

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 464**

51 Int. Cl.:

C07H 15/24	(2006.01)	C12R 1/545	(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)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2010 E 10801992 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2457921**

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

30 Prioridad:

23.07.2009 ES 200930497

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

26.06.2014

73 Titular/es:

**ENTRECHEM, S.L. (100.0%)
Edificio Científico Tecnológico Campus El
Cristo
33006 Oviedo, Asturias, ES**

72 Inventor/es:

**NÚÑEZ GONZÁLEZ, LUZ ELENA;
MENÉNDEZ SÁNCHEZ, NURIA;
GONZÁLEZ SABIN, JAVIER;
MORÍS VARAS, FRANCISCO;
GARCÍA FERNÁNDEZ, BEATRIZ;
PÉREZ SOLARES, MARÍA;
FERNÁNDEZ BRAÑA, ALFREDO;
MÉNDEZ FERNÁNDEZ, MARÍA DEL CARMEN y
SALAS FERNÁNDEZ, JOSÉ ANTONIO**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 471 464 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

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

CAMPO DE LA INVENCION

5

Esta descripción 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.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

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).

20

25

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).

35

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.

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.

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.

Documentos M. Bataller *et al.*, 2008; Lily L. Remsing *et al.*, 2003; Perez, M. *et al.*, 2008; US2005/192432A1 y WO2008/096028A1; divulgan compuestos parecidos al compuesto VII de la invención. Sin embargo, ninguno de dichos documentos divulga un compuesto que tiene la combinación específica de restos en R5 y R2 del compuestos VII de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una nueva cepa bacteriana denominada *Streptomyces argillaceus* ΔAH-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* ΔAH, 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* ΔAH-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* ΔAH-W⁻ (pMP3*BII) implica la introducción de un ácido nucleico adicional en el mutante ΔAH-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*.

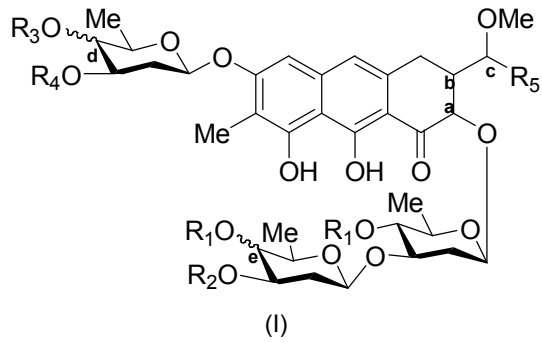
La introducción de ácidos nucleicos en *Streptomyces argillaceus* (o en cepas derivadas) se puede realizar mediante transformación de protoplastos, conjugación, u otros métodos conocidos (tales como lo descritos en Practical *Streptomyces* Genetics, The John Innes Foundation, Norwich, Gran Bretaña, 2000), 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, esta descripción divulga 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 el derivado de ácido aureólico de la invención. 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 el compuesto de la invención. Estas lipasas se presentan en diferentes formas de inmovilización sobre soportes hidrófobos y mecánicamente resistentes o sobre resinas acrílicas, como puede ser una resina epoxiacrílica 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 descripción divulga compuestos caracterizados por la fórmula general (I):

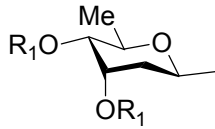


5 donde,

R₁ es hidrógeno o un grupo protector,

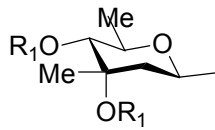
R₂ es hidrógeno, o un grupo protector, o un monosacárido de fórmula (II),

10



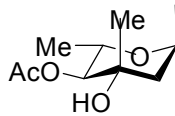
o un monosacárido de fórmula (III),

15



o un monosacárido de fórmula (IV),

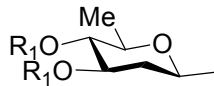
20



R₃ es hidrógeno o un grupo acetilo,

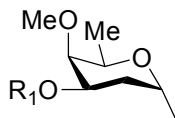
25

R₄ es un monosacárido de fórmula (V),



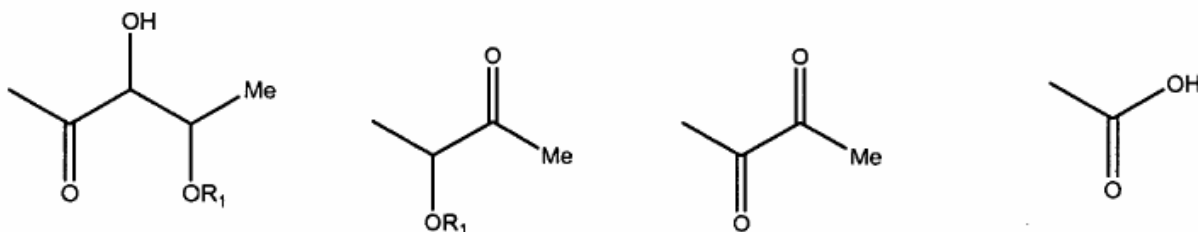
30

o un monosacárido de fórmula (VI)

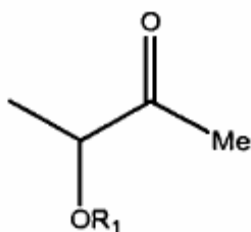


35

R₅ 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 menos un R_1 debe ser un grupo protector, y



5

considerando igualmente que si R_2 es hidrógeno y R_5 es entonces, al menos un R_1 debe ser un grupo protector.

10

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.

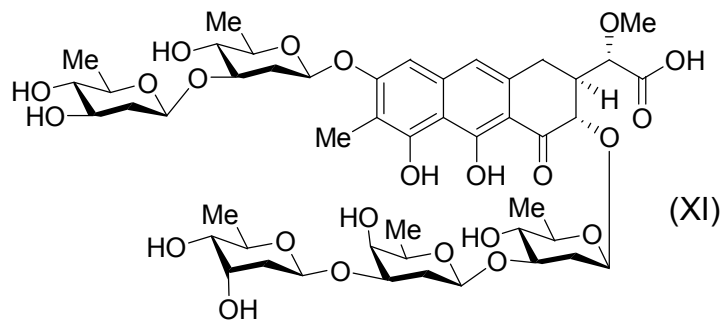
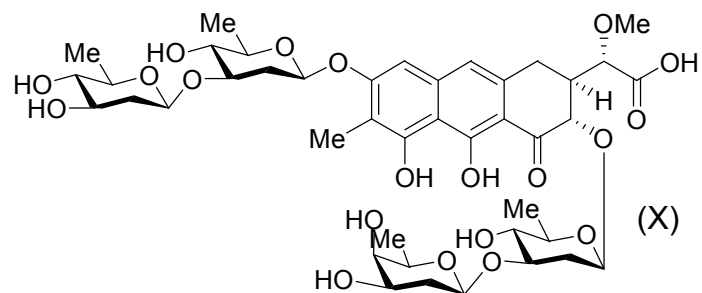
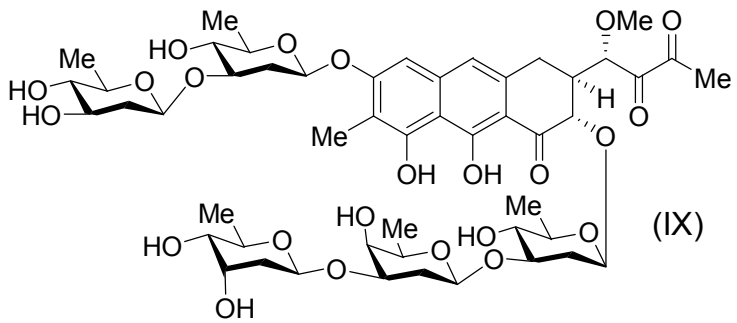
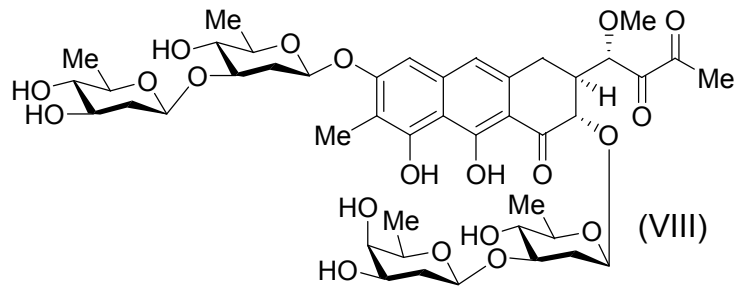
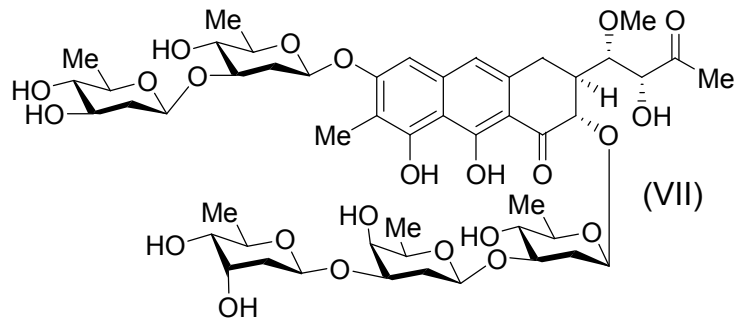
15

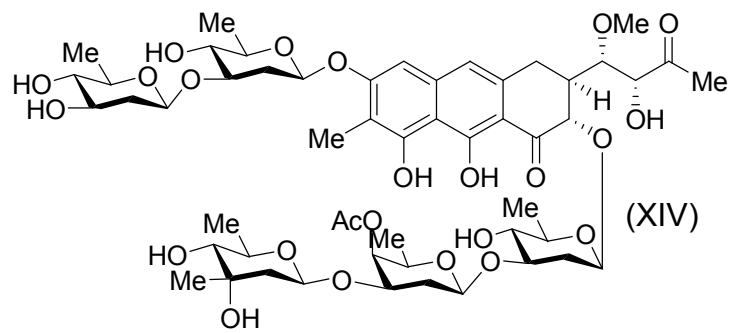
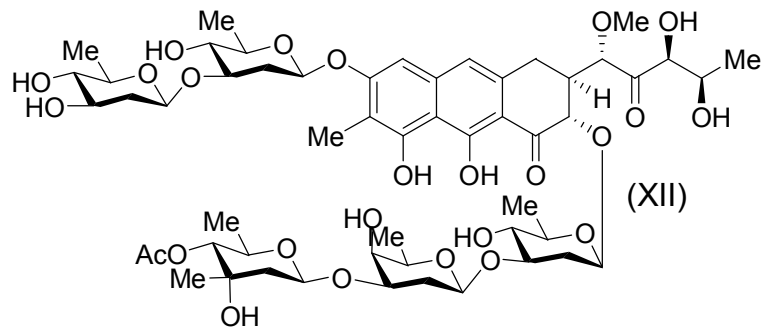
La estereoquímica de los carbonos a, b y c, así como la de los centros quirales presentes en R_5 puede ser *R*, *S*, o una mezcla de ambos.

20

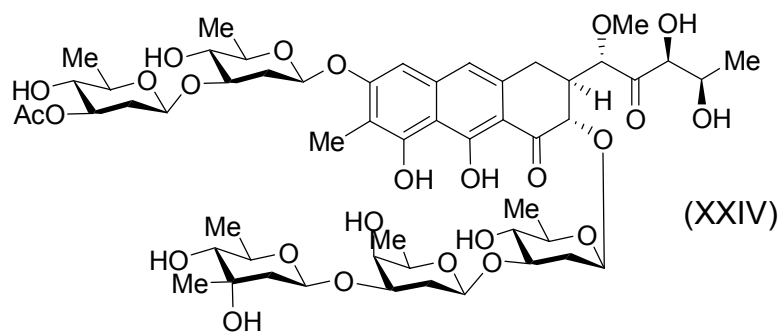
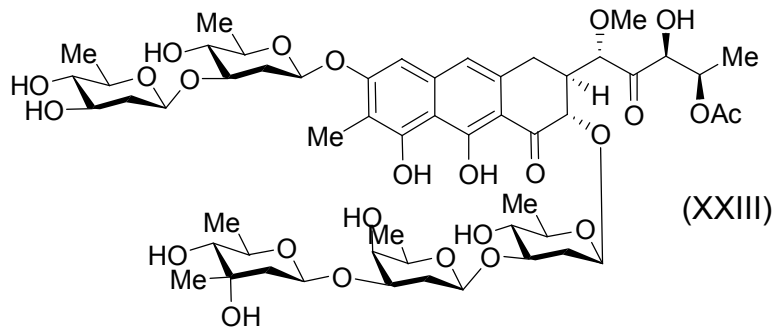
A los efectos de la presente descripción, los dos enlaces ondulantes presentes en la fórmula general (I) sobre los carbonos d y e indican que los correspondientes sustituyentes pueden estar tanto en posición axial como en ecuatorial.

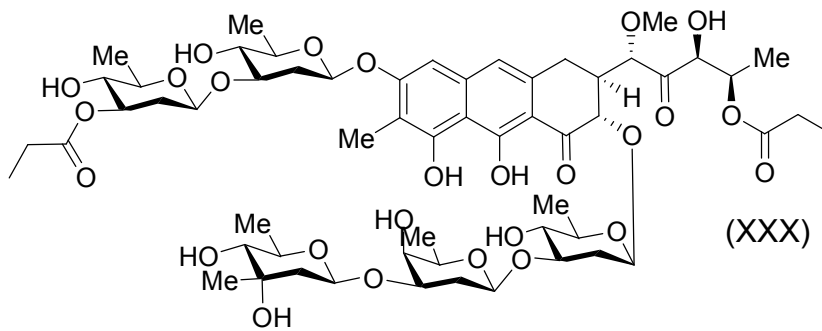
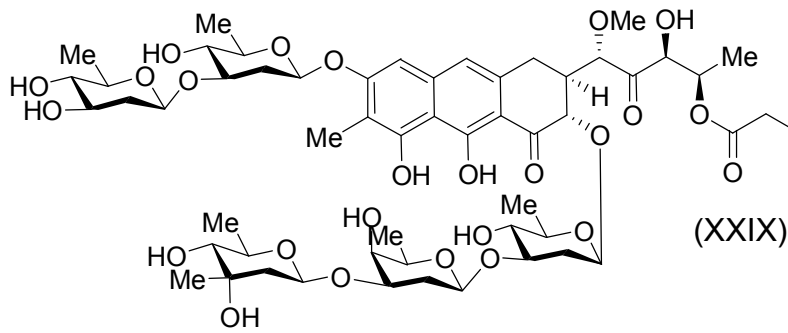
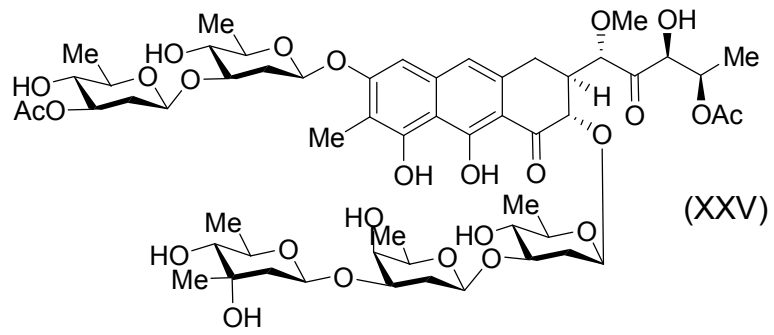
En particular, la presente descripción divulga, entre otros, los compuestos con las fórmulas (VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIV, XXIII, XXIV, XXV, XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIV, XXXVI, XXXVIII, XLI, XLIV, XLV, XLVI, XLVII, XLVIII, XLIX, LI, LII, LIII, LIV, LV, LVI, LVII, LVIII, LXI, LXIX, LXXX, XCII, XCIII,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



