

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 941**

51 Int. Cl.:

C07K 7/54 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10724252 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2440571**

54 Título: **Preparación y uso de ciclodepsipéptidos antitumorales, antibióticos e insecticidas**

30 Prioridad:

11.06.2009 DE 102009025119

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

13.05.2014

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR
OZEANFORSCHUNG KIEL (GEOMAR) (100.0%)
Wischhofstrasse 1-3
24148 Kiel, DE**

72 Inventor/es:

**IMHOFF, JOHANNES;
KNOPF-KAJAHN, INGA;
LANG, GERHARD;
WIESE, JUTTA y
PETERS, ARNE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 459 941 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación y uso de ciclodepsipéptidos antitumorales, antibióticos e insecticidas

La presente invención se refiere a péptidos cíclicos, las Xenobovidas, que se son adecuadas para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, tumorales, neurológicas y de base inflamatoria así como de diabetes. Otro ámbito de uso adicional de la invención es la preparación de insecticidas y agentes fitosanitarios. La invención se refiere además a un procedimiento para la producción de estos compuestos, mediante fermentación de una bacteria y purificación cromatográfica del extracto de bacterias, así como su uso como medicamento, insecticida y agente fitosanitario.

Determinados géneros de nematodos contienen simbioses bacterianos que matan insectos. Los nematodos que viven en el cuerpo detectan insectos en la naturaleza y atraviesan la superficie del insecto, de modo que se inyectan bacterias patógenas en el hemocele del insecto. Estas bacterias producen antibióticos, enzimas y toxinas que matan el insecto. Los nematodos que se encuentran en el insecto se multiplican, generan varias bacterias y se liberan del cadáver en descomposición para buscar nuevos insectos.

Las bacterias del género *Xenorhabdus*, asociadas simbióticamente con nematodos *Steinernema*, son conocidas como fuente de un gran número de sustancias biológicamente activas. De estas bacterias entomopatógenas se aislaron distintas proteínas que son tóxicas para insectos. Esto es, por ejemplo, el caso de proteínas TC ("proteínas del complejo de toxina") como se describen en el documento US 7285632 B2 o en el documento US 2008/0104731 A1, de proteínas "tipo TC" (documentos EP 1130970 B1, EP 1143800 B1), o de una serie de otras proteínas de toxinas (documentos US 6048838, US 6174860 B1, US 6277823 B1, US 7214525 B1, US 6841165 B1). Se conocen igualmente varias sustancias de efecto antibacteriano aisladas de estas bacterias: pseudopéptidos (documento EP 1351977 B1), el péptido Xenorhabdicina (Thaler y col. 1995, *Purification and characterization of xenorhabdycin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain FI of Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2049-2052), la Xenorhabdina (documento EP 0192713 B1), la Xenocoumacina (documento EP 0192713 B1), la Nematofina (documento US 5569668), la Xenomina (documento US 5827872), o la Xenorxida (documento US 6316476 B1). La Xenomina y Xenorxida presentan además actividad antineoplásica (documento US 6583171 B1).

Los documentos DE 10252284 A1 y WO 2005/034982 A1 dan a conocer ciclopéptidos con propiedades farmacológicas, herbicidas y/o insecticidas.

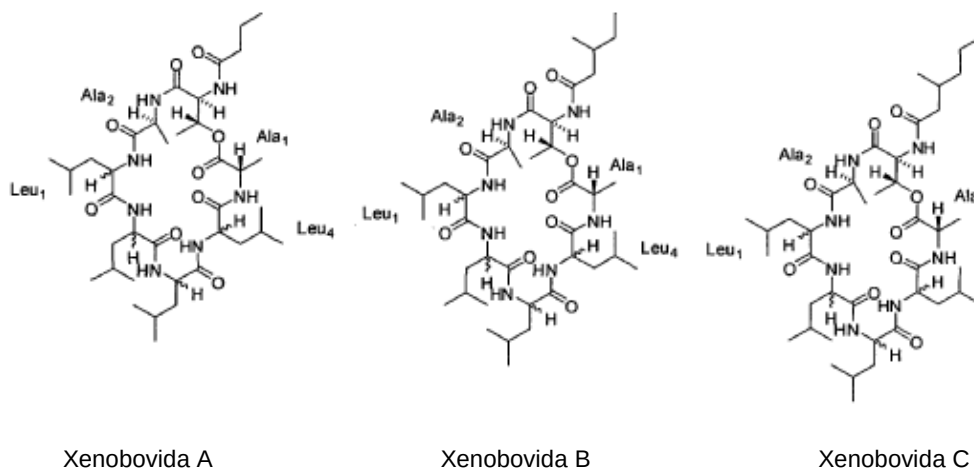
En todo el mundo persiste una necesidad creciente de nuevos principios activos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, cancerígenas e inflamatorias así como de diabetes y enfermedades neurológicas. Además hay una necesidad de nuevas sustancias que se puedan usar como insecticidas o agentes fitosanitarios.

