. 48

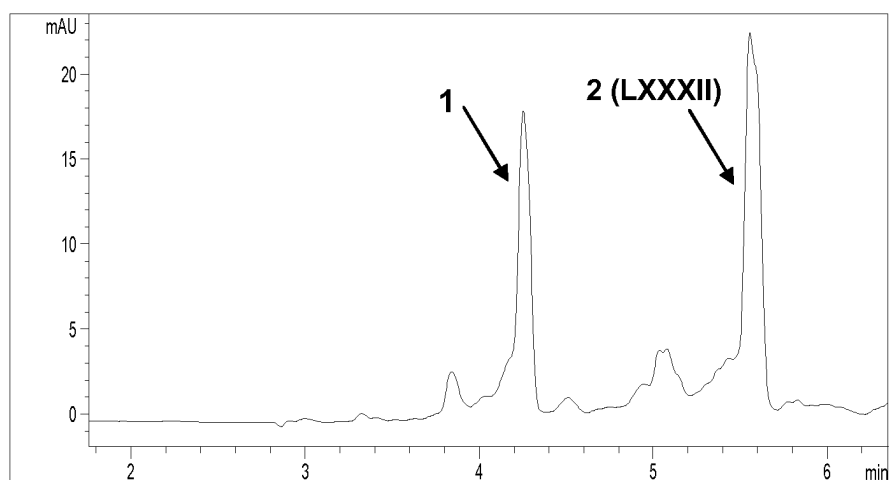


FIG. 49

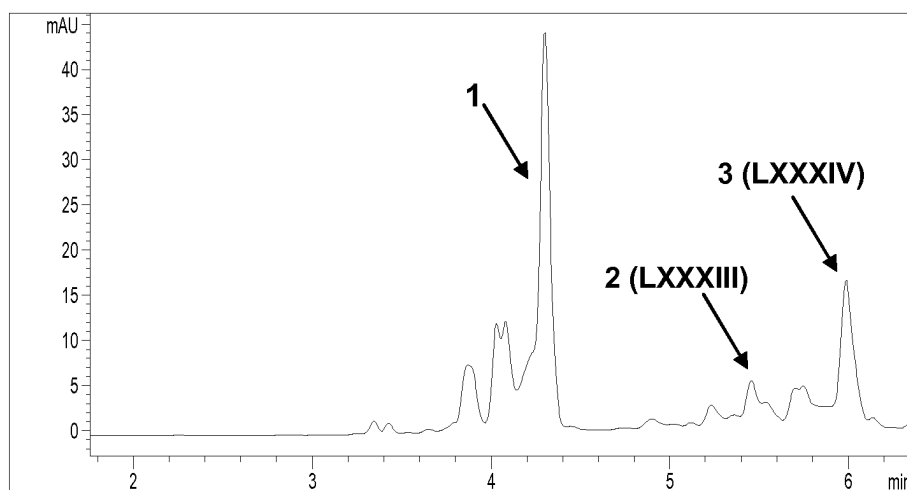


FIG. 50

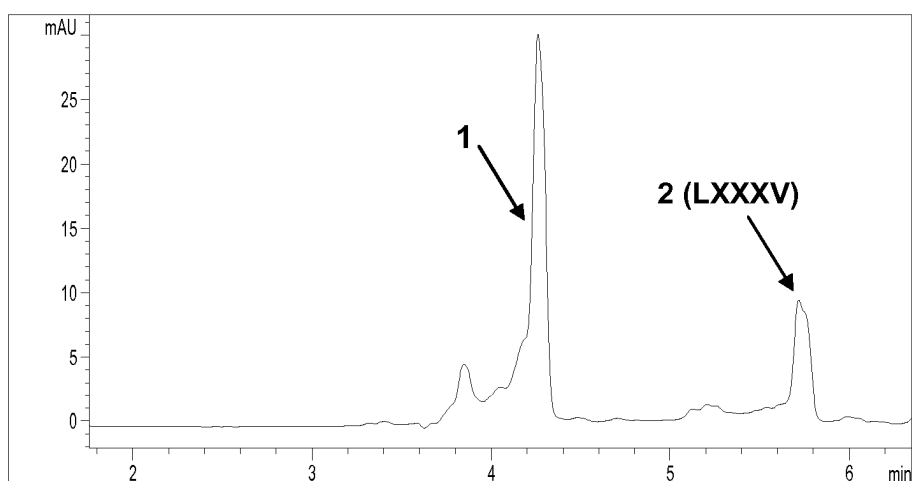


FIG. 51

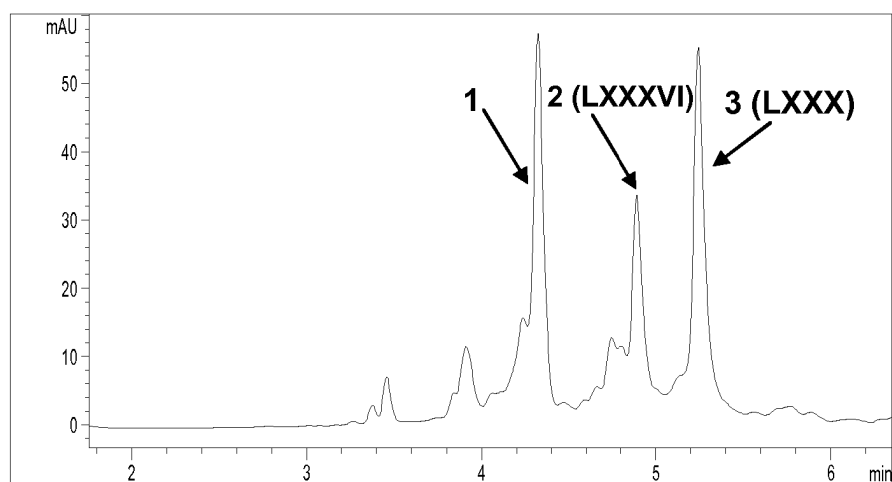


FIG. 52

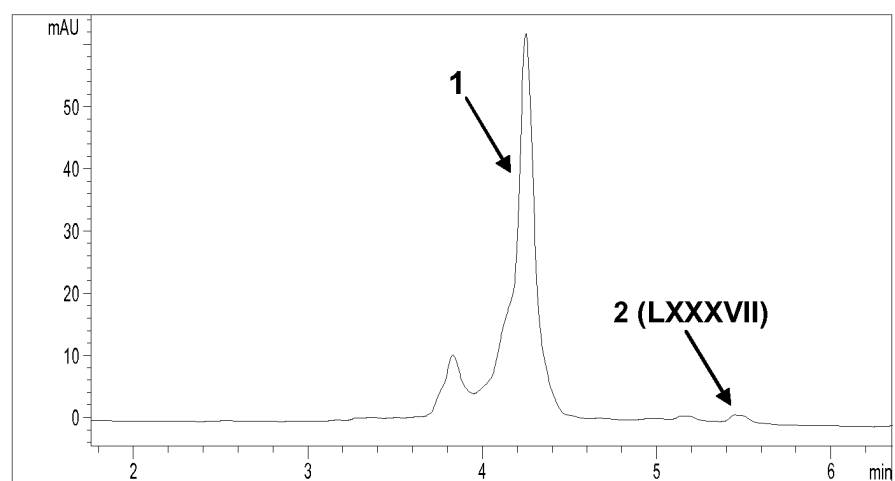


FIG. 53

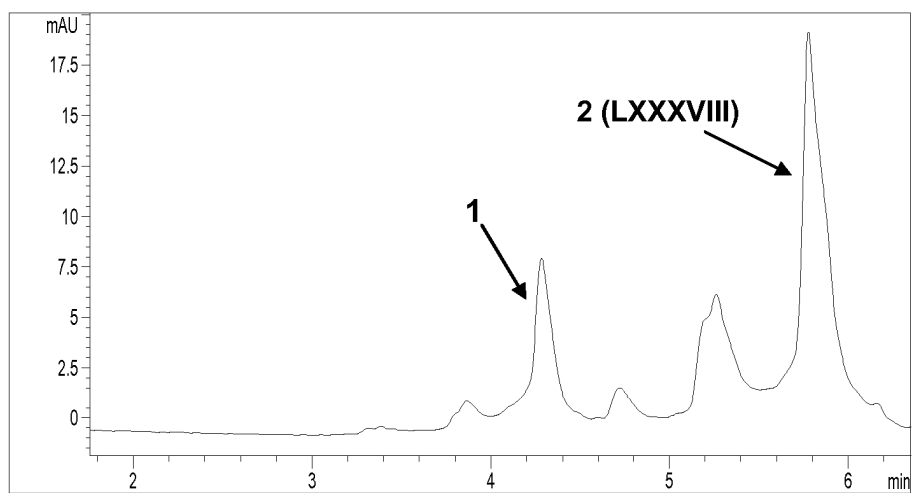


FIG. 54

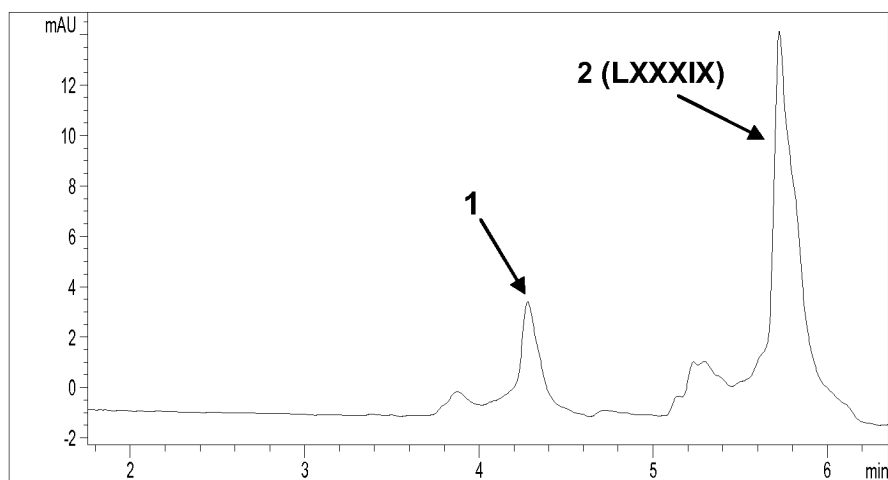


FIG. 55

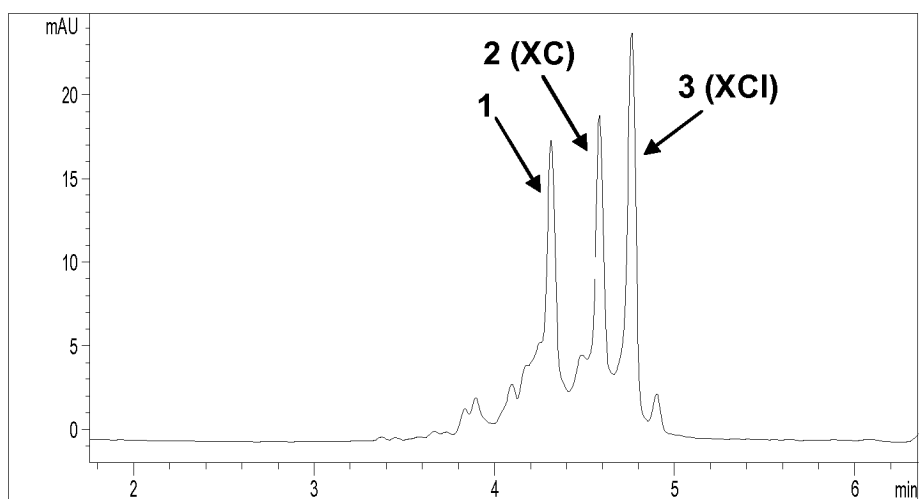


FIG. 56

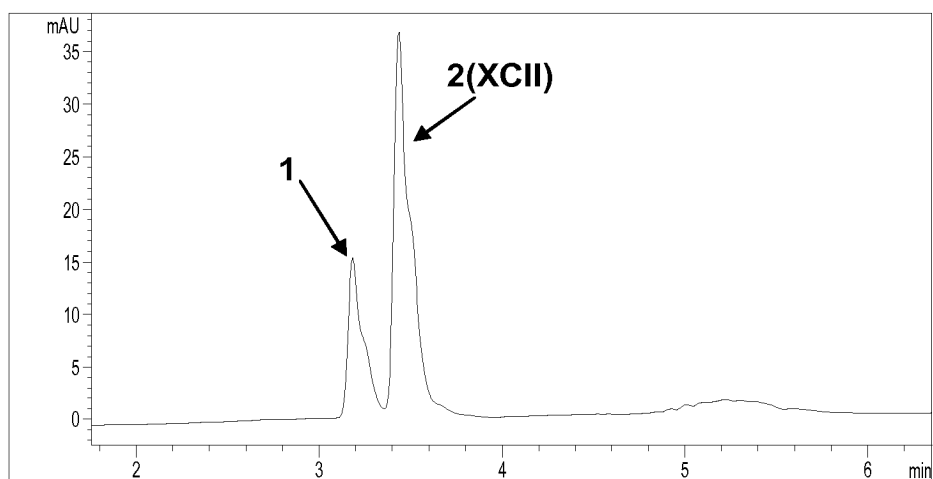


FIG. 57

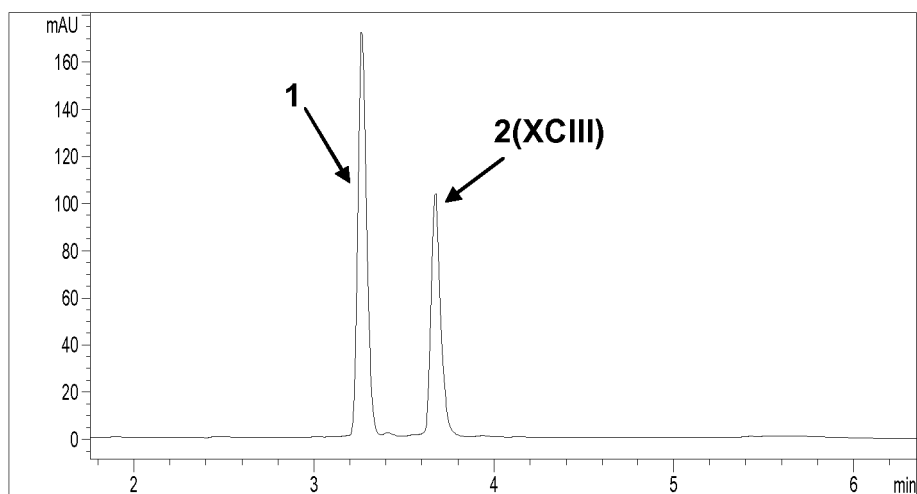