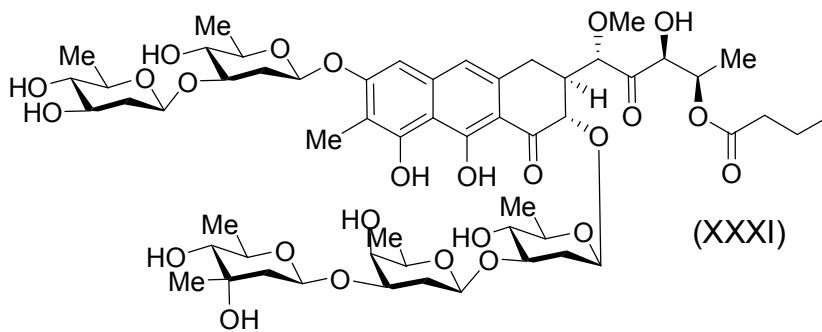


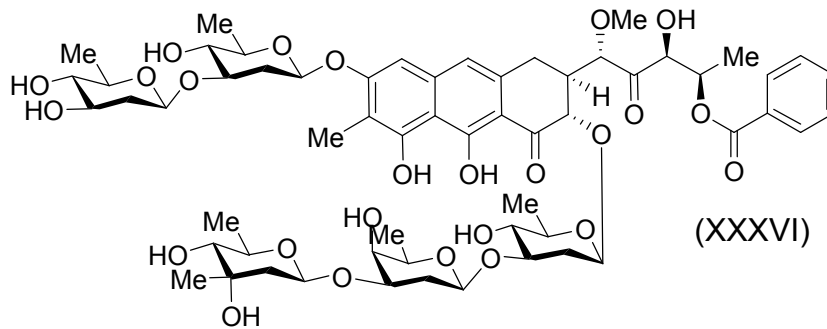
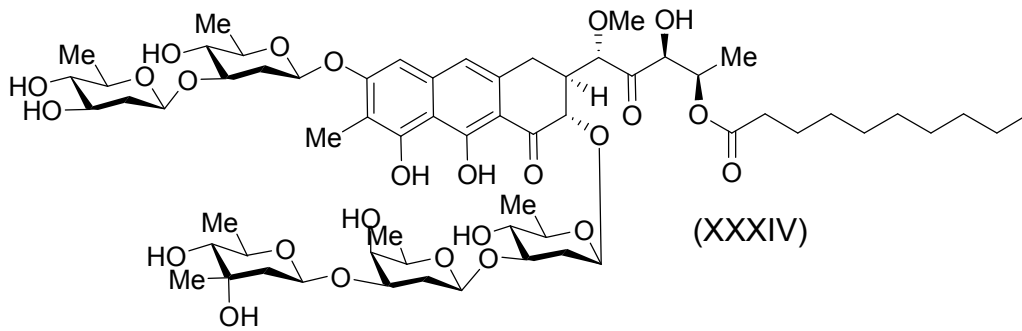
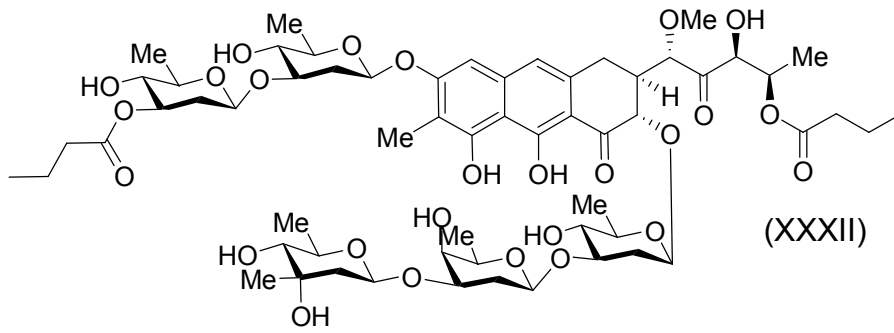
5



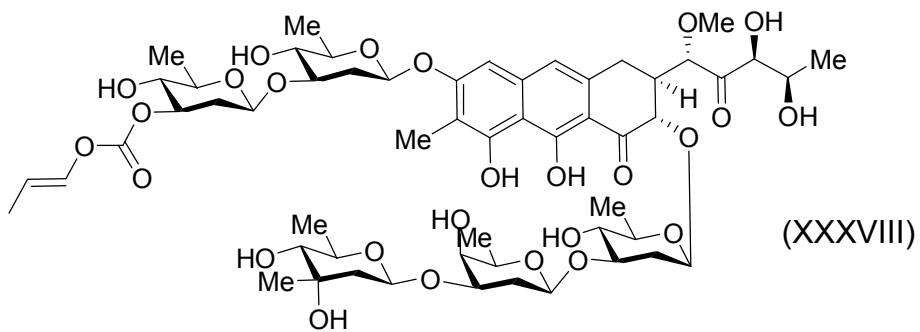


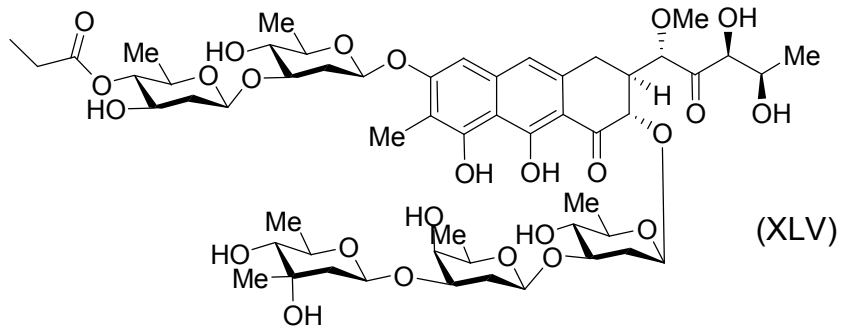
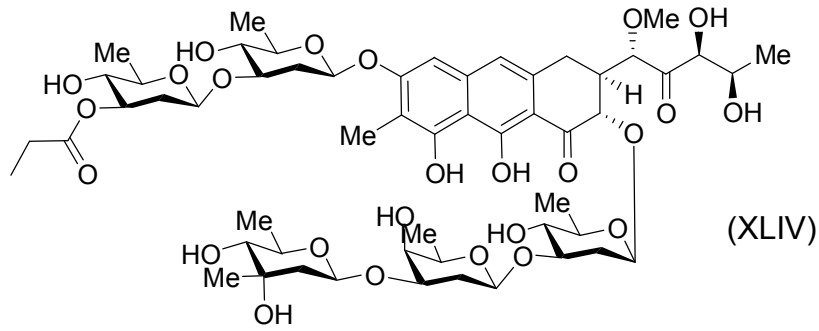
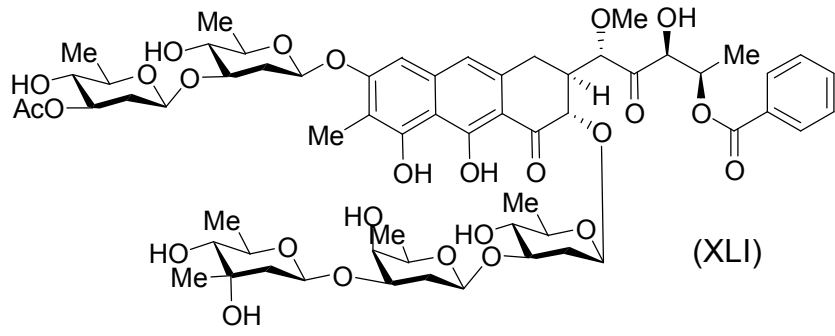
5



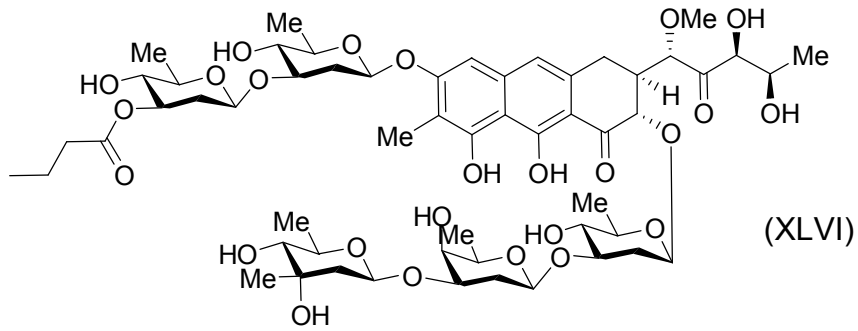


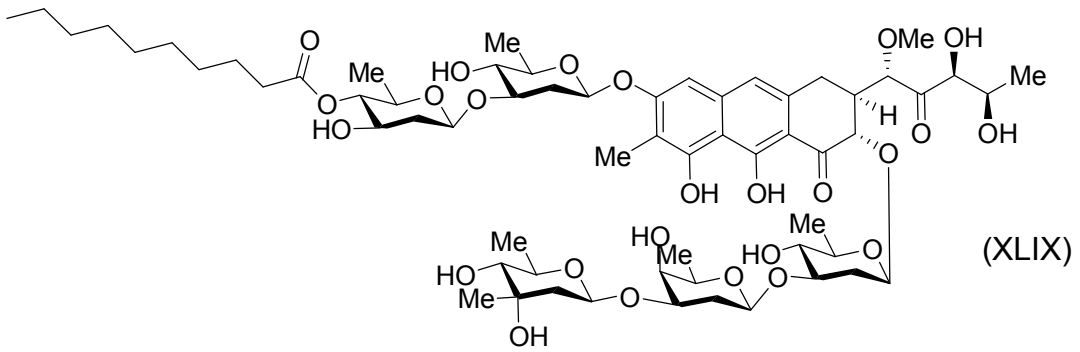
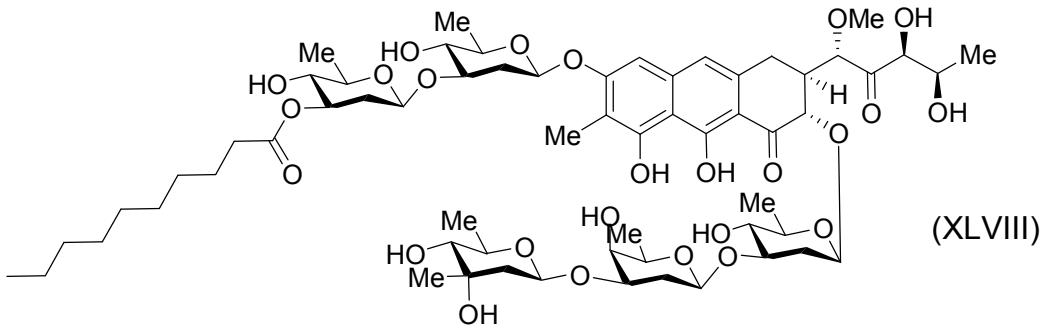
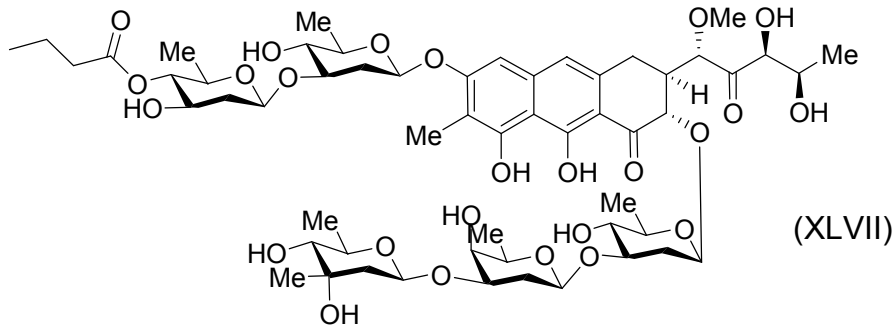
5



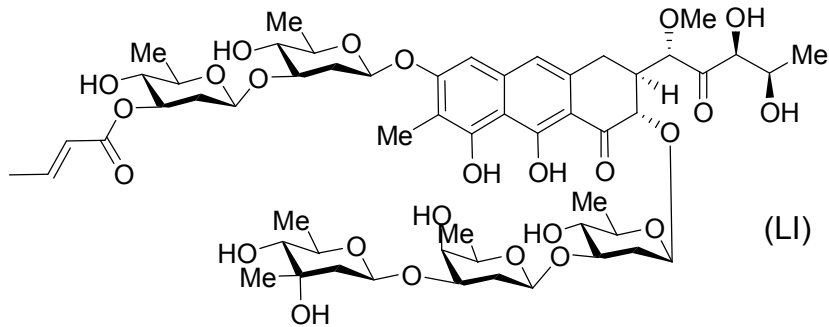


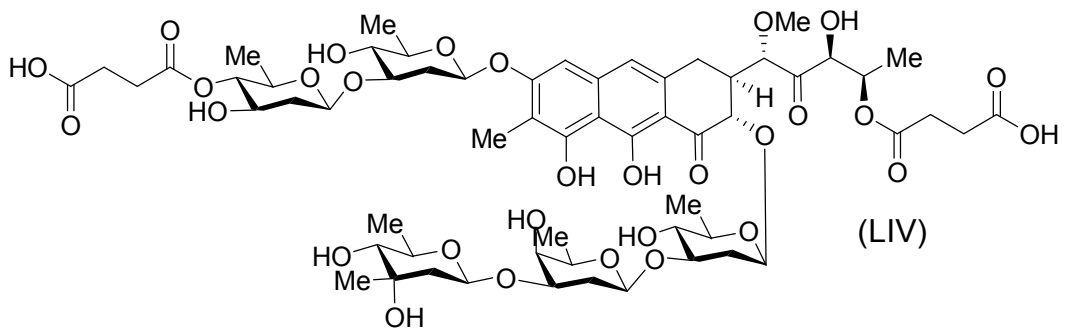
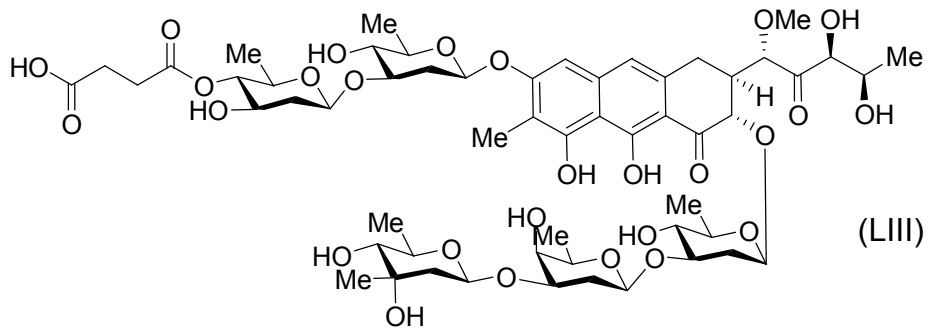
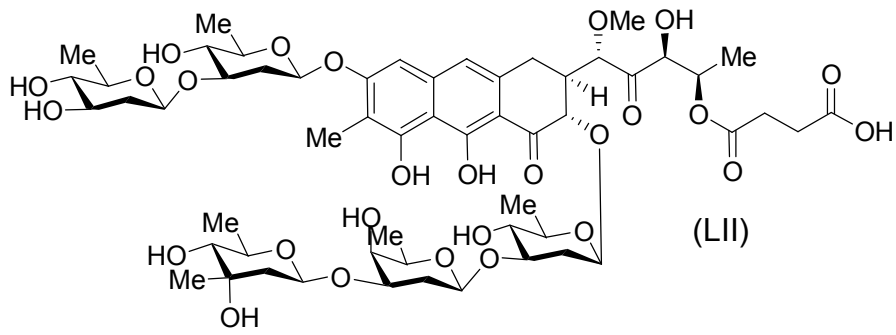
5