Por tanto la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar otros péptidos que sean de efecto antibiótico, antitumoral, antiinflamatorio, que reduzcan el nivel de azúcar en sangre, aumenten el nivel de acetilcolina o sean de efecto insecticida o inhiban la actividad de acetilcolinesterasa, fosfodiesterasa, proteína tirosina fosfatasa o la glicógeno-sintasa-quinasa, o sean efectivas contra agentes patógenos de enfermedades de las plantas, así como demostrar un modo para su producción.

De acuerdo con la invención se consigue este objetivo mediante el compuesto con las características de la reivindicación 1. Las reivindicaciones subordinadas 2 a 15 aportan configuraciones ventajosas de la invención.

Dentro de un programa científico para el aislamiento de productos naturales biológicamente activos de microorganismos los inventores han aislado y estudiado la bacteria *Xenorhabdus bovienii* del nematodo *Steinernema bibionis*.

Mediante cromatografía rápida de reparto centrífuga (FCPC) y HPLC preparativa se aislaron de cultivos de la bacteria *Xenorhabdus bovienii* los péptidos preferidos de acuerdo con la invención Xenobovida A, B y C.



Los datos físicos de Xenobovida A, B y C se representan en las tablas 1, 2 y 3 acompañantes, en donde la tabla 1 muestra los datos de RMN (600 MHz, DMSO) de Xenobovida A, la tabla 2 los datos de RMN (600 MHz, DMSO) de Xenobovida B y la tabla 3 los datos de RMN (600 MHz, DMSO) de Xenobovida C.

Las sustancias de acuerdo con la invención presentan en las formas de realización específicas Xenobovida A, B y C la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria gram positiva *Staphylococcus xylosus*. Las Xenobovidas B y C presentan además un efecto inhibitorio significativo contra la bacteria gram positiva *Bacillus subtilis* (ejemplo 3).

El crecimiento de la bacteria fitopatógica *Xanthomonas campestris*, entre otros, agente patógeno del ennegrecimiento de la col, se inhibe con Xenobovida A (ejemplo 4).

Las sustancias de acuerdo con la invención Xenobovidas A, B y C muestran además efectos inhibitorios distintos, significativos contra líneas celulares de tumor, de forma particular contra líneas celulares de tumor de estómago, de tumor de pulmón, de cáncer de mama, de melanoma, de tumor de páncreas, de tumor renal y de tumor intestinal (véase el ejemplo 5).

La Xenobovida A inhibe la actividad de los siguientes enzimas:

- acetilcolinesterasa (ejemplo 6): se pueden usar inhibidores de la degradación de acetilcolina en el tratamiento o prevención de enfermedades neurológicas como *Myasthenia Gravis* o enfermedad de Alzheimer.

- fosfodiesterasa PDE-4B2 (ejemplo 7): los inhibidores de PDE4 son agentes antiinflamatorios probados, de forma particular en enfermedades pulmonares inflamatorias como asma, bronquitis obstructiva crónica y enfisema pulmonar, así como con rinitis. Estos inhibidores pueden presentar además un efecto antidepressivo y se propusieron también para el uso como psicofármacos. Adicionalmente los inhibidores de PDE4 pueden debilitar la virulencia de VIH y se podrían usar por tanto en la terapia de SIDA.

- proteína tirosina fosfatasa 1B (ejemplo 8): la proteína tirosina fosfatasa 1B es una diana efectiva para el tratamiento de diabetes y obesidad.