FIG. 58

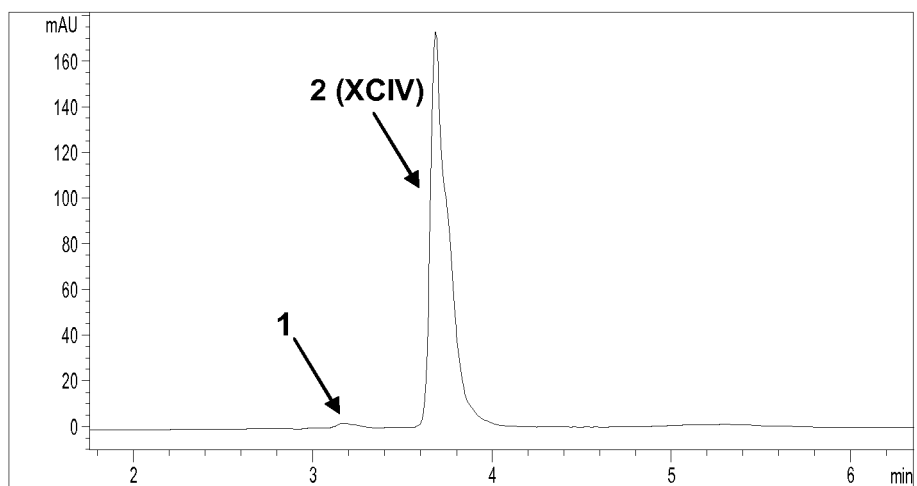
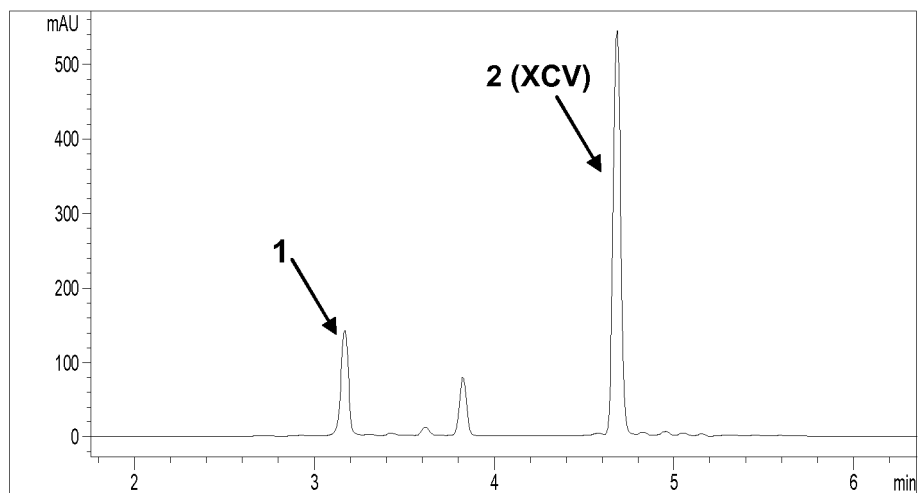


FIG. 59





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930497

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PÉREZ, M. et al. "Generation of New Derivatives of the Antitumor Antibiotic Mithramycin by Altering the Glycosylation Pattern through Combinatorial Biosynthesis". Chembiochem 2008, Volumen 9, Número 22, páginas 2295-2304. [NIPH-PA Author Manuscript]. [Disponible