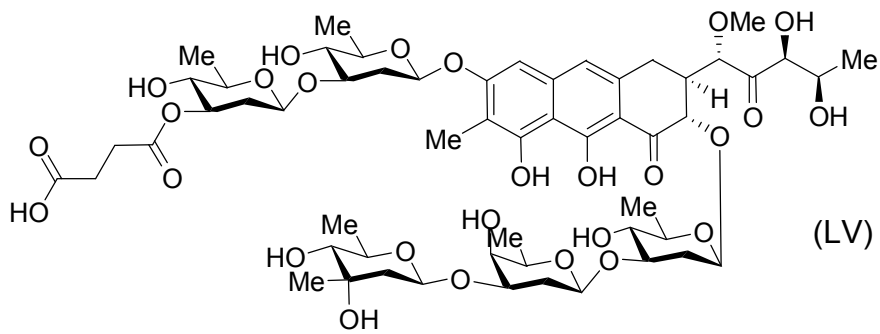


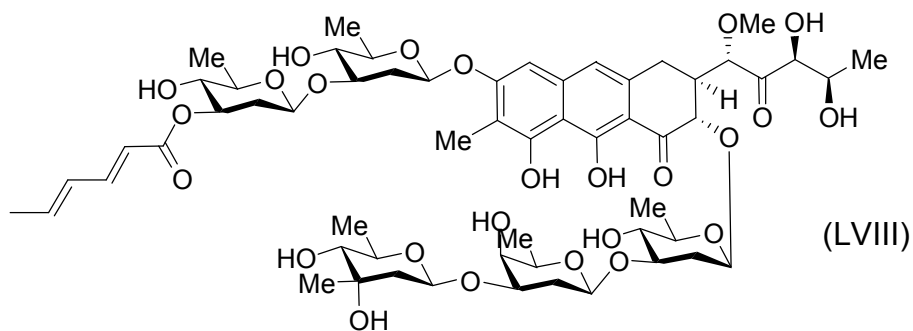
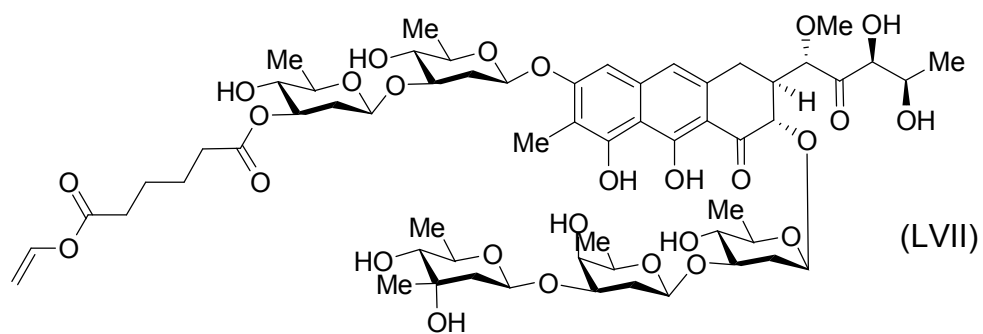
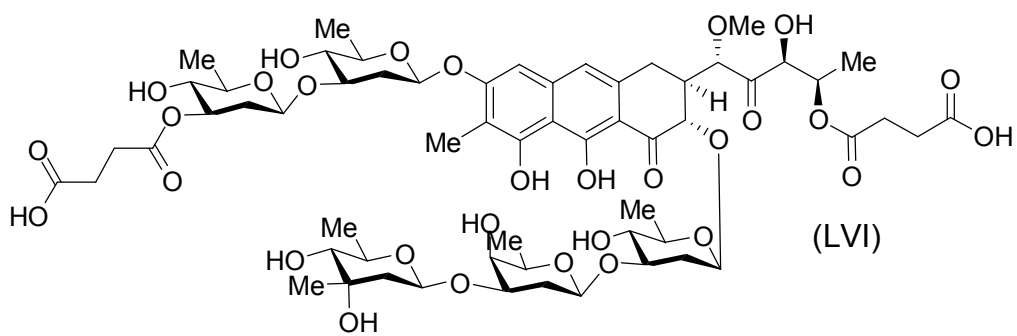
5



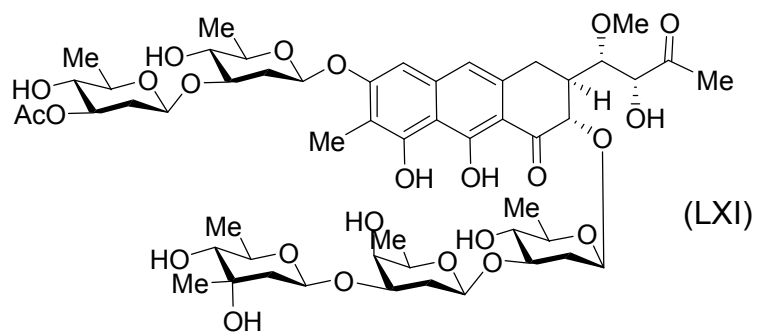


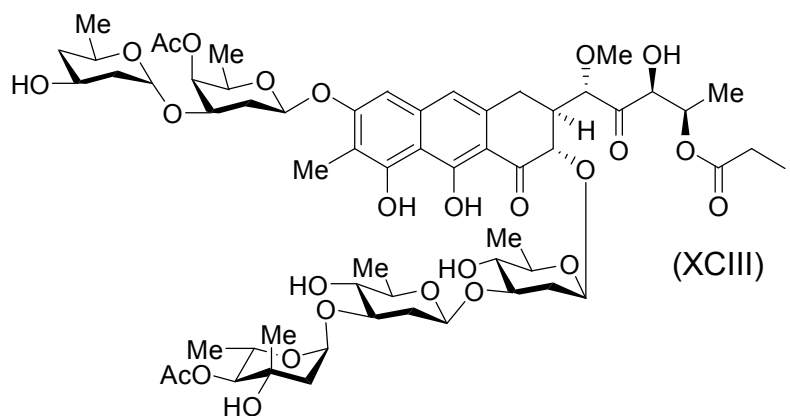
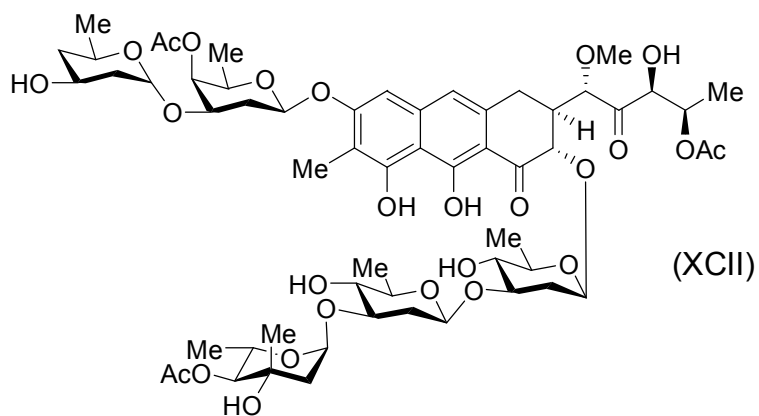
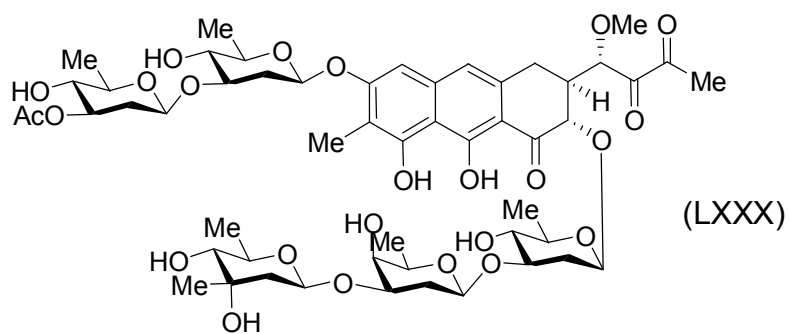
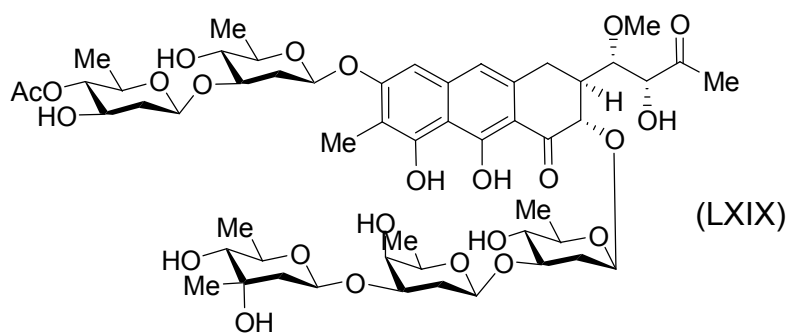
5

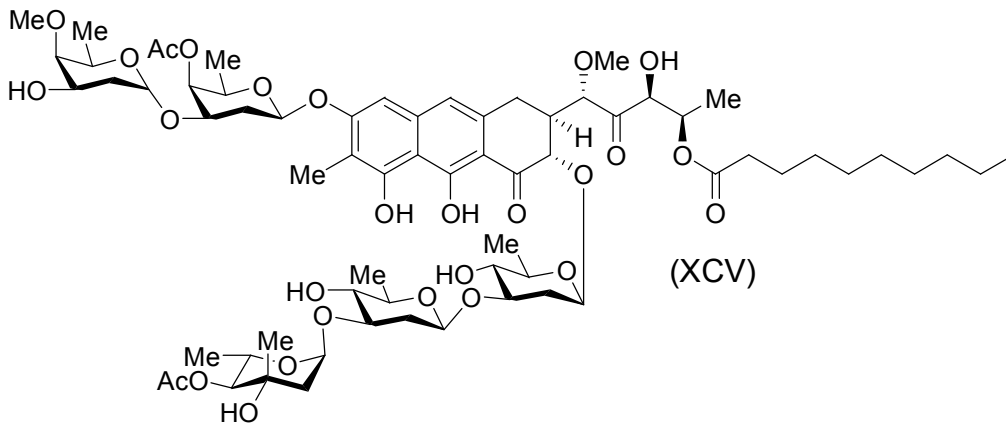
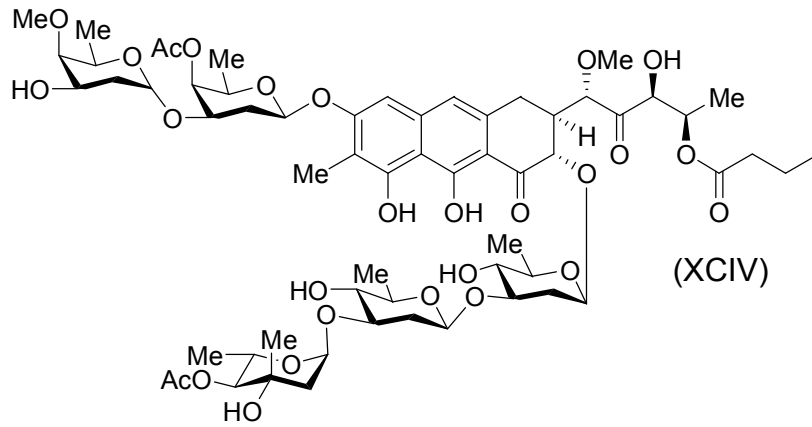




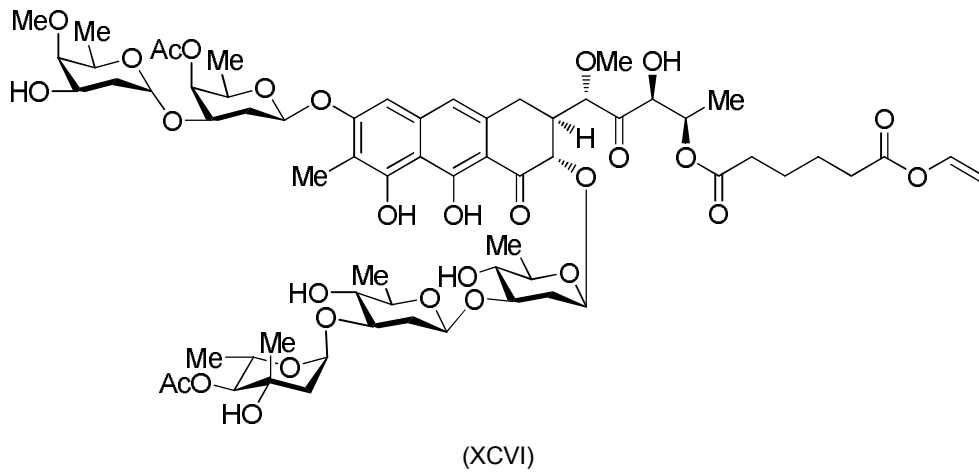
5







5



10

Los compuestos divulgados en la presente descripción son inhibidores del crecimiento de tumores y son por tanto útiles en el tratamiento del cáncer.

De esta forma, son objeto de la presente descripción 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.

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

Tal como es usado aquí, “inhibir” significa disminuir, hacer más lento, o detener. Por tanto, un compuesto de esta descripción 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 descripción 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.

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

Es también divulgado en la presente descripción 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.

- 25 Es también divulgado en la presente descripción 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.

Es también divulgado en la presente descripción 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.

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.

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 divulgado en la presente descripción 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.

5 Las dosis o cantidades de los compuestos divulgados en la presente descripción 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
10 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).

15 Es también divulgado en la presente descripción 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.

20 Es también divulgado en la presente descripción 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.

25 Es también divulgado en la presente descripción 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.

30 Es también divulgado en la presente descripción 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.

35 Es también divulgado en la presente descripción 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 hipercalciuria.

40 Es también divulgado en la presente descripción un método de tratamiento de un sujeto, incluyendo un ser humano, diagnosticado con hipercalciuria, 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 divulgado en la presente descripción el uso de un compuesto de fórmula (I) una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la manufacturación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Es también divulgado en la presente descripción 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 divulgados en la presente descripción 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 divulgados en la presente descripción 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 divulgados en la presente descripción puede ser preparado en forma de composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir diversos agentes transportadores, espesantes, diluentes, tamponantes, conservantes, tensoactivos, y otros, además del compuesto divulgado en la presente descripción. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también ingredientes activos tales como agentes antimicrobianos, antiinflamatorios, anestésicos, etc.

Los compuestos divulgados en la presente descripción 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 divulgado en la presente descripción 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 intradermal, 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 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

5

Ejemplo 1: Obtención de la cepa bacteriana *Streptomyces argillaceus* ΔAH-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.

15

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 µg/ml ampicilina, 25 µg/ml tiostreptona (en medio sólido), 5 µg/ml tiostreptona (en medio líquido) y 100 µg/ml higromicina.

25

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

1.1. Obtención de la cepa mutante *S. argillaceus* ΔAH-W

1.2. Introducción del plásmido pMP3*BII en la cepa *S. argillaceus* ΔAH-W

30

1.1. Obtención de la cepa mutante *S. argillaceus* ΔAH-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* ΔAH, 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* ΔAH 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* ΔAH y los

40

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).

5 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).

10 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*II (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.

20 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⁻.

30 Posteriores 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⁻

35 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 nucleosidildifosfato (NDP)-D-digitoxosa (*Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 6644-6652).

40 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).

5 Para la purificación de los nuevos derivados de MTM-SK, MTM-SDK y MTM-SA producidos por *S. argillaceus* ΔAH-W (pMP3*BII), se cultivó esta cepa en medio R5A sólido (*J. Bacteriol.* 1998, 180, 4929-4937) suplementado con tioestreptona (concentración final 25 μg/ml). De este modo, se sembraron uniformemente 150 placas de agar con esporas de la cepa recombinante ΔAH-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
 10 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 μm, 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 fracciones que contenían los compuestos de interés (fracciones del 70% al 100% metanol) fueron mezcladas y evaporadas en el rotavapor. Este extracto seco,
 20 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
 25 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).
 30

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
 35 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).