Tanto la Xenobovida A como también la Xenobovida B inhiben además la actividad del glicógeno sintasa quinasa 3beta (ejemplo 9). La inhibición de este enzima puede jugar un papel en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas agudas o crónicas, así como de diabetes y obesidad, trastornos bipolares, esquizofrenia, alopecia y enfermedades cancerígenas.

Se comprobó el efecto insecticida para Xenobovida A, B y C en larvas de polilla de las colmenas, un parásito en la cría de abejas (ejemplo 10).

La cría de *Xenorhabdus bovienii*, así como la purificación de Xenobovidas A, B y C en cultivos de bacteria y la determinación de actividad biológica se describen en los siguientes ejemplos.

1) Producción biotecnológica de Xenobovidas de *Xenorhabdus bovienii*.

Se aisló *X. bovienii* según Akhurst y col. (1980, Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes, *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121 :303-309) a partir del nematodo *Steinernema bibionis*. El cultivo se realizó durante 36 horas en un fermentador de 20 l a 20 °C (Johnigk y col., 2004, Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): improved timing of dauer juvenile inoculation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64:651-658).

2) Aislamiento de Xenobovidas del cultivo de bacterias

Se cosechó la solución de cultivo y se agitó con resina de adsorbedor XAD-16N (Amberlite; 10 g/l de solución de cultivo) durante otras 20 horas. Después se lavó la resina con agua (5 ml/g de XAD) y a continuación se eluyó con metanol (2 ml/g de XAD). Se secó el extracto de XAD metanólico, se resuspendió en agua (300 ml) y se extrajo tres veces con acetato de etilo (300 ml cada vez). Se secaron las fases de acetato de etilo reunidas y se separó mediante cromatografía de reparto centrífuga rápida (FCPC; Kromaton). Para ello se usó un sistema de disolvente de dos fases (H₂O/MeOH/EtOAc/n-heptano en relación de mezcla 49:51:49:51), sirviendo la fase superior como fase estacionaria de la cromatografía. La velocidad de giro del FCPC fue de 1380 min⁻¹ y la velocidad de flujo de 6 ml/min. Se purificaron las fracciones que contienen ciclopeptidopéptido, que eluían de 24 a 63 minutos, se secaron y se purificaron luego mediante HPLC preparativa:

Columna de separación: Phenomenex Luna C 18, 21,2 x 250 mm, 5 µm

Disolvente: agua + 0,1 % de ácido fórmico (A), acetonitrilo + 0,1 % de ácido fórmico (B)

Gradiente: 0 min - 50 % B, 8 min - 100 % B

Caudal: 20 ml/min

Xenobovida A KW044 (15 mg), Xenobovida B KW12 (27 mg) y KW13 Xenobovida C (68 mg) eluían después de 6,1, 8,0 y 8,5 min.

3) Efecto antibacteriano de Xenobovidas A, B o C.

Las Xenobovidas A, B o C inhibían el crecimiento de la bacteria gram positiva *Staphylococcus xylosus* DSM 20267 en 83 %, 81 % o 32 % en una concentración de 65,3 µmol, 63,01 µmol o 61,9 µmol. El ensayo de la actividad antimicrobiana se realizó según Lang y col. (2007, New pentaenes from the sponge-derived marine fungus *Penicillium rugulosum*: structure determination and biosynthetic studies. Tetrahedron 63:11844- 11849).

La Xenobovida B (63 µmol) y C (61,9 µmol) inhibían el crecimiento de la bacteria gram positiva *Bacillus subtilis* (DSM 347) en 29 % o 32 %. En ensayo de la actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* se realizó según Lang y col. (2007, New pentaenes from the sponge-derived marine fungus *Penicillium rugulosum*: structure determination and biosynthetic studies. Tetrahedron 63:11844-11849).

4) Actividad antibacteriana de Xenobovida A frente a agentes patógenos de enfermedades de plantas

La bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* (DSM 2405), entre otros, agentes patógenos del ennegrecimiento de la col, es inhibida por Xenobovida A en 89 %. El ensayo de la actividad antimicrobiana frente a *Xanthomonas campestris* se realizó según Lang y col. (2007, New pentaenes from the sponge-derived marine fungus *Penicillium rugulosum*: structure determination and biosynthetic studies. Tetrahedron 63 : 11844-11849).