en línea el 28.10.2008]. Ver página 3, párrafo 3; página 1, resumen; página 11, esquema 1.	1-43,49-57
X	US 20050192432 A1 (ROHR, J. et al.) 01.09.2005, párrafos [0030]-[0041], fórmula general II; párrafos [0008]-[0009],[0078]-[0088].	1-43,49-57
X	WO 2008096028 A1 (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION & UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 14.08.2008, página 5, línea 1 – página 6, línea 20; fórmula general (I); página 3, líneas 8-14; página 11, líneas 16-18; página 12, líneas 26-28; página 13, líneas 6-19.	1-43,49-57
X	SAITO, T. et al. "Combination chemotherapy for solid tumors using 5-fluorouracil, chromomycin-A3, and prednisolone". Gann 1977, Volumen 68, Número 7, páginas 375-387. (resumen) CAPLUS [en línea] [recuperado el 05.11.2010]. Recuperado de: STN International. Columbus, Ohio (EE.UU.). N.º de acceso: 1977:561784.	1-43,49-57
X	MENÉNDEZ, N. et al. "Tailoring modification of deoxysugars during biosynthesis of the antitumour drug chromomycin A3 by <i>Streptomyces griseus</i> ssp. <i>griseus</i> ". Molecular Microbiology 2004, Volumen 53, Número 3, páginas 903-915. Ver página 904, figura 1A; página 907, figura 3; página 903, resumen.	1-43,49-57
X	KAWANO, T. et al. "Isolation and structures of mono- and di-deacetyl chromomycin antibiotics 02-3D and 02-3G from <i>Streptomyces avellaneus</i> ". The Journal of Antibiotics 1990, Volumen XLIII, Número 1, páginas 110-113. Ver página 110, columna 1, párrafo 1; página 112, figura 1.	1-43,49-57