- 5 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 ¹³C, 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 1: RMN de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SK (fórmula VII). C₅₀H₇₂O₂₃

¹ H-RMN (acetona- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona- <i>d</i> ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto VII			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> 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 _{ec}	3.17 dd (15.7, 3.6)	29.7	CH ₂
4 _{ax}	3.00 (solapado)		
4a		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
8a		107.2	C
9		164.0	C
9a		107.9	C
10	6.92 (s)	116.5	CH
10a		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
1A	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)		
3A	3.78 ddd (12.0, 8.9, 5.0)	80.9	CH
4A	3.08 t (8.9)	75.0	CH
5A	3.55 (solapado)	72.3	CH
6A	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

Tabla 1 (continuación)

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, <i>J</i> en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
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
6C	1.33 d (6.4)	17.2	CH ₃
1D	4.70 dd (9.5 y 1.5)	99.8	CH
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
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
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
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			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
1		204.1	C
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 ancho (15.5)		
4a		135.5	C
5	6.90 (s)	100.9	CH
6		159.5	C
7		110.3	C
7-CH ₃	2.18 (s)	7.5	CH ₃
8		152.4	C

Tabla 2 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto VIII			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
8a		107.4	C
9		164.5	C
9a		107.9	C
10	6.90 (s)	116.3	CH
10a		138.5	C
1'	5.07 d (2.0)	79.6	CH
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
<hr/>			
1A	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)		
3A	3.78 ddd (12.0, 9.0, 4.9)	81.3	CH
4A	3.08 t (9.0)	74.9	CH
5A	3.58 (solapado)	72.2	CH
6A	1.34 d (6.1)	17.5	CH ₃
<hr/>			
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
5B	3.39 dc (8.9 y 5.9)	72.2	CH
6B	1.31 d (5.9)	17.2	CH ₃
<hr/>			
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
5C	3.31 dc (8.9, 5.6)	72.2	CH
6C	1.33 d (5.6)	17.5	CH ₃
<hr/>			
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
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
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
4 _{ec}	2.65 d ancho (16.3)		
4a		135.8	C
5	6.92 (s)	101.2	CH
6		159.6	C
7		110.2	C
7-CH ₃	2.15 (s)	7.5	CH ₃
8		154.0	C
8a		107.2	C
9		164.0	C
9a		108.2	C
10	6.92 (s)	116.4	CH
10a		138.6	C
1'	5.06 d (1.4)	79.7	CH
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
1A	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)		
3A	3.75 (solapado)	80.9	CH
4A	3.08 t (9.0)	75.0	CH
5A	3.54 dc (9.0, 6.1)	72.3	CH
6A	1.34 d (6.1)	17.8	CH ₃
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
6B	1.31 d (6.2)	17.2	CH ₃
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
C	1.32 d (6.2)	17.5	CH ₃

Tabla 3 (continuación)H-RMN (acetona-d₆, 600 MHz) y ¹³C-RMN (acetona-d₆, 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
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
6D	1.31 d (6.2)	16.1	CH ₃
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
6E	1.24 d (6.1)	14.7	CH ₃

Tabla 4: RMN de 3D-desmicarosil-MTM-SA (fórmula X). C₄₂H₅₈O₂₀¹H-RMN (piridina-d₅, 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)
4a	
5	6.95 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.50 (s)
8	
8a	
9	
9a	
10	6.44 (s)
10a	
1'	4.89 (s)
1'-OCH ₃	3.80 (s)
2'	
1A	5.54 d (9.5)
2A _{ax}	2.20 c ancho solapado parcialmente (11.4)
2A _{ec}	2.61 (solapado)
3A	4.15 (solapado)
4A	3.55 (solapado)

Tabla 4 (continuación)

¹ H-RMN (piridina-d ₅ , 600 MHz). Datos para el compuesto X	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)
5A	3.90 (solapado)
6A	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)
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). C₄₈H₆₈O₂₃

¹ H-RMN (piridina-d ₅ , 600 MHz). Datos para el compuesto XI	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> 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)
4a	
5	6.94 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.50 (s)
8	
8a	
9	
9a	

Tabla 5 (continuación)

¹ H-RMN (piridina-d ₅ , 600 MHz). Datos para el compuesto XI	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)
10	6.42 (s)
10a	
1'	4.91 (s)
1'-OCH ₃	3.81 (s)
2'	
1A	5.53 d ancho (7.8)
2A _{ax}	2.16 c ancho (10.4)
2A _{ec}	2.61 (solapado)
3A	4.12 (solapado)
4A	3.55 (solapado)
5A	3.87 dc (9.0, 6.2)
6A	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)
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.

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)		
4a		136.4	C
5	6.93 (s)	101.4	CH
6		159.6	C
7		110.4	C
7-CH ₃	2.17 (s)	7.5	CH ₃
8		152.0	C
8a		107.0	C
9		164.2	C
9a		107.5	C
10	6.90 (s)	116.7	CH
10a		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
3'	4.30 (solapado)	78.8	CH
4'	4.30 (solapado)	68.0	CH
5'	1.30 (solapado)	19.2	CH ₃
1A	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)		
3A	3.80 (solapado)	80.9	CH
4A	3.08 t (8.7)	75.0	CH
5A	3.55 dc (9.1, 6.1)	72.2	CH
6A	1.30 (solapado)	17.2	CH ₃
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
5B	3.39 dc (9.2, 6.2)	72.2	CH
6B	1.30 (solapado)	17.5	CH ₃
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
6C	1.30 (solapado)	17.6	CH ₃

Tabla 6 (continuación)

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
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
6D	1.30 (solapado)	16.1	CH ₃
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
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).

10 **Tabla 7:** RMN de 4D-acetil-MTM-SK (fórmula XIV) $C_{53}H_{76}O_{24}$

1H -RMN (acetona- d_6 , 600 MHz) y ^{13}C -RMN (acetona- d_6 , 150 MHz). Datos para el compuesto XIV			
Posición	1H -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 (14.3)	29.6	CH ₂
4 _{ec}	3.00 (solapado)		
4a		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
8a		107.8	C
9		165.3	C
9a		108.3	C
10	6.92 (s)	116.6	CH
10a		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
<hr/>			
1A	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)		
3A	3.80 ddd (12.1, 8.8, 5.2)	80.9	CH
4A	3.09 t (8.8)	75.0	CH
5A	3.60 (solapado)	72.3 (solapado)	CH
6A	1.34 d (solapado)	17.8	CH ₃
<hr/>			
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
4B	3.01 t (8.9)	77.2	CH
5B	3.40 dc (9.0 y 6.2)	72.3 (solapado)	CH
6B	1.31 d (6.1)	17.5	CH ₃

Tabla 7 (continuación)

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
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
4C	3.05 t (8.9)	75.3	CH
5C	3.75 (señal no resuelta)	72.3 (solapado)	CH
6C	1.34 (solapado)	17.6	CH ₃
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
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
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
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
4E-OH	3.89 d (7.7)		
5E	3.60 (solapado)	72.3	CH
6E	1.22 d (6.2)	17.2	CH ₃

Ejemplo 5: Bioconversión de 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM utilizando la cepa *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* C10GIV.

- 5 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
- 10 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)
- 15 (*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-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.

5 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 (10x250mm, 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.

15 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.

25 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.

5 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
10 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.

15 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 correspondiente. 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
20 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
25 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.

30 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).

40

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)		
4a		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
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
<hr/>			
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
6A	1.32 (solapado)	17.9	CH ₃
<hr/>			
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
6B	1.32 (solapado)	17.5	CH ₃
<hr/>			
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

Tabla 8 (continuación)

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, <i>J</i> en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	multiplicidad
4C	3.00 (solapado)	75.2	CH
5C	3.30 (señal no resuelta)	72.3	CH
6C	1.32 (solapado)	17.6	CH ₃
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
6D	1.32 (solapado)	16.1	CH ₃
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
5E	3.66 dc (9.0, 6.0)	70.6	CH
6E	1.24 d (6.0)	17.2	CH ₃

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

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, <i>J</i> 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

Tabla 9 (continuación)

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'-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
5C	3.34 dc (9.1, 6.1)	72.2	CH
6C	1.32 (solapado)	17.6	CH ₃
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
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
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
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

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
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
6A	1.32 (solapado)	17.9	CH ₃
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
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

Tabla 10 (continuación)

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
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
5C	3.30 dc (9.1, 6.1)	72.2	CH
6C	1.32 (solapado)	17.6	CH ₃
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
5D	3.70 (solapado)	70.6	CH
6D	1.32 (solapado)	16.1	CH ₃
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
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

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

5 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.

10 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).

15 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.

20 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).

20

Tabla 11: RMN de 4'-decanoil-MTM (fórmula XXXIV)

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)
4a	
5	6.88 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.15 (s)
8	
8a	
9	
9a	
10	6.91 (s)
10a	
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	

Tabla 11 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto XXXIV	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
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)
1A	5.40 d ancho (9.2)
2A _{ax}	1.90 (solapado)
2A _{ec}	2.46 (12.0, 5.1, 1.9)
3A	3.78 (solapado)
4A	3.15 t (9.0)
5A	3.53 dc (9.0, 6.1)
6A	1.30 (solapado)
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)
6B	1.30 (solapado)
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)
6C	1.30 (solapado)
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)
6D	1.30 (solapado)
1E	5.00 d ancho (9.4)
2E _{ax}	1.55 (solapado)
2E _{ec}	1.90 (solapado)
3E	

Tabla 11 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto XXXIV	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)
3E-CH ₃	1.25 (s)
4E	3.00 (solapado)
5E	3.70 (solapado)
6E	1.30 (solapado)

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

5 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).

10 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).

15 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).

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, <i>J</i> en Hz)
1	
2	4.70 (solapado)
3	2.80 (solapado)
4 _{ax}	3.10 (solapado)
4 _{ec}	3.00 (solapado)
4a	
5	6.33 (s ancho)
6	
7	
7-CH ₃	2.15 (s)
8	
8a	
9	
9a	
10	6.63 (s ancho)
10a	
1'	4.85 (s ancho)
1'-OCH ₃	3.32 (s)
2'	
3'	4.61 dd (6.5, 2.0) acoplado con OH

Tabla 12 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto XXXVI	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
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)
1A	5.39 d ancho (9.4)
2A _{ax}	1.92 (solapado)
2A _{ec}	2.48 (12.0, 5.0, 1.9)
3A	3.80 br señal no resuelta (solapado)
4A	3.09 t (8.8)
5A	3.54 dc (8.8, 6.1)
6A	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)
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).

- 5 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-eniloxicarbonil)-mitramicina (fórmula XXXVIII) en lugar del esperado 3B-aliloxicarbonilmitramicina. La formación de este producto puede ser consecuencia de
- 10 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).

- 15 **Tabla 13:** RMN de 3B-(prop-2-eniloxicarbonil)-MTM (fórmula XXXVIII)

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)
4a	
5	6.90 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.10 (s)
8	
8a	
9	
9a	
10	6.90 (s)
10a	
1'	4.85 (solapado)
1'-OCH ₃	3.46 (s)
2'	
3'	4.30 (solapado)
4'	4.30 (solapado)
5'	1.32 (solapado)
1A	5.40 d ancho (señal no resuelta)
2Aax	1.90 (solapado)
2Aec	2.50 d ancho (señal no resuelta)
3A	3.85 (solapado)
4A	3.08 t (8.7)

Tabla 13 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto XXXVIII	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)
5A	3.55 (solapado)
6A	1.32 (solapado)
1B	4.85 (solapado)
2B _{ax}	1.60 (solapado)
2B _{ec}	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)
5B	3.55 (solapado)
6B	1.32 (solapado)
1C	5.14 d ancho (9.1)
2C _{ax}	1.60 (solapado)
2C _{ec}	2.55 ddd (12.0, 5.0, 1.8)
3C	3.70 (solapado)
4C	3.00 (solapado)
5C	3.30 (solapado)
6C	1.32 (solapado)
1D	4.70 d ancho (9.2)
2D _{ax}	1.75 ddd (12.0, 12.0, 10.0)
2D _{ec}	1.85 (señal no resuelta)
3D	3.90 (solapado con OH)
4D	3.75 s ancho
5D	3.70 (solapado)
6D	1.32 (solapado)
1E	4.98 dd (9.6, 2.0)
2E _{ax}	1.60 (solapado)
2E _{ec}	1.90 (solapado)
3E	
3E-CH ₃	1.24 (s)
4E	3.00 (solapado)
5E	3.67 dc (9.0, 6.1)
6E	1.25 d (6.4)

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).

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).

5 **Ejemplo 8: Acetilación enzimática de 4'-Benzoil-MTM catalizada por CAL-B y empleando acetato de vinilo como agente acilante.**

10 La acetilación enzimática de la 4'-benzoil-MTM se llevó a cabo de forma análoga a como se ha expuesto en el **Ejemplo 1** 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'-benzoilmitramicina (fórmula XLI).

15 **Ejemplo 9: Acilación enzimática de MTM catalizada por CAL-A empleando diferentes agentes acilantes.**

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**.

20 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).

30 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).

35 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.

40 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.

5 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.

10 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).

15

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).

20 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).

25 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-

30 (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.

35 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 empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético en agua (55:45) a un flujo de 20

40 ml/min. Una vez aislado se identificó el nuevo compuesto como 3B-(5-viniloxicarbonil)-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).

5 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 nuevo compuestos (**FIGURA 33**) con tiempos de retención de 3.13 y 4.36 minutos (fórmulas LIX y LX, respectivamente).

10

Ejemplo 10: 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**.

15

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).

20

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).

25

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 _{ec}	3.17 dd (16.4, 3.1)
4 _{ax}	3.00 (solapado)
4a	
5	6.92 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.16 (s)
8	
8a	
9	
9a	
10	6.92 (s)
10a	

Tabla 14 (continuación)¹H-RMN (acetona-d₆, 600 MHz). Datos para el compuesto LXI

Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)
1'	4.25 d ancho, solapado parcialmente (3.2)
1'-OCH ₃	3.56 (s)
2'	4.32 d solapado parcialmente (3.2)
3'	
4'	2.34 (s)
1A	5.44 d (8.9)
2A _{ax}	1.90 (solapado)
2A _{ec}	2.50 (solapado)
3A	3.84 ddd (11.8, 8.9, 5.2)
4A	3.10 t (8.9)
5A	3.59 dc (8.9, 6.1)
6A	1.32 d (solapado)
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)
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)
5B	3.53 dc (9.1 y 6.1)
6B	1.32 d (solapado)
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)
5C	3.33 dc (8.9 y 6.3)
6C	1.32 d (solapado)
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)
5D	3.74 s ancho
6D	1.32 d (solapado)
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)
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).

5 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).

10 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).

15 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).

Ejemplo 11: Acilación enzimática de MTM-SK catalizada por CAL-A empleando diferentes agentes acilantes.

20 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**.

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

30 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).

35 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).

40 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).

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).

- 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 75%. Por HPLC se identificó un nuevo compuesto (**FIGURA 44**) con un tiempo de retención de 5.41 minutos (fórmula LXXVI).

- 10 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).

Ejemplo 12: Acilación enzimática de MTM-SDK catalizada por CAL-B empleando diferentes agentes acilantes.

- 15 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**.
- 20 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).
- 25 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).

Tabla 15: RMN de 3B-acetil-MTM-SDK (fórmula LXXX)

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)
4a	
5	6.87 (s)
6	
7	
7-CH ₃	2.10 (s)
8	
8a	
9	

Tabla 15 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz). Datos para el compuesto LXXX	
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)
9a	
10	6.87 (s)
10a	
1'	5.06 s ancho
1'-OCH ₃	3.45 (s)
2'	
3'	
4'	2.37 (s)
1A	5.40 d (9.1)
2A _{ax}	1.90 (solapado)
2A _{ec}	2.50 dd (12.0, 5.0)
3A	3.83 ddd (11.9, 8.9, 5.0)
4A	3.09 t (8.8)
5A	3.55 dc solapado parcialmente (8.9, 6.2)
6A	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)
6B	1.32 d (solapado)
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)
5C	3.30 (señal no resuelta)
6C	1.32 d (solapado)
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)
5D	3.74 s ancho
6D	1.32 d (solapado)
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)
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)

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).

- 5 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).

- 10 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).

- 15 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.

- 20 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**.

- 25 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)

- 30 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).

- 35 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).

- 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).

- 40 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: 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**.

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)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 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
1A	5.47 d ancho (9.5)	97.1	CH
2A _{ax}	2.10 (solapado)	32.9	CH ₂

Tabla 16 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XCII			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
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
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
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
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
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
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
5E	4.11 dc (10.0, 6.2)	65.7	CH
6E	1.12 d (6.2)	16.6	CH ₃

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).

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).