5) Efecto antiproliferativo de Xenobovidas A, B y C

Las Xenobovidas A, B o C inhibían la proliferación de las 6 líneas celulares tumorales humanas ensayadas: GXF251L (línea celular de tumor de estómago), LXF529L (línea celular de tumor de pulmón), MAXF401NL (línea celular de cáncer de mama), MEXF462NL (línea celular de melanoma), PAXF1657L (línea celular de tumor de páncreas) y RXF486L (línea celular de tumor renal).

Línea de células tumorales	Xenobovida A	Xenobovida B	Xenobovida C
	Valor CI_{50} [μ mol]	Valor CI_{50} [μ mol]	Valor CI_{50} [μ mol]
GXF251L	1,6	2,5	3,0
LXF529L	8,5	9,7	7,8
MAXF401NL	2,1	3,2	8,5
MEXF462NL	2,7	5,3	9,4
PAXF1657L	3,5	2,9	10,3
RXF486L	12,0	14,5	7,6

El efecto antiproliferativo se determinó según Dengler y col. (1995, Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay. *Anti-Cancer Drugs* 6:522-532).

5 La proliferación de la línea celular de tumor de intestino HT29 fue inhibida al 7 % de Xenobovida A (65,3 μ mol) o 78 % de Xenobovida B (63 μ mol). La Xenobovida C se ensayó a una concentración de 12,3 μ mol y mostró una inhibición de la vitalidad de la línea celular HT29 del 11 %. Estas actividades se determinaron después de una incubación de 48 horas con el ensayo de cristal ultravioleta (Siegmund, D. y col., 2005, Death receptor-induced signalling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing. *Mol. Cell. Biol.* 25:6363-6379).

10 6) Inhibición de acetilcolinesterasa con Xenobovida A

La Xenobovida A inhibe la acetilcolinesterasa con un valor de CI_{50} de 53,6 μ mol. La realización del ensayo se realiza según Birman (1985, Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with natural Substrate. *Biochemical Journal.* 225:825-828).

7) Inhibición de la fosfodiesterasa (PDE-4B2) con Xenobovida A

15 La Xenobovida A inhibe la fosfodiesterasa (PDE-4B2) en una concentración de 163 μ g/ml en un 46 %. Este ensayo de enzima se llevó a cabo según Hohmann y col. (2009, Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *The Journal of Antibiotics.* 62:99-104).

8) Inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) con Xenobovida A

20 La Xenobovida A inhibe la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) en una concentración de 26,1 μ mol en un 59 %. Este ensayo de enzima se llevó a cabo según Hohmann y col. (2009, Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *The Journal of Antibiotics.* 62:99-104).

9) Inhibición de glicógeno sintasa quinasa 3beta con Xenobovida A o B

25 La Xenobovida A o B inhiben el glicógeno sintasa quinasa 3beta en una concentración de 16,3 μ mol o 15,6 μ mol en un 21 % o 43 %. La realización tuvo lugar según Baki y col.. (2007, A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3beta inhibitors. *Assay and Drug Development Technologies.* 5:75-83) con uso del kit de ensayo Kinase-Glo Luminescent Kinase de la compañía Promega.

10) Efecto insecticida de Xenobovida A, B o C

30 El efecto insecticida se ensayó frente a larvas de polilla de las colmenas, un parásito en la cría de abejas. La adición de Xenobovida A, B o C al alimento condujo a la muerte de todas las larvas usadas en el ensayo en 4 repeticiones. Para el ensayo de la toxicidad por vía oral se disolvieron 1 mg de sustancia / ml en una solución de etanol acuosa al 50 %. Se transfirieron respectivamente 5 larvas en una caja de plástico (de 2 cm de diámetro) y se alimentaron con 1 g de mezcla nutritiva (0,8 ml de solución de sustancia, 0,2 ml de glicerina (86 %) y 1 g de salvado de trigo). El grupo

de control se alimentó con 1 g de mezcla nutritiva sin adición de sustancia (0,4 ml ac. dest, 0,4 ml de etanol, 0,2 ml de glicerina (86 %) y 1 g de salvado de trigo). La incubación de larvas se realizó 35 °C durante 6 días. A continuación se recuentan las larvas muertas.