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.12.2010

Examinador
G. Esteban García

Página
1/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H15/24 (01.01.2006)
A61K31/704 (01.01.2006)
C12N1/21 (01.01.2006)
C12N15/76 (01.01.2006)
C12N9/10 (01.01.2006)
A61P35/00 (01.01.2006)
A61P19/08 (01.01.2006)
A61P19/00 (01.01.2006)
A61P25/00 (01.01.2006)
C12R1/465 (01.01.2006)
C12R1/545 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, A61K, C12N, A61P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3-41,44-57	SI
	Reivindicaciones 1,2,42,43	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 44-48	SI
	Reivindicaciones 1-43,49-57	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PÉREZ, M. et al. Chembiochem 2008, Vol. 9, Nº 22, pp. 2295-2304	28.10.2008
D02	US 20050192432 A1	01.09.2005
D03	WO 2008096028 A1	14.08.2008
D04	SAITO, T. et al. Gann, 1977, Vol. 68, Nº 7, pp. 375-387	1977
D05	MENÉNDEZ, N. et al. Molecular Microbiology 2004, Vol. 53, Nº 3, pp. 903-915	2004
D06	KAWANO, T. et al. The Journal of Antibiotics 1990, Vol. XLIII, Nº 1, pp. 110-113	1990

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un compuesto de fórmula general (I), el uso de dicho compuesto para la elaboración de una preparación farmacéutica destinada al tratamiento de diversas enfermedades, la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), una cepa bacteriana de *Streptomyces argillaceus* ΔAH-W modificada por el plásmido pMP3*BII, un procedimiento para obtener la cepa bacteriana reivindicada, un procedimiento para la obtención de derivados de fórmula (I) por medio de dicha cepa bacteriana, un procedimiento para la obtención de derivados acilados de ácidos aureólicos a partir de un compuesto de fórmula (I) por medio de una cepa bacteriana *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* C10GIV y un procedimiento para la obtención de derivados acilados de ácidos aureólicos por reacción de un compuesto de fórmula (I) con un agente acilante en presencia de una hidrolasa.

Novedad (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes):

El documento D01 divulga compuestos derivados de mitramicina con perfiles de glicosilación modificados producidos por cepas recombinantes de *Streptomyces argillaceus* tipo salvaje y *Streptomyces argillaceus* M7U1, obtenidas por introducción de diversos plásmidos, algunos de los cuales inducen la formación de compuestos tipo mitramicina, como es el plásmido pMP3*BII (ver página 3, párrafo 3). Entre estos compuestos, que presentan actividad antitumoral (ver página 1, resumen), se encuentran los derivados demicarosil-mitramicina (4), demicarosil-3D-β-D-digitoxil-mitramicina (6) y deoliosil-demicarosil-3C-β-D-olivosil-3C-β-D-digitoxosil-mitramicina (9) (página 11, esquema 1), que se incluyen en la fórmula general I de la invención (R₁ y R₃ son H, R₂ es H para 4 y un monosacárido de fórmula II para 6 y 9, R₄ es un monosacárido de fórmula V y R₅ es COCHOHCHOR₁CH₃; estando el OH del Ce en posición axial en 6 y ecuatorial en 9).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1, 2, 42 y 43 no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga compuestos derivados de mitramicina de fórmula general (II), que cuando R¹² y R⁶ son metilo, R⁴ y R⁵ son H, X es C=O, R¹⁰ es OH (ó X es CHOH y R¹⁰ es C=OCH₃) solapa con la fórmula general (I) de la invención, siendo en ésta R₄ un monosacárido de fórmula V y R₂ H o un monosacárido de fórmula III (ver párrafos [0030]-[0041]). Estos compuestos son producidos por una cepa mutante de *S. argillaceus* M7W1, en el que se ha introducido una mutación en el gen *mtmW*, de forma que el gen mutado no codifica cetorreductasas (ver párrafos [0008]-[0009]). El documento divulga además composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula general (II) y su uso para el tratamiento de diversas enfermedades, como cáncer, enfermedad de Paget, hipercalcemia e hipercalcemia (ver párrafos [0078]-[0088]).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1, 2, 42 y 43 no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D02.