5

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'-propanoil-CRM (fórmula XCIII)

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, J 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 _{ec}	2.55 (solapado)	26.9	CH ₂
4 _{ax}	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
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

Tabla 17 (Continuación)

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, J en Hz)	¹³ C-RMN (δ en ppm)	Multiplicidad
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
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
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
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
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
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
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
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
5E	4.11 dc (9.8, 6.0)	65.7	CH
6E	1.12 d (6.0)	16.5	CH ₃

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).

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).

Tabla 18: RMN de 4'-decanoil-CRM (fórmula XCV)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XCV			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	δ ¹³ C (ppm)	multiplicidad
1		203.5	
2	4.82 d (11.6)	76.8	
3	2.85 m (señal no resuelta)	41.8	
4 _{ax}	3.05 (solapado)	26.8	
4 _{ec}	2.55 dd (16.0, 3.5)		
4a		135.8	
5	6.85 (s)	101.3	
6		159.6	
7		110.7	
7-CH ₃	2.17 (s)	7.5	
8		155.8	
8a		108.1	
9		164.9	
9a		107.6	
10	6.95 (s)	117.0	
10a		138.7	
1'	4.92 d (1.3)	81.1	
1'-OCH ₃	3.54 (s)	61.0	
2'		209.7	
3'	4.45 s ancho	76.5	
4'	5.30 dc (6.0, 2.7)	70.6	
5'	1.34 d (6.0)	15.3	
6'		172.0	C
7'	2.29 t (7.4)	33.9	CH ₂
8'	1.60 (solapado)	24.7	CH ₂
9'	1.20 (solapado)	29.2	CH ₂
10'	1.20 (solapado)	29.4	CH ₂
11'	1.20 (solapado)	29.6	CH ₂
12'	1.20 (solapado)	29.4	CH ₂
13'	1.20 (solapado)	31.7	CH ₂
14'	1.20 (solapado)	22.4	CH ₂
15'	0.89 t (7.3)	13.5	CH ₃
1A	5.50 dd (9.6, 2.2)	97.1	CH
2A _{ax}	2.05 (solapado)	32.9	CH ₂
2A _{ec}	2.15 (solapado)		
3A	4.15 ddd (12.2, 4.8, 2.8)	79.7	CH
4A	5.22 d (2.8)	67.5	CH
4A-CH ₃	2.15 (s)	19.9	CH ₃
4A-CO		169.9	C
5A	3.91 c ancho (6.6)	69.5	CH
6A	1.20 d (6.6)	16.1	CH ₃
1B	5.06 d ancho (3.2)	95.0	CH
2B _{ax}	1.60 (solapado)	33.1	CH ₂

Tabla 18 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XCV			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	δ ¹³ C (ppm)	multiplicidad
2B _{ec}	1.90 dt (11.9, 3.2)		
3B	3.98 ddd (11.9, 4.4, 2.9)	66.1	CH
4B	3.22 s ancho	81.6	CH
4B-OCH ₃	3.40 (s)	58.0	CH ₃
5B	4.05 c ancho (6.4)	67.0	CH
6B	1.21 d (6.4)	17.2	CH ₃
1C	5.11 dd (9.7, 1.7)	100.5	CH
2C _{ax}	1.70 m (señal no resuelta)	37.4	CH ₂
2C _{ec}	2.56 ddd (11.3, 5.2, 1.7)		
3C	3.72 (solapado con 3D)	81.6	CH
4C	3.04 t solapado parcialmente (9.0)	75.3	CH
5C	3.33 dc (9.0, 6.2)	72.1	CH
6C	1.30 d (6.2)	17.5	CH ₃
1D	4.81 d (9.8)	99.4	CH
2D _{ax}	1.50 (solapado)	36.5	CH ₂
2D _{ec}	2.41 ddd (12.4, 5.0, 1.8)		
3D	3.72 (solapado con 3C)	76.2	CH
4D	3.13 t (9.0)	74.9	CH
5D	3.47 dc (9.0, 6.3)	72.4	CH
6D	1.33 d (6.3)	17.6	CH ₃
1E	5.09 dd (4.0, 1.5)	94.5	CH
2E _{ax}	1.95 dd (12.0, 4.0)	43.9	CH ₂
2E _{ec}	2.00 dd (12.0, 1.5)		
3E		69.5	C
3E-CH ₃	1.43 (s)	22.7	CH ₃
4E	4.68 d (9.7)	79.3	CH
4E-CH ₃	2.07 (s)	20.1	CH ₃
4E-CO		170.2	C
5E	4.11 dc (9.8, 6.4)	65.7	CH
6E	1.12 d (6.4)	16.6	CH ₃

Para el caso particular de emplear adipato 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 60**) 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'-(5-viniloxicarbonil)-pentanoilcromomicina (fórmula XCVI).

La elucidación estructural definitiva de los nuevos derivados se realizó mediante RMN. La tabla 19 muestra los datos obtenidos para el compuesto de fórmula (XCVI).

Tabla 19: RMN de 4'-adipoil-CRM (fórmula XCVI)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XCVI			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, <i>J</i> en Hz)	δ ¹³ C (ppm)	multiplicidad
1		200.5	C
2	4.80 (solapado)	76.4	CH
3	2.80 (solapado)	41.8	CH
4 _{ax}	3.00 (solapado)	26.9	CH ₂
4 _{ec}	2.50 (solapado con 2C _{ec})		
4a		138.6	C
5	6.88 (s)	101.6	CH
6		159.5	C
7		110.6	C
7-CH ₃	2.17 (s)	7.5	CH ₃
8		155.0	C
8a		108.1	C
9		165.0	C
9a		107.8	C
10	6.92 (s)	117.0	CH
10a		141.2	C
1'	4.90 (s)	81.2	CH
1'-OCH ₃	3.54 (s)	61.0	CH ₃
2'		209.6	C
3'	4.45 s ancho	76.2	CH
4'	5.35 m (señal no resuelta)	70.6	CH
5'	1.30 (solapado)	15.3	CH ₃
6'		171.8	C
7'	2.40 m (solapado)	33.4	CH ₂
8'	1.50 (solapado)	24.1	CH ₂
9'	1.50 (solapado)	24.0	CH ₂
10'	2.40 m (solapado)	33.3	CH ₂
11'		179.8	C
12'	7.25 dd (14.0, 6.3)	141.3	CH
13' (Z)	4.55 dd (6.3, 1.5)	96.8	CH ₂
13' (E)	4.85 dd (14.0, 1.5)		
1A	5.50 d (8.9)	97.1	CH
2A _{ax}	2.05 (solapado)	32.9	CH ₂
2A _{ec}	2.15 (solapado)		
3A	4.15 (solapado)	69.8	CH
4A	5.20 (s)	67.6	CH
4A-CH ₃	2.15 (s)	19.9	CH ₃
4A-CO		170.0	C
5A	4.05 c (6.3)	69.4	CH
6A	1.32 d (solapado)	16.1	CH ₃
1B	5.05 m (señal no resuelta)	95.0	CH
2B _{ax}	1.60 (solapado)	33.1	CH ₂
2B _{ec}	1.80 m (señal no resuelta)		

Tabla 19 (continuación)

¹ H-RMN (acetona-d ₆ , 600 MHz) y ¹³ C-RMN (acetona-d ₆ , 150 MHz). Datos para el compuesto XCVI			
Posición	¹ H-RMN (δ en ppm, multiplicidad, J en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	multiplicidad
3B	4.00 m (señal no resuelta)	66.1	CH
4B	3.20 s ancho	81.6	CH
4B-OCH ₃	3.40 (s)	58.1	CH ₃
5B	4.00 m (solapado)	67.0	CH
6B	1.20 d (solapado)	17.2	CH ₃
<hr/>			
1C	5.12 d (9.1)	100.5	CH
2C _{ax}	1.70 (solapado)	37.4	CH ₂
2C _{ec}	2.50 (solapado con 4 _{ec})		
3C	3.70 (solapado con 3D)	81.6	CH
4C	3.00 (solapado con 4 _{ax})	75.3	CH
5C	3.30 m (señal no resuelta)	72.1	CH
6C	1.35 d (solapado)	17.4	CH ₃
<hr/>			
1D	4.80 (solapado)	99.4	CH
2D _{ax}	1.50 (solapado)	36.5	CH ₂
2D _{ec}	2.35 m (señal no resuelta)		
3D	3.70 (solapado con 3C)	76.2	CH
4D	3.10 m (solapado)	74.9	CH
5D	3.40 m (señal no resuelta)	72.4	CH
6D	1.35 d (solapado)	17.6	CH ₃
<hr/>			
1E	5.10 (solapado)	94.5	CH
2E _{ax}	1.95 (solapado)	43.9	CH ₂
2E _{ec}	2.00 (solapado)		
3E		69.5	C
3E-CH ₃	1.44 (s)	22.7	CH ₃
4E	4.68 d (9.7)	79.3	CH
4E-CH ₃	2.10 (s)	20.1	CH ₃
4E-CO		170.2	C
5E	4.15 (solapado)	65.7	CH
6E	1.12 d (6.0)	16.5	CH ₃

Ejemplo 15: 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).

5 Cultivo Celular

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

Ensayo de proliferación celular

5 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-

10 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 20.

20 **Tabla 20:** 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.

25

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

5

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-β-D-digitoxosil-MTM-SK [fórmula (VII)]; 3 = MTM-SK; 4 = desmicarosil-3D-MTM-SDK [fórmula (VIII)]; 5 = 3D-desmicarosil-3D-β-D-digitoxosil-MTM-SDK [fórmula (IX)]; 6 = MTM-SDK.

10

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-β-D-digitoxosil-MTM-SA [fórmula (XI)]; 3 = MTM-SA.

5

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)].

10

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

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

15

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

20

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)].

25

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)].

30

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)].

35

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)].

40

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)].
- 5 **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)].
- 10 **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)].
- 15 **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.
- 20 **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)].
- 25 **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.
- 30 **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)].
- 35 **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)].
- 40 **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)].
- 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.

- 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.
- 5 **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.
- 10 **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.
- 10 **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.
- 15 **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.
- 20 **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.
- 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.
- 25 **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.
- 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.
- 30 **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.
- 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.
- 35 **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.
- 40 **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.

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)].

5 **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)].

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)].

10 **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)].

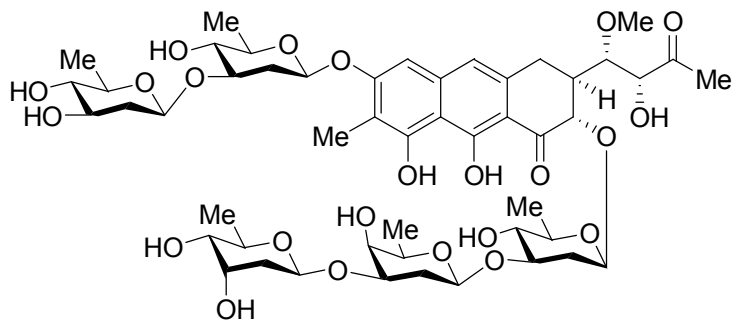
FIGURA 60: Análisis por HPLC de la acilación enzimática de CRM con adipato de vinilo catalizada por CAL-B. Identificador de los picos: 1 = CRM; 2 = 4'-adipoil-CRM [fórmula (XCVI)].

15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto caracterizado por la fórmula VII:

5



10 2. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del cáncer, de la enfermedad de Paget, de enfermedades neurológicas, de la hipercalcemia o de la hipercalcemia.

15 3. Composición farmacéutica caracterizada por comprender un compuesto según la reivindicación 1 y sales farmacéuticamente aceptables.

20 4. 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.

5. Cepa bacteriana de la reivindicación 4, 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.

25 6. Procedimiento para obtener la cepa bacteriana de las reivindicaciones 4 ó 5, 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.

30 7. Procedimiento para la obtención de un derivado de ácido aureólico según la reivindicación 1 que comprende:
a. Incubación de una cepa bacteriana de las reivindicaciones 4 ó 5 en un medio de cultivo apropiado; y
b. Aislamiento del derivado de ácido aureólico de la reivindicación 1 del caldo de cultivo.

8. Procedimiento para la obtención de derivados acilados del derivado de ácido aureólico de la reivindicación 1, que comprende

35 a. Incubación de la cepa bacteriana *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* C10GIV en presencia del ácido aureólico según la reivindicación 1; y
b. Aislamiento de derivados de ácido aureólico según la reivindicación 1 del caldo de cultivo.

9. Procedimiento para la obtención de derivados acilados del ácido aureólico de la reivindicación 1, que comprende reaccionar el ácido aureólico según la reivindicación 1 con un agente acilante en presencia de una hidrolasa.

5 10. Procedimiento, de la reivindicación 9, donde la enzima es una lipasa, preferiblemente la fracción A o B de la lipasa *Candida antarctica*.

11. Procedimiento, de cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, donde la enzima está inmovilizada sobre un soporte, preferiblemente sobre una resina epoxiacrílica activada con grupos deca-octilo cuando la enzima es una lipasa.

10 12. Procedimiento, de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el agente acilante es un éster, anhídrido o carbonato.

15 13. Procedimiento, de la reivindicación 12, 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.

20 14. Procedimiento, de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde la reacción se realiza empleando como disolvente el propio agente acilante.

15. Procedimiento, de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, 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