Tabla 1: datos de RMN (600 MHz, DMSO) de Xenobovida A sólido amorfo incoloro. Actividad óptica: $[\alpha]_D^{25} -1,6^\circ$ (c 0,25, MeOH)

HRESIMS: m/z 766,5075 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{38}H_{68}N_7O_9$ 766,50785)

Posición		δ_c , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC
<i>Thr</i>	1	169,1, qC	-	-	-
	2	55,0 CH	4,57, <i>dd</i> (2,1, 9,3)	3, NH	1, 3, 4, <i>BA</i> -1
	3	70,6, CH	5,22, <i>cd</i> (2,1, 6,3)	2, 4	1, 4, <i>Ala</i> ₁ -1
	4	17,3, CH ₃	1,16 <i>d</i> (6,3)	3	2,3
	NH	-	7,69, <i>d</i> (9,4)	2	2
<i>Ala</i> ₁	1	171,8 qC	-	-	-
	2	48,5, CH	4,15, <i>m</i>	3, NH	1, 3
	3	16,0, CH ₃	1,29, <i>d</i> (6,9)	2	1,2
	NH	-	8,16, <i>d</i> (5,3)	2	2, <i>Leu</i> ₄ -1
<i>Ala</i> ₂	1	172,2 qC	-	-	-
	2	49,3, CH	4,19, <i>m</i> (6,8)	3, NH	1, 3, <i>Thr</i> -1
	3	18,1, CH ₃	1,26, <i>d</i> (7,2)	2	1, 2
	NH	-	8,00, <i>d</i> (6,4)	2	2, <i>Thr</i> -1
<i>Leu</i> ₁	1	173,5, qC	-	-	-
	2	52,2 CH	4,14, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,0, CH ₂	1,58, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,3 ^b , CH	1,62 ^b , <i>m</i>	3,5,6	3, 5, 6
	5	23,1 ^b , CH ₃	0,88 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	23,1 ^b , CH ₃	0,88 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	7,58, <i>d</i> (6,1)	2	<i>Ala</i> ₂ -1

ES 2 459 941 T3

(continuación)

<i>Leu₂</i>	1	172,0, qC	-	-	-
	2	52,4, CH	4,09, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,5, CH ₂	1,62, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,3 ^b , CH	1,62 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	22,5 ^b , CH ₃	0,92 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	22,5 ^b , CH ₃	0,92 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	7,53, <i>d</i> (6,8)	2	<i>Leu₁</i> -1
<i>Leu₃</i>	1	171,6, qC	-	-	-
	2	51,5, CH	4,14, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,5, CH ₂	1,58, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,2 ^b , CH	1,62 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	21,7 ^b , CH ₃	0,85 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	21,7 ^b , CH ₃	0,85 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	8,23, <i>d</i> (7,7)	2	<i>Leu₂</i> -1
<i>Leu₄</i>	1	172,0, qC	-	-	-
	2	50,6, CH	4,26, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,6, CH ₂	1,51, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,1 ^b , CH	1,62 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	20,7 ^b , CH ₃	0,81 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	20,7 ^b , CH ₃	0,81 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	7,51, <i>d</i> (8,9)	2	<i>Leu₃</i> -1
<i>BA^a</i>	1	172,4, qC	-	-	-
	2a	44,5, CH ₂	2,19, <i>m</i>	2b, 3	1, 3, 4
	2b	44,5, CH ₂	2,11, <i>m</i>	2a, 3	1, 3, 4
	3	25,6, CH ₂	2,00, <i>m</i>	2a, 2b, 4	1, 2, 4
	4	13,9, CH ₃	0,90, <i>m</i>	3	3

^aBA = ácido butírico

^b la asignación se puede intercambiar

Tabla 2: datos de RMN (600 MHz, DMSO) de Xenobovida B sólido amorfo incoloro. Actividad óptica: $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -1,6^{\circ}$ (c 0,25, MeOH)

HRESIMS: m/z 794,5380 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{40}H_{72}N_7O_9$ 794,53915)