El documento D03 divulga también compuestos derivados de mitramicina de fórmula general (I), que cuando R_1 (equivalente a OR_4 en la fórmula (I) de la invención) es un monosacárido de fórmula II y R_2 es un disacárido de fórmula V, VII, XV ó XVI, solapa con la fórmula general (I) de la invención, siendo en ésta R_5 COCHOHCHOR $_1$ CH $_3$; R_2 un monosacárido de fórmula II (en el caso de que R_2 en la fórmula I de D01 sea un disacárido de fórmula V ó XV) ó un monosacárido de fórmula III (en el caso de que R_2 en la fórmula I de D01 sea un disacárido de fórmula VII ó XVI) (ver página 5, línea 1-página 6, línea 20). Estos compuestos, que se obtienen a partir de cepas bacterianas por introducción de diversos plásmidos en cepas existentes de *Streptomyces argillaceus* salvajes o modificadas mediante la inactivación de uno o varios genes responsables de la biosíntesis de mitramicina (ver página 3, líneas 8-14), son útiles para la preparación de medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades, como cáncer, enfermedad de Paget, hipercalcemia, o hipercalcemia (ver página 11, líneas 16-18; página 12, líneas 26-28; página 13, líneas 6-19).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 2, 42 y 43** no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D03.

El documento D04 divulga el hemisuccinato de **cromomicina A3** (RN: 23276-33-7), que responde a la fórmula general (I) de invención, siendo R_2 un monosacárido de fórmula IV, R_4 es un monosacárido de fórmula VI, R_5 es COCHOHCHOR $_1$ CH $_3$ y el grupo protector R_1 es succinato (COCH $_2$ CH $_2$ COOH). Este compuesto, junto a la cromomicina A3, se utiliza en la quimioterapia combinación frente a tumores sólidos.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 2, 42 y 43** no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D04.

Actividad inventiva (Artículo 8.1 de la Ley de Patentes):

Las reivindicaciones 3-41 se refieren a una serie de compuestos concretos que se incluyen dentro de la fórmula general (I). Aunque estos compuestos no se encuentran explícitamente divulgados en ninguno de los documentos citados, sí se recogen en ellos compuestos muy cercanos estructuralmente con la misma actividad farmacológica. La diferencia existente entre los compuestos divulgados en los documentos D01-D04 y los de la invención consiste en la mayoría de los casos en la presencia en estos últimos de diversos grupos acilo que protegen alguno de los grupos hidroxilo existentes en este tipo de compuestos glicosidados.

Teniendo en cuenta que el problema técnico que subyace en la solicitud es la provisión de compuestos alternativos a los ya existentes en el estado de la técnica con actividad para el tratamiento del cáncer, la enfermedad de Paget, enfermedades neurológicas, la hipercalcemia o la hipercalcemia, y a la vista de los compuestos divulgados en cada uno de los documentos D01-D04, se considera que el experto en la materia se plantearía los compuestos de la invención como alternativas evidentes a los compuestos conocidos, algunos de los cuales poseen también grupos hidroxilo protegidos.

En ausencia de resultados comparativos o de algún otro tipo de información respecto a propiedades farmacológicas inesperadas con respecto al estado de la técnica más cercano, las modificaciones estructurales llevadas a cabo por el solicitante, que no afectan al esqueleto central de la molécula en el que parece residir la actividad farmacológica, se consideran arbitrarias y no es posible determinar si el problema técnico mencionado se resuelve o no.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **3-41** carece de actividad inventiva con respecto a lo divulgado en cada uno de los documentos D01-D04 considerados por separado.