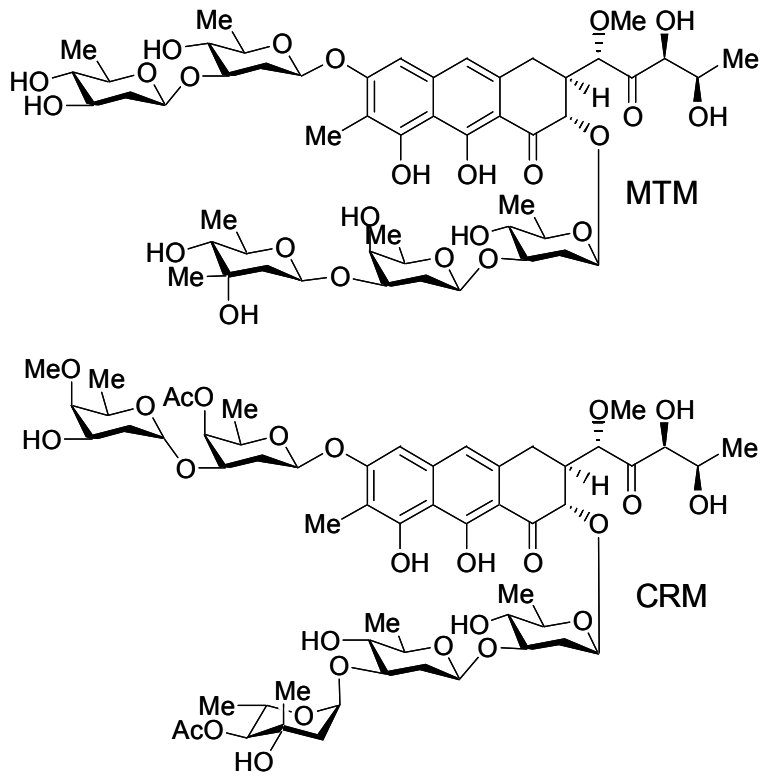


FIG. 2

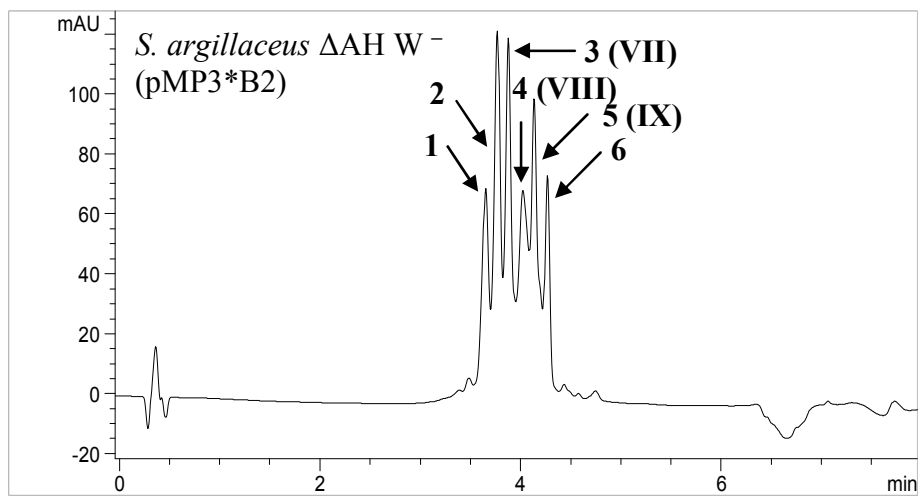


FIG.3

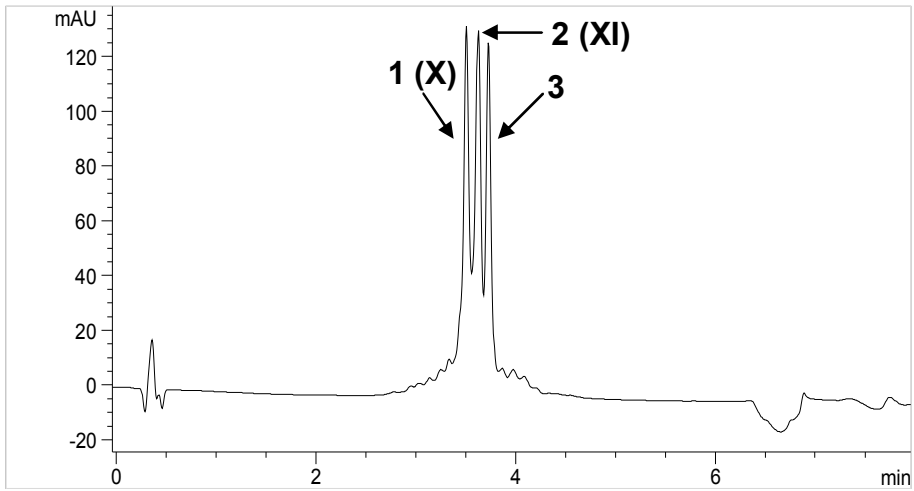


FIG.4

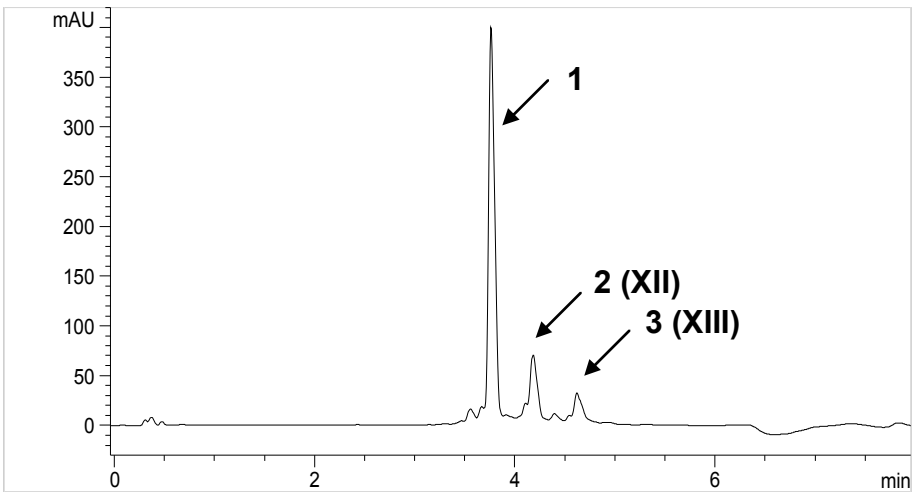


FIG.5

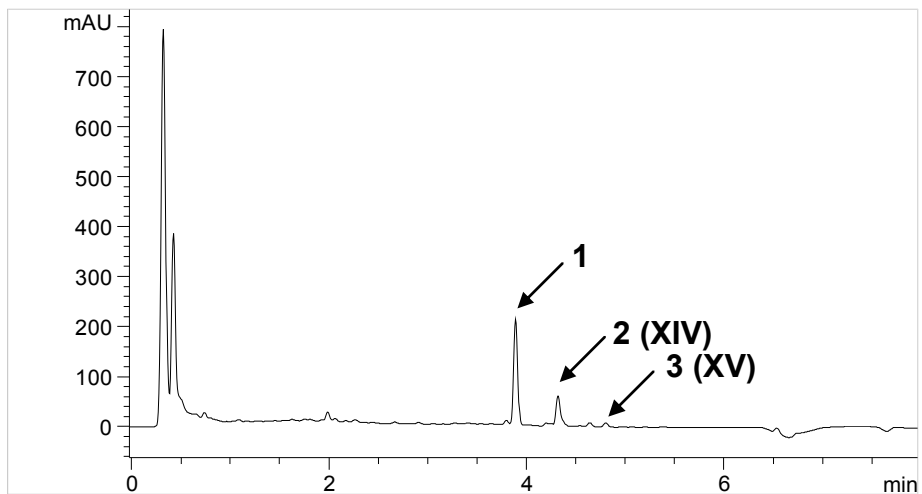


FIG.6

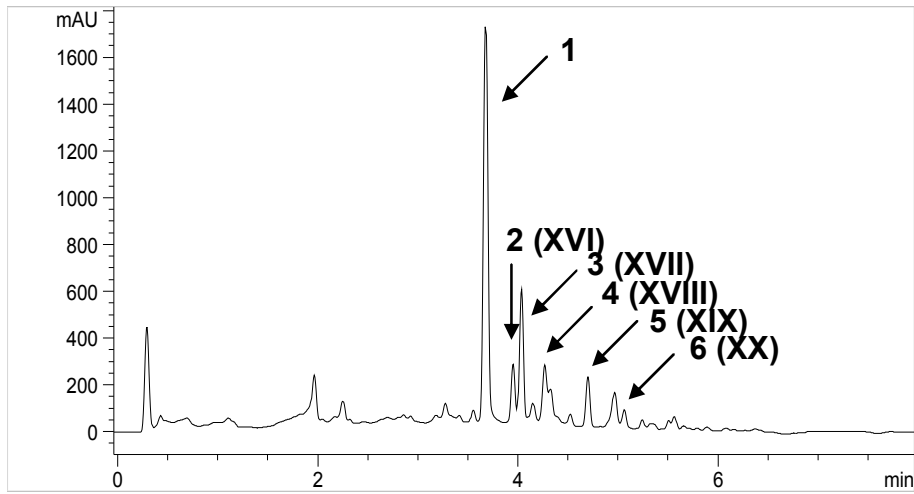


FIG.7

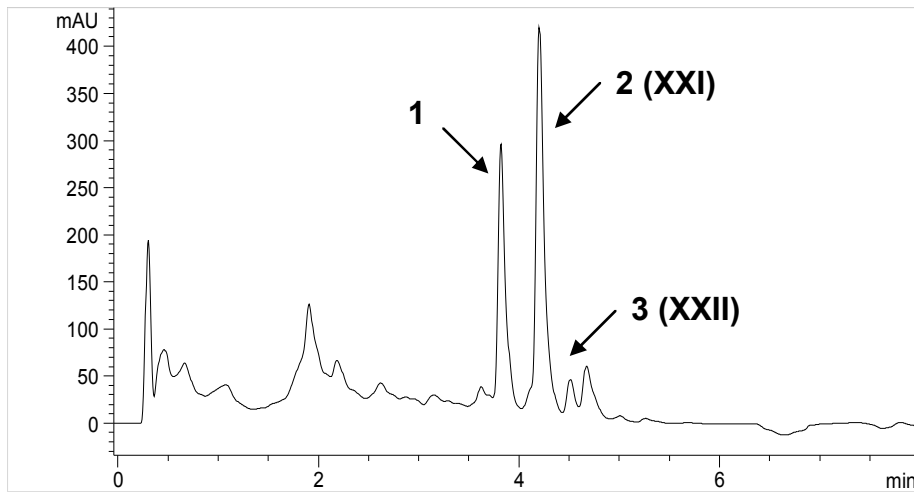


FIG.8

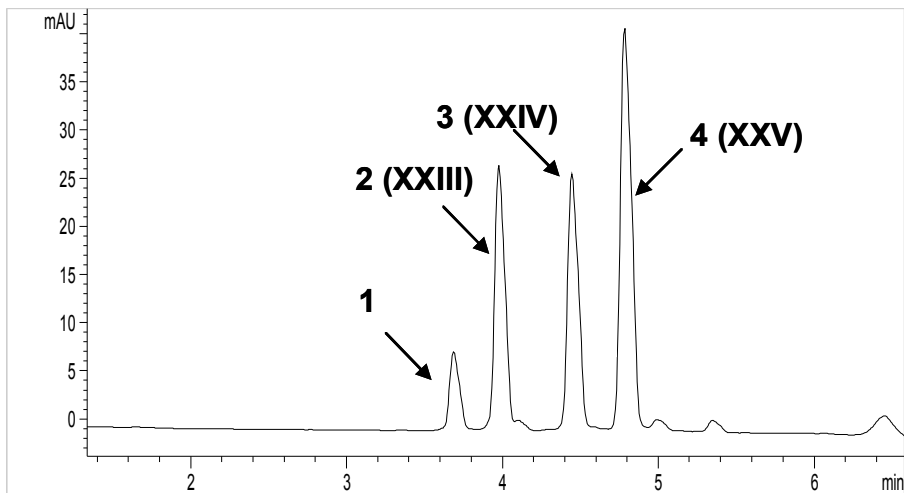


FIG. 9

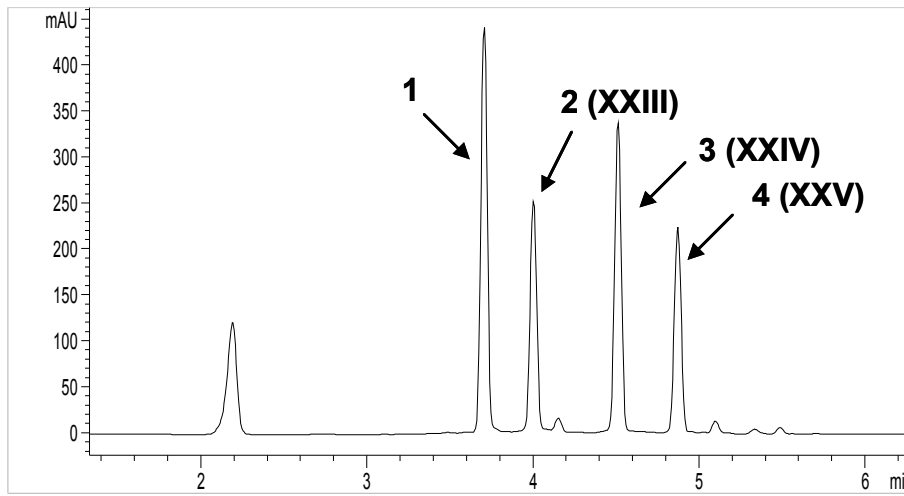


FIG. 10

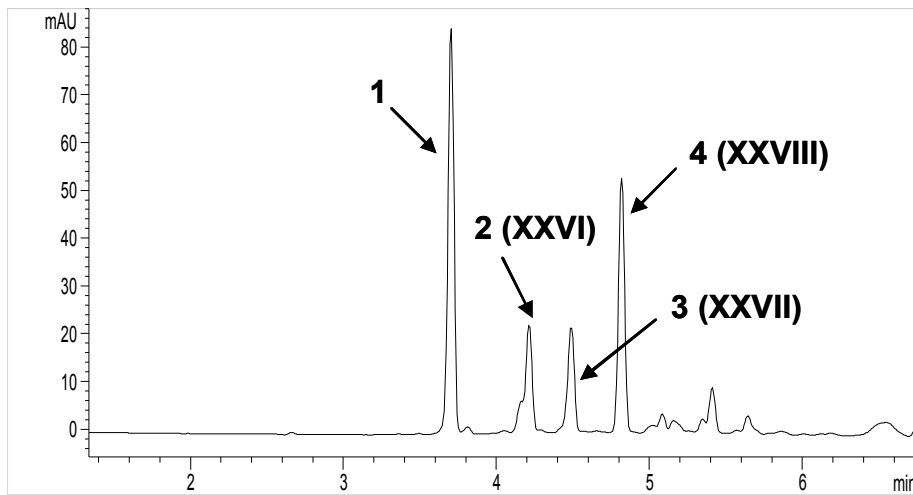


FIG. 11

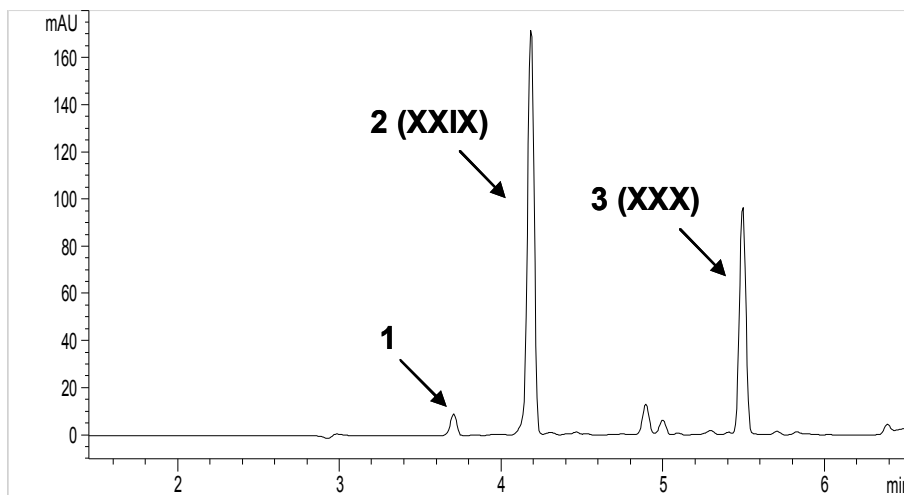


FIG. 12

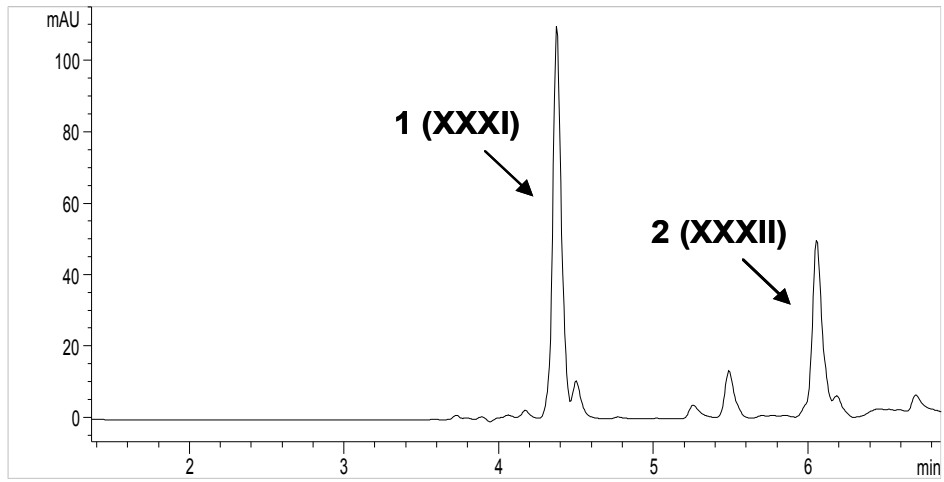


FIG. 13

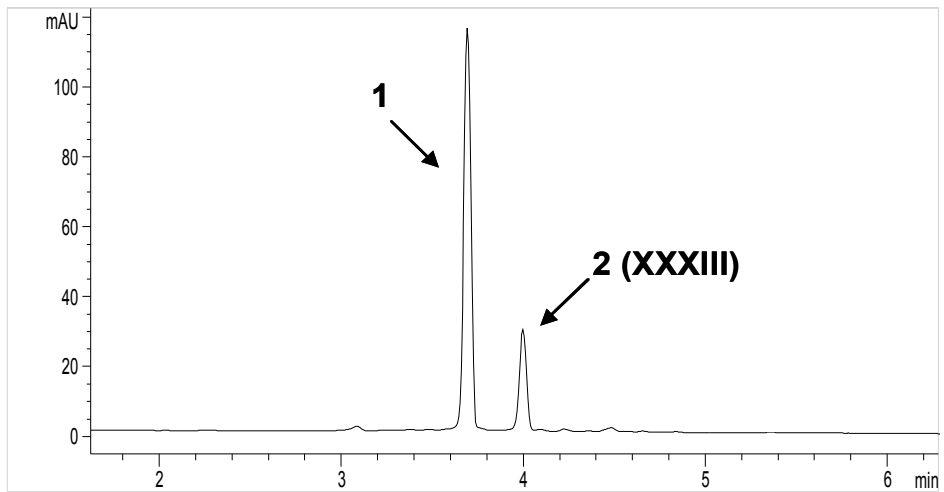


FIG. 14

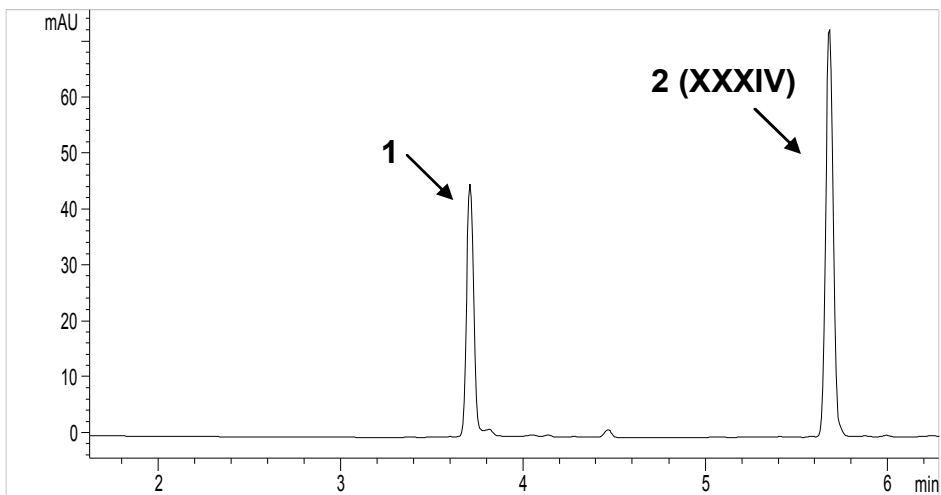


FIG. 15

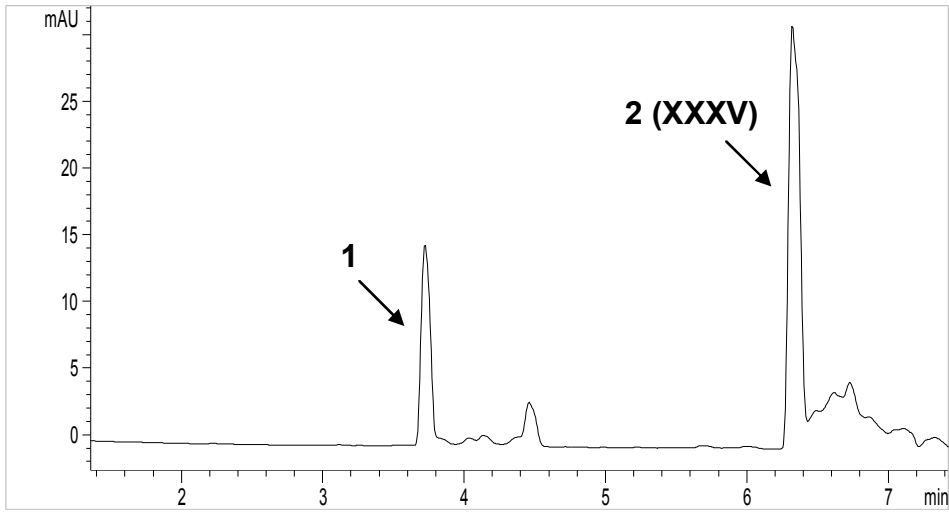


FIG. 16

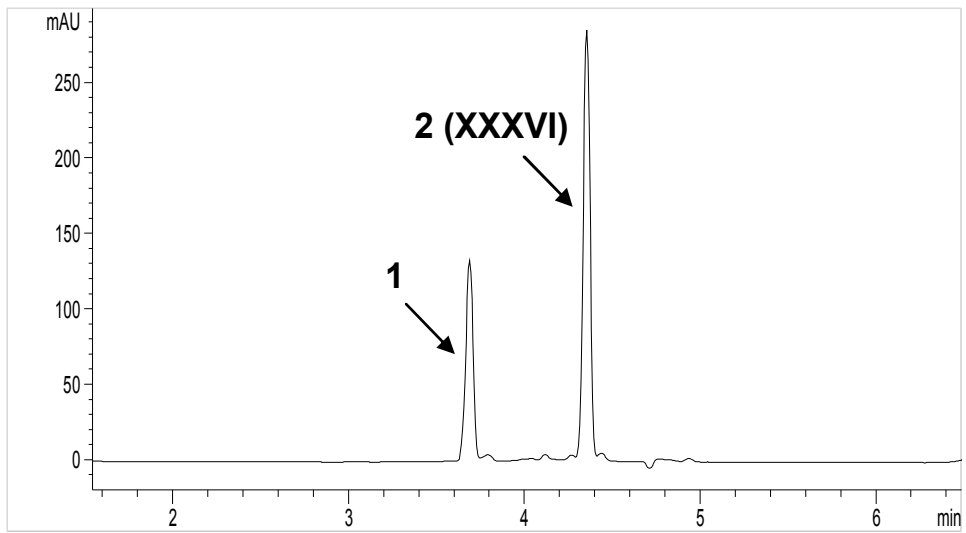


FIG. 17

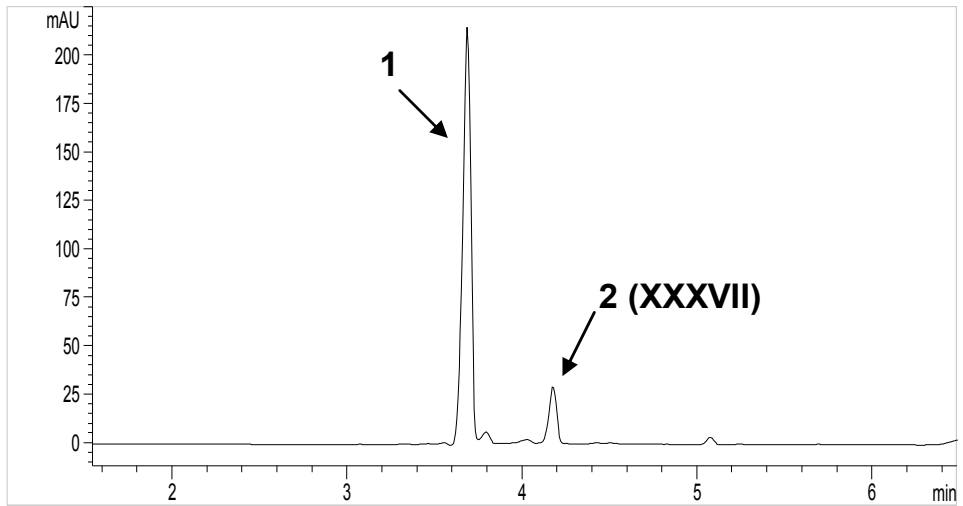


FIG. 18

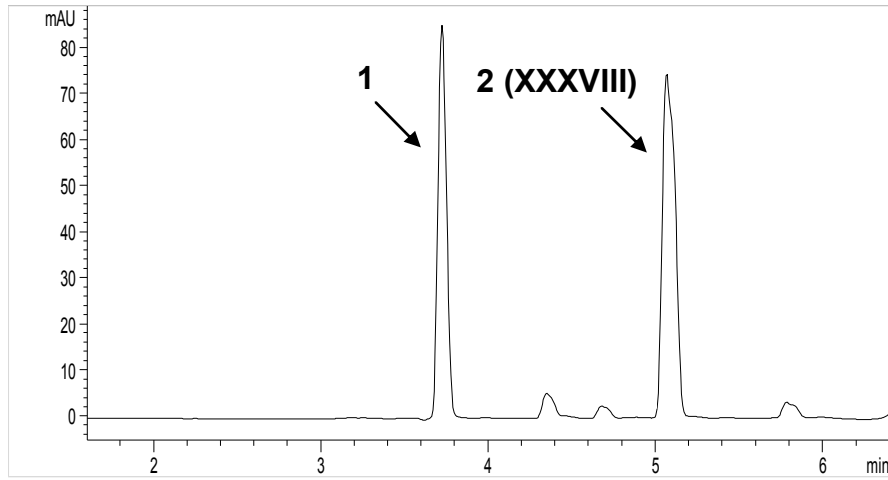


FIG. 19

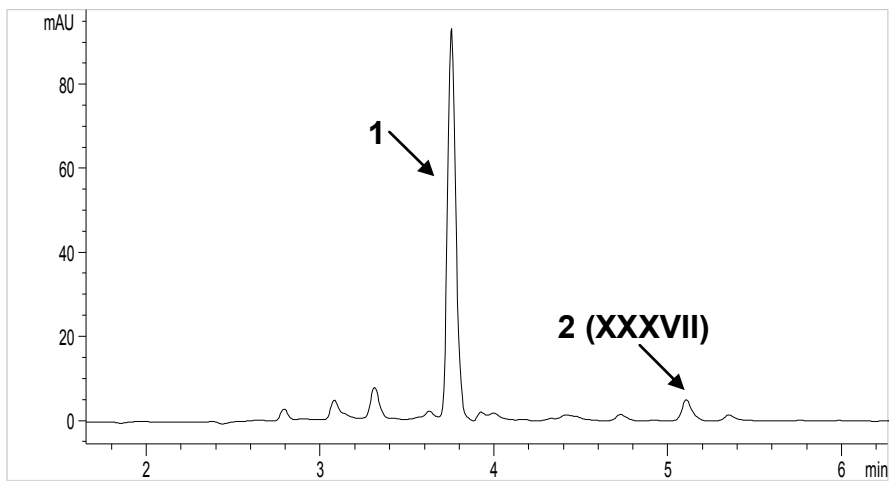


FIG. 20

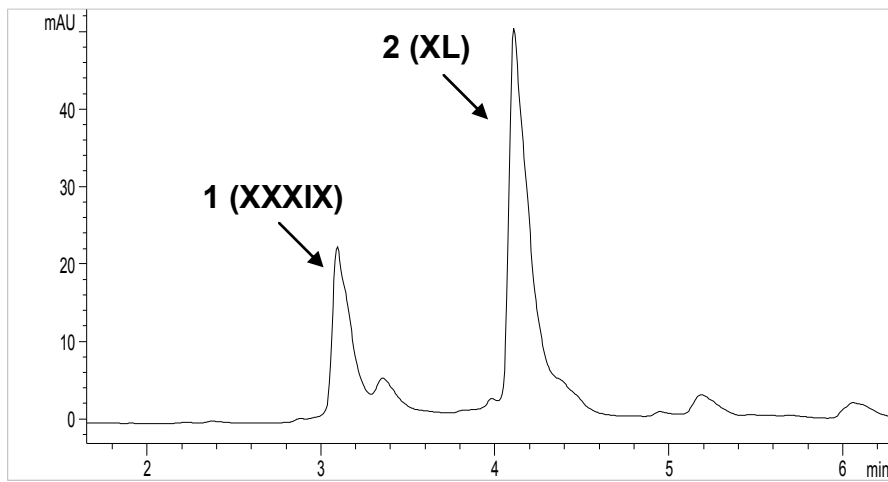


FIG. 21

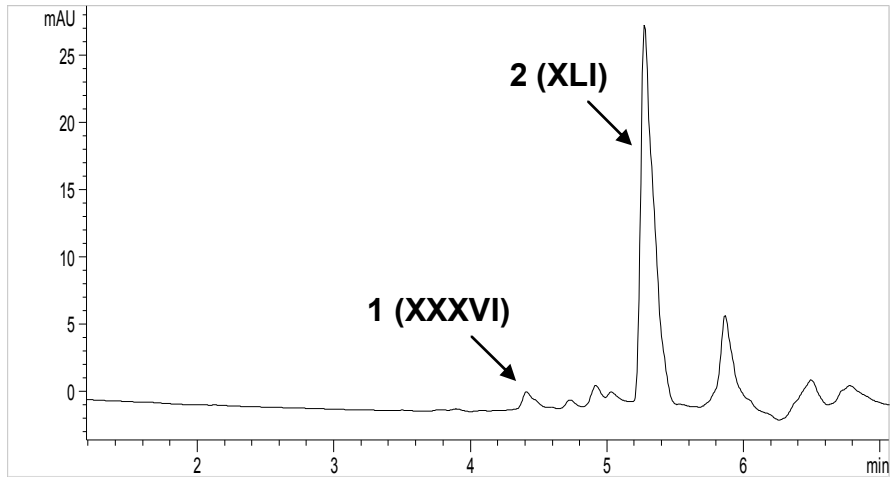


FIG. 22

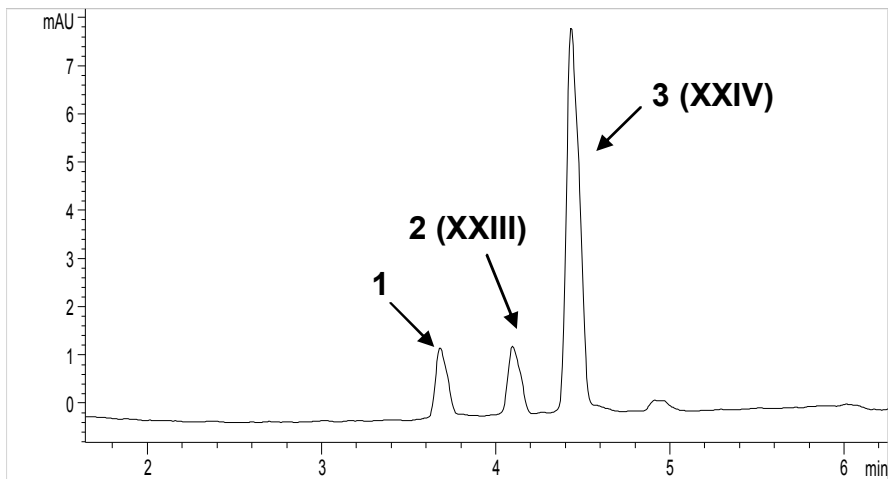


FIG. 23

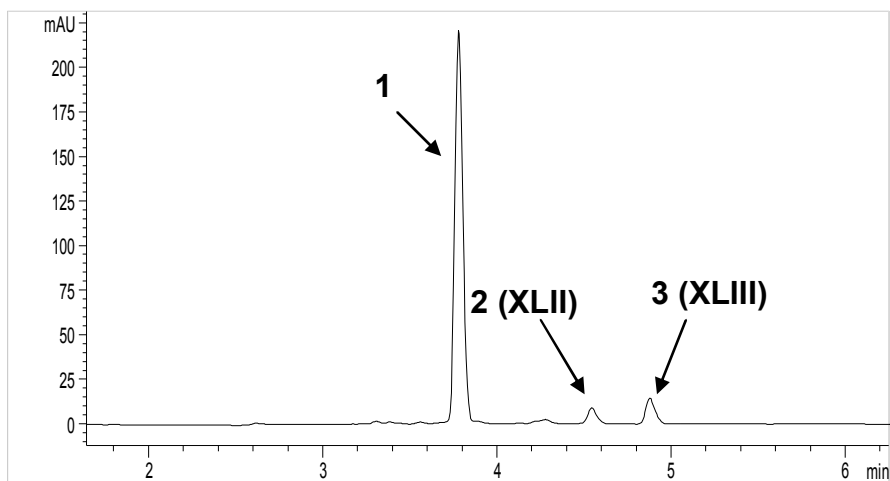


FIG. 24

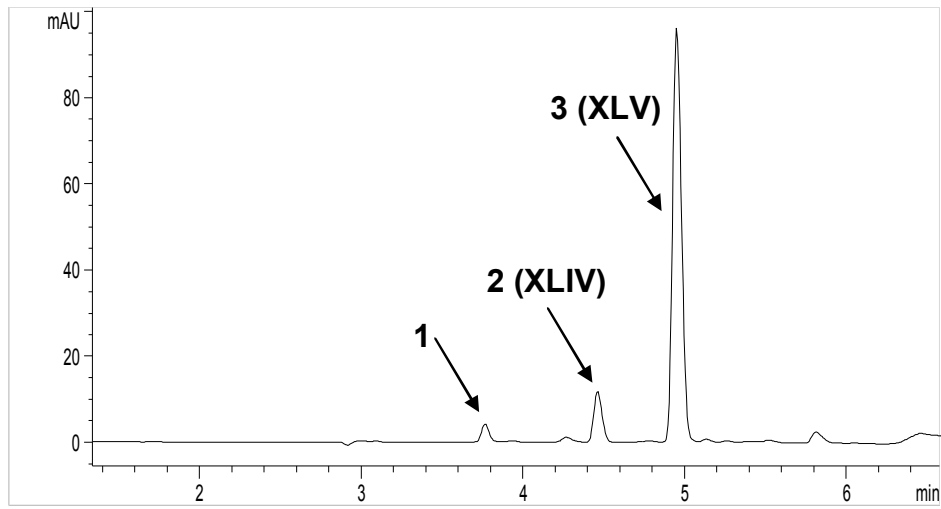


FIG. 25

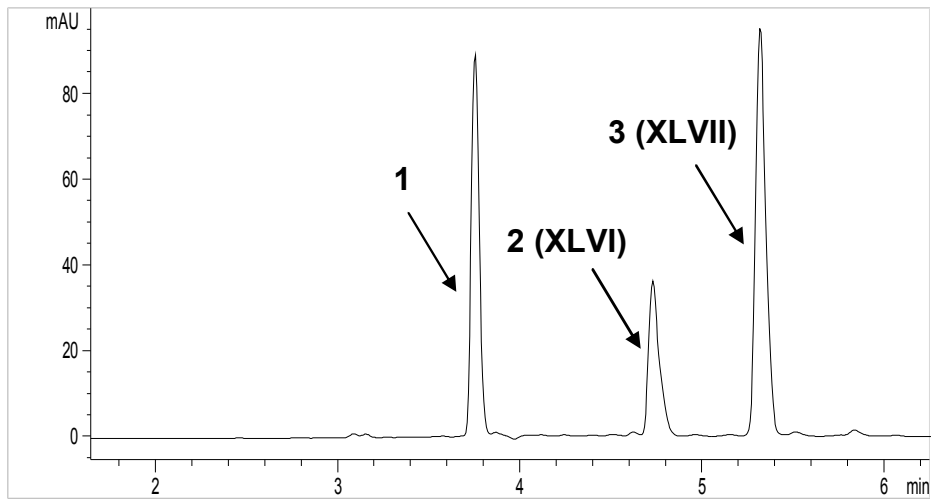


FIG. 26

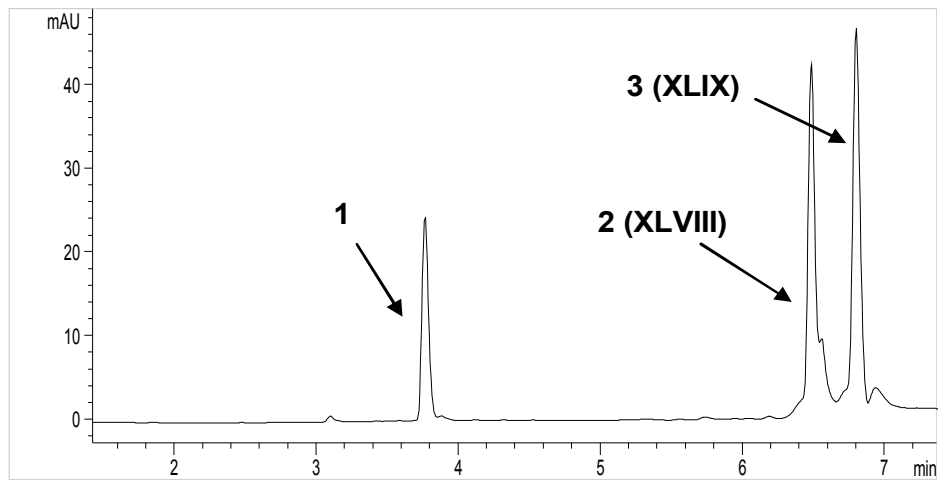


FIG. 27

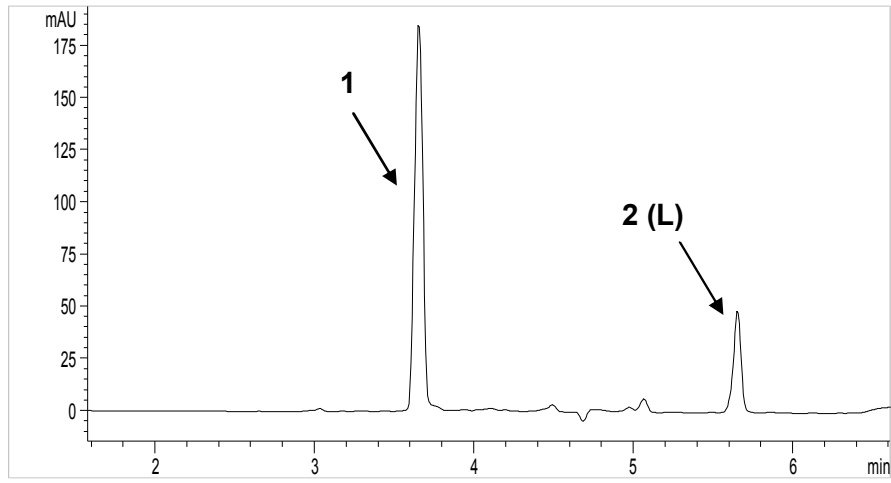


FIG. 28

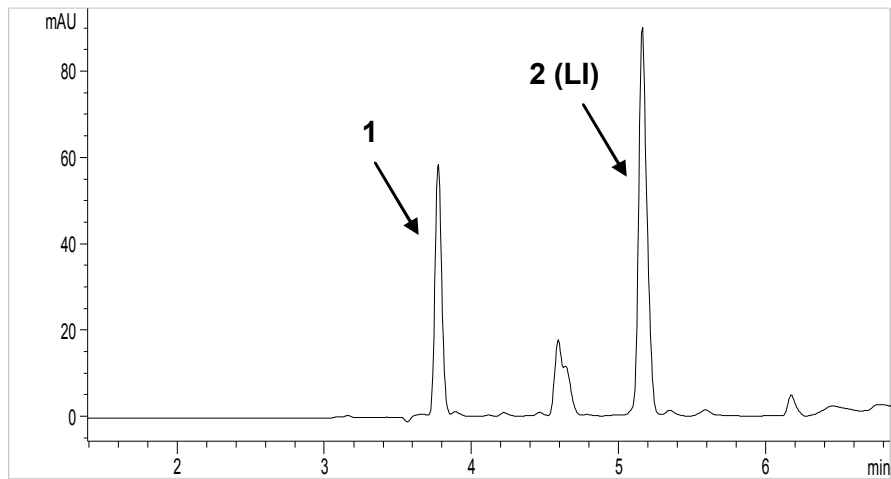


FIG. 29

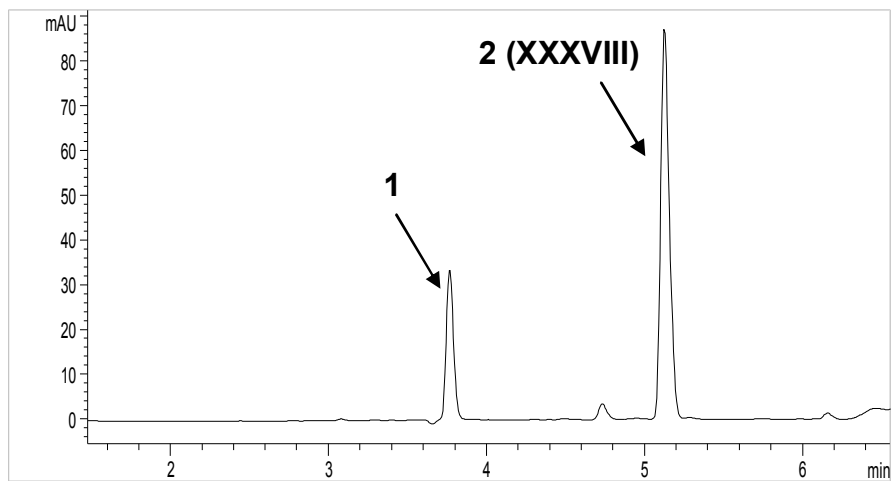


FIG. 30

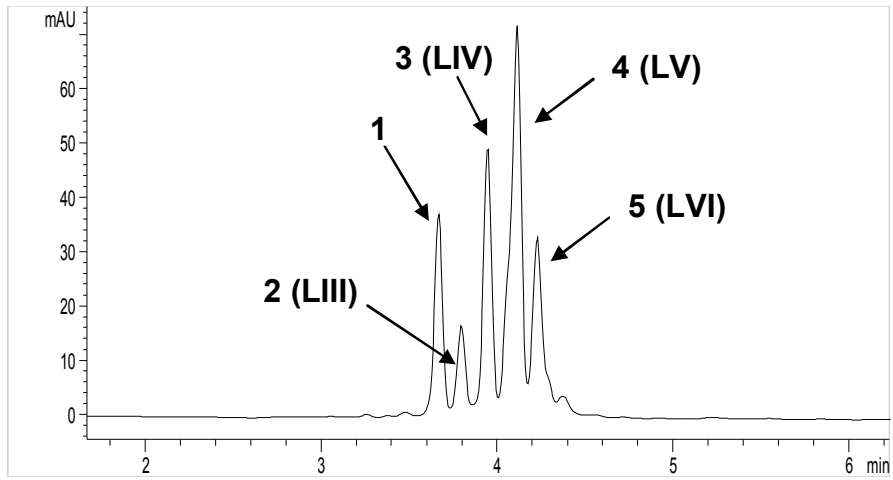


FIG. 31

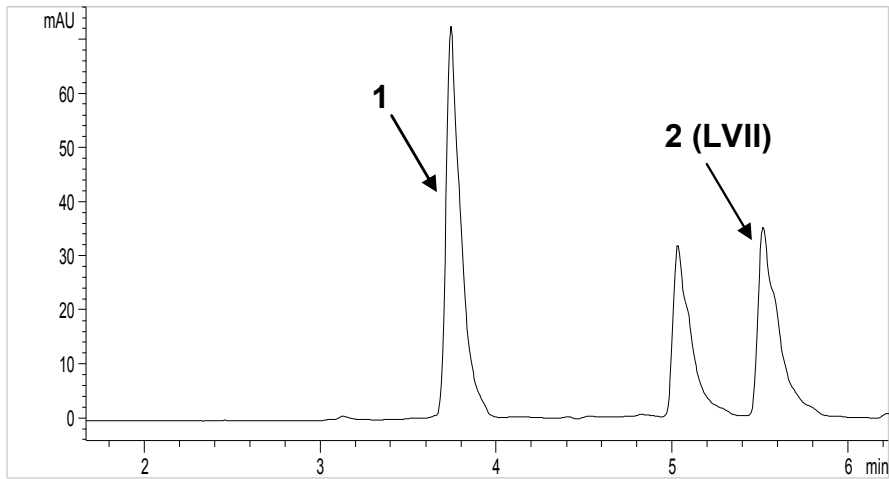


FIG. 32

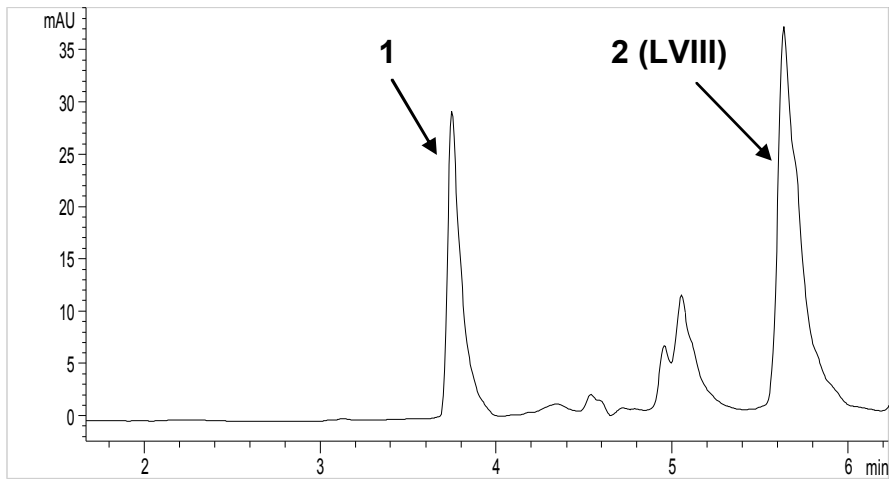


FIG. 33

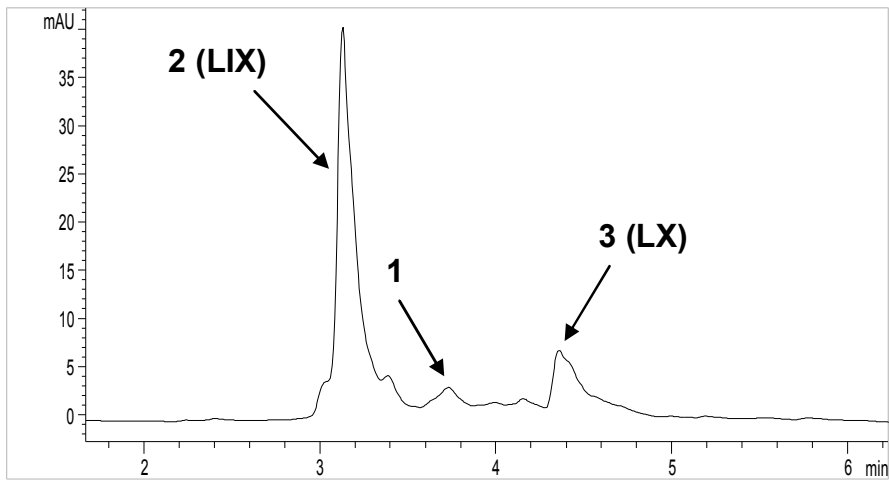


FIG. 34

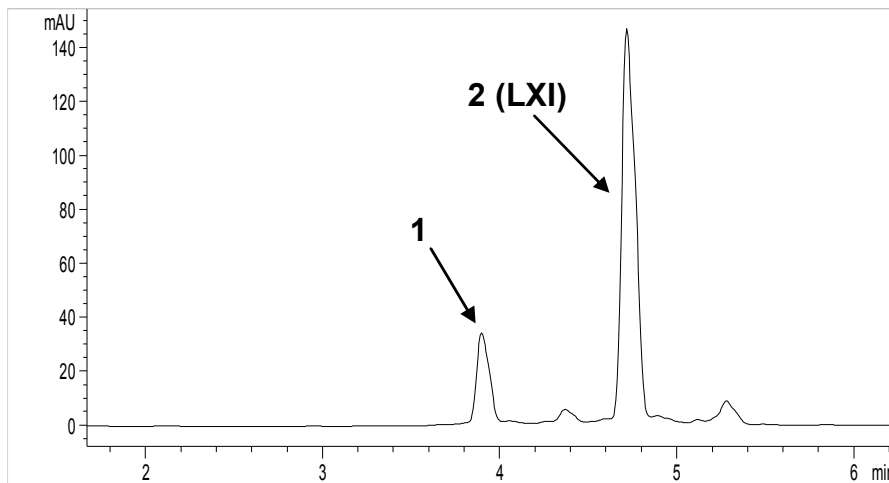


FIG. 35