Posición		δ_c , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC
<i>Thr</i>	1	169,2, qC	-	-	-
	2	55,0 CH	4,55, <i>dd</i> (2,1, 9,2)	3, NH	1, 3, 4, <i>MPA</i> -1
	3	70,6 CH	5,21, <i>cd</i> (2,1, 6,3)	2, 4	1, 4, <i>Ala</i> ₁ -1
	4	17,0 CH ₃	1,15 <i>d</i> (6,3)	3	2, 3
	NH	-	7,67, <i>d</i> (9,3)	2	2, <i>MPA</i> -1
<i>Ala</i> ₁	1	171,7 qC	-	-	-
	2	48,5, CH	4,14, <i>m</i>	3, NH	1, 3
	3	16,0, CH ₃	1,29, <i>d</i> (7,2)	2	1,2
	NH	-	8,13, <i>d</i> (5,5)	2	2, <i>Leu</i> ₄ -1
<i>Ala</i> ₂	1	172,3 qC	-	-	-
	2	49,2, CH	4,19, <i>m</i> (6,7)	3, NH	1, 3 <i>Thr</i> -1
	3	17,9, CH ₃	1,25, <i>d</i> (7,2)	2	1, 2
	NH	-	7,96, <i>d</i> (6,2)	2	2, <i>Thr</i> -1
<i>Leu</i> ₁	1	172,0, qC	-	-	1, 3,
	2	52,0 CH	4,11, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,0, CH ₂	1,52, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,2 ^b , CH	1,62 ^b , <i>m</i>	3,5,6	3, 5, 6
	5	23,0 ^b , CH ₃	0,88 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	23,0 ^b , CH ₃	0,88 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	7,56, <i>d</i> (6,1)	2	<i>Ala</i> ₂ -1
<i>Leu</i> ₂	1	171,9, qC	-	-	-
	2	52,3, CH	4,08, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,5, CH ₂	1,62, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,2 ^b , CH	1,62 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6

(continuación)					
<i>Leu₃</i>	5	22,5 ^b , CH ₃	0,92 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	22,5 ^b , CH ₃	0,92 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	7,53, d (6,8)	2	<i>Leu₁-1</i>
	1	171,5, qC	-	-	-
	2	51,5, CH	4,13, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,5, CH ₂	1,56, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,1 ^b , CH	1,62 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	21,7 ^b , CH ₃	0,85 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	21,7 ^b , CH ₃	0,85 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	8,24, <i>d</i> (7,9)	2	<i>Leu₂-1</i>
<i>Leu₄</i>	1	171,9, qC	-	-	-
	2	50,5, CH	4,25, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,6, CH ₂	1,50, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,0 ^b , CH	1,62 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	20,7 ^b , CH ₃	0,81 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	20,7 ^b , CH ₃	0,81 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	7,50, <i>d</i> (7,9)	2	<i>Leu₃-1</i>
	1	172,6, qC	-	-	-
	2a	35,0, CH ₂	2,28, <i>m</i>	2b, 3	1, 3, 4
	2b	35,0, CH ₂	2,19, <i>m</i>	2a, 3	1, 3, 4
<i>MPA^a</i>	3	24,8, CH	1,51, <i>m</i>	2a, 2b, 4, 6	1, 2, 4, 6
	4	30,7, CH ₂	1,24, <i>m</i>	3, 5	3, 5
	5	13,1, CH ₃	0,85, <i>m</i>	4	4
	6	21,4, CH ₃	1,28, <i>m</i>	3	3

^a MPA = ácido 3-metilpentoico

^b la asignación se puede intercambiar

ES 2 459 941 T3

Tabla 3: datos de RMN (600 MHz, DMSO) de Xenobovida C sólido amorfo incoloro. Actividad óptica: $[\alpha]_D^{25} -1,6^\circ$ (c 0,25, MeOH)

HRESIMS: m/z 808,5545 $[M+H]^+$ (calculado para $C_{41}H_{74}N_7O_9$ 808,55480)

Posición		δ_c , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC
<i>Thr</i>	1	169,0, qC	-	-	-
	2	55,1 CH	4,55, <i>dd</i> (2,0, 9,3)	3, NH	1, 3, 4, <i>MHA</i> -1
	3	70,6 CH	5,22, <i>cd</i> (2,0, 6,3)	2, 4	1, 4, <i>Ala</i> ₁ -1
	4	177,1 CH ₃	1,16 <i>d</i> (6,3)	3	2, 3
	NH	-	7,69, <i>d</i> (9,3)	2	2, <i>MHA</i> -1
<i>Ala</i> ₁	1	171,8 qC	-	-	-
	2	48,5, CH	4,15, <i>m</i>	3, NH	1, 3
	3	16,0, CH ₃	1,29, <i>d</i> (7,1)	2	1,2
	NH	-	8,14, <i>d</i> (5,4)	2	2, <i>Leu</i> ₄ -1
<i>Ala</i> ₂	1	172,4 qC	-	-	-
	2	49,4, CH	4,19, <i>m</i> (6,7)	3, NH	1, 3 <i>Thr</i> -1
	3	18,0, CH ₃	1,25, <i>d</i> (7,2)	2	1, 2
	NH	-	7,97, <i>d</i> (6,2)	2	2, <i>Thr</i> -1
<i>Leu</i> ₁	1	172,1, qC	-	-	-
	2	52,1 CH	4,13, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,0, CH ₂	1,53, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,2 ^b , CH	1,63 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	23,0 ^b , CH ₃	0,88 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	23,0 ^b , CH ₃	0,88 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	7,58, <i>d</i> (6,0)	2	<i>Ala</i> ₂ -1
<i>Leu</i> ₂	1	172,0, qC	-	-	-
	2	52,4, CH	4,09, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,5, CH ₂	1,63, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,2 ^b , CH	1,63 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	22,5 ^b , CH ₃	0,92 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	22,5 ^b , CH ₃	0,92 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5

ES 2 459 941 T3

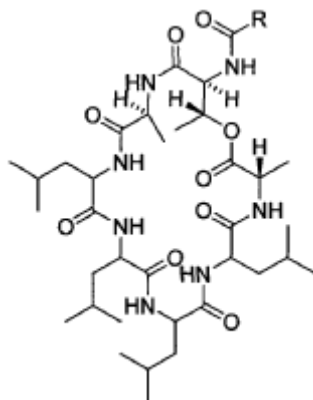
	NH	-	7,54, <i>d</i> (6,7)	2	<i>Leu</i> ₁ -1
	(continuación)				
<i>Leu</i> ₃	1	171,6, qC	-	-	-
	2	51,6, CH	4,14, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,5, CH ₂	1,59, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,1 ^b , CH	1,63 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	21,7 ^b , CH ₃	0,85 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	21,7 ^b , CH ₃	0,85 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	8,24, <i>d</i> (7,7)	2	<i>Leu</i> ₂ -1
<i>Leu</i> ₄	1	172,0, qC	-	-	-
	2	50,6, CH	4,26, <i>m</i>	3, NH	1, 3, 4
	3	39,6, CH ₂	1,51, <i>m</i>	4	2, 4
	4	24,0 ^b , CH	1,63 ^b , <i>m</i>	3, 5, 6	3, 5, 6
	5	20,7 ^b , CH ₃	0,82 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 6
	6	20,7 ^b , CH ₃	0,82 ^b , <i>m</i>	4	3, 4, 5
	NH	-	7,51, <i>d</i> (8,8)	2	<i>Leu</i> ₃ -1
<i>MHA</i> ^a	1	172,7, qC	-	-	-
	2a	35,3, CH ₂	2,29, <i>m</i>	2b, 3	1, 3, 4
	2b	35,3, CH ₂	2,20, <i>m</i>	2a, 3	1, 3, 4
	3	23,1, CH	1,51, <i>m</i>	2a, 2b, 4, 7	1, 2, 4, 7
	4	37,9, CH ₂	1,15, <i>m</i>	3, 5	3, 5
	5	27,1, CH ₂	1,51, <i>m</i>	4, 6	4, 6
	6	23,1, CH ₃	0,85, <i>m</i>	5	6, 7
	7	22,4, CH ₃	0,88, <i>m</i>	3	3

^a MHA = ácido 3-metilhexanoico

^b la asignación se puede intercambiar

REIVINDICACIONES

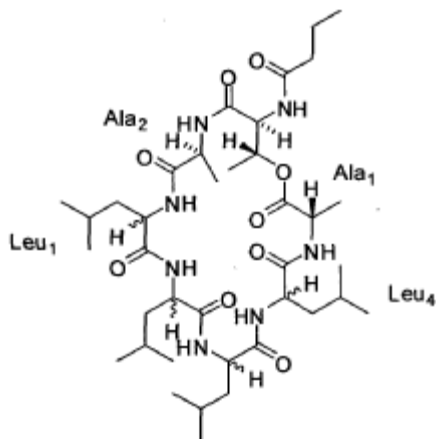
1. Compuesto de estructura general



5 en la que R es un átomo de hidrógeno (H) y/o un alquilo C₁-C₂₀ no sustituido, monosustituido o polisustituido, donde el alquilo está ramificado, es cíclico y/o parcialmente insaturado, o es un resto fenilo no sustituido, monosustituido o sustituido varias veces.

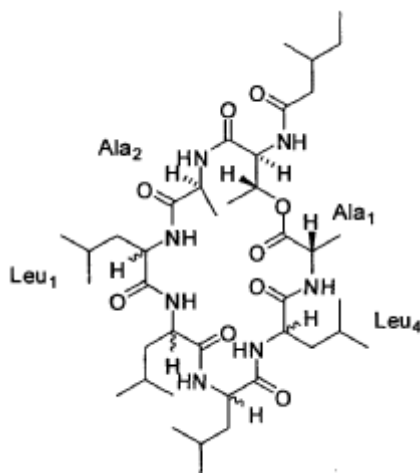
2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque los sustituyentes de R se seleccionan del grupo
10 constituido por un resto alquilo lineal o ramificado, un grupo acilo, un resto halógeno, un grupo amino no sustituido o sustituido con alquilo, un grupo hidroxilo, un grupo éter y un grupo carboxilo libre así como esterificado con grupo alquilo o amidado, donde el grupo acilo es preferiblemente un grupo formilo, acetilo, tricloroacetilo, fumarilo, maleílo, succinilo, benzoílo, o un grupo acilo ramificado o sustituido con heteroátomo o arilo.

3. Compuesto según la reivindicación 1 con la fórmula



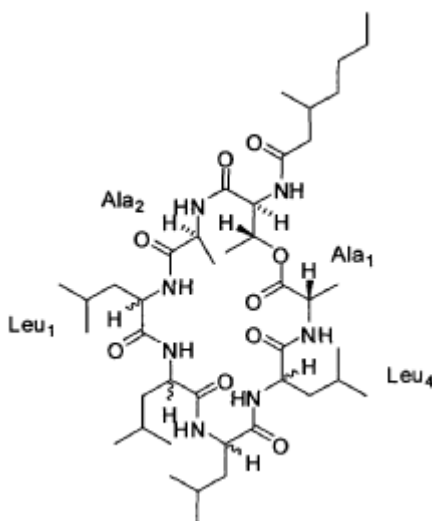
(Xenobovida A)

incluyendo sus diastereómeros, o con la fórmula



(Xenobovida B)

incluyendo sus diastereómeros o con la fórmula



(Xenobovida C)

5

incluyendo sus diastereómeros.

4. Procedimiento para la preparación de un compuesto según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por las etapas:

- cultivo de una bacteria del género *Xenorhabdus* de una forma conocida y

10 - aislamiento del compuesto a partir del medio de cultivo y/o de la bacteria.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la bacteria es *Xenorhabdus bovienii*.

6. Sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como agente antitumor, preferiblemente para el tratamiento y para la prevención de melanoma, enfermedades de tumor gástrico, tumor de pulmón, cáncer de mama, tumor de páncreas, tumor renal y tumor de intestino.

7. Sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como agente para el tratamiento y la prevención de enfermedades neurológicas, de forma particular *Myasthenia Gravis* o enfermedad de Alzheimer, o enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas.

5 8. Sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como agente para la inhibición y la prevención de la inflamación y, de forma particular en rinitis o enfermedades del pulmón inflamatorias seleccionadas del grupo comprendido por asma, bronquitis obstructiva crónica y enfisema pulmonar.

9. Sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como psicofármaco, de forma particular como antidepresivo o para el tratamiento de trastorno bipolar o de esquizofrenia.

10 10. Sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento de alopecia o SIDA o como antibiótico.

11. Sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como agente para el tratamiento y la prevención de diabetes o de obesidad.

12. Sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como insecticida.

13. Uso no terapéutico de una sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 como insecticida.

15 14. Uso de una sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 como agente fitosanitario.

15. Uso *in vitro* de una sustancia según una de las reivindicaciones 1 a 3 como inhibidor de acetilcolinesterasa, como inhibidor de fosfodiesterasa, como inhibidor de proteína tirosina fosfatasa o como inhibidor de glicógeno sintasa quinasa 3-beta.