El documento D05 divulga compuestos antitumorales derivados de ácidos aureólicos, entre los que se encuentran las **cromomicinas A $_2$ y A $_3$** (ver página 904, figura 1A), que poseen una estructura similar a los compuestos de la invención, en los que R_2 es un monosacárido de fórmula IV, R_4 es un monosacárido de fórmula VI y R_5 es COCHOHCHOHCH $_3$, presentando dos grupos protectores en los anillos A y E (dos acetilos en la cromomicina A $_3$ y un grupo acetilo y un isobutilo en la cromomicina A $_2$). El documento divulga también los compuestos **1-5** (ver página 907, figura 3), que se diferencian de los anteriores en su diferente patrón de acilación, y que son producidos por un mutante de *Streptomyces griseus* en el que se ha inactivado el gen *cmmMIII*. Cuando estos compuestos demetilados y/o deacetilados se añaden como sustratos a un cultivo de una cepa bacteriana *Streptomyces albus* que expresa los genes *cmmMIII* y/o *cmmA* se obtienen las cromomicinas A $_2$ y A $_3$ (ver página 903, resumen).

Aunque estos compuestos no se incluyen en la fórmula general (I) de la invención, se trata de compuestos estructuralmente relacionados con éstos y con la misma actividad farmacológica, por lo que siguiendo el razonamiento explicado para los documentos D01-D04, se considera igualmente que las reivindicaciones 1-43 carecen de actividad inventiva con respecto a lo divulgado en el documento D05.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-43** no presenta actividad inventiva a la luz de lo divulgado en el documento D05.

El documento D06 divulga antibióticos antitumorales derivados de ácidos aureólicos, y producidos por *Streptomyces avellaneus* (página 110, columna 1, párrafo 1), entre los que se encuentran la cromomicina A₃ y sus derivados 02-3D, 02-3G y K-2, que poseen una estructura similar a los compuestos de la invención, en los que R₂ es un monosacárido de fórmula IV y R₄ es un monosacárido de fórmula VI (ver página 112, figura 1).

Como en el caso anterior, aunque estos compuestos no se incluyen en la fórmula general (I) de la invención, se trata de compuestos estructuralmente relacionados con éstos y con la misma actividad farmacológica, por lo que siguiendo el razonamiento explicado para los documentos D01-D04, se considera igualmente que las reivindicaciones 1-43 carecen de actividad inventiva con respecto a lo divulgado en el documento D06.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-43** no tiene actividad inventiva según lo divulgado en el documento D06.

Por otro lado, por lo que respecta a las reivindicaciones **49-57**, que se refieren a un procedimiento para la obtención de derivados acilados de ácidos aureólicos por reacción de un compuesto de fórmula (I) con un agente acilante en presencia de una hidrolasa, se considera que no presentan actividad inventiva según lo divulgado en cualquiera de los documentos D01-D06 considerados por separado, ya que los procedimientos de acilación bioenzimática catalizados por diversas hidrolasas, y en concreto por lipasa de *Candida antarctica*, son de sobra conocidos en el estado de la técnica, y constituyen una práctica habitual del experto en la materia en este campo de la técnica.

Sin embargo, ninguno de los documentos D01-D06, tomado solo o en combinación, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia la invención recogida en las reivindicaciones independientes **44**, que se refiere a una cepa bacteriana de *Streptomyces argillaceus* ΔAH-W modificada por el plásmido pMP3*BII; **46**, relativa a un procedimiento para obtener dicha cepa; **47**, que se refiere a un procedimiento para la obtención de derivados de fórmula (I) por medio de dicha cepa bacteriana la reivindicación; y **48**, relativa a un procedimiento para la obtención de derivados acilados de ácidos aureólicos a partir de un compuesto de fórmula (I) por medio de una cepa bacteriana *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* C10GIV.

En consecuencia, se considera que la invención definida en las reivindicaciones **44-48** cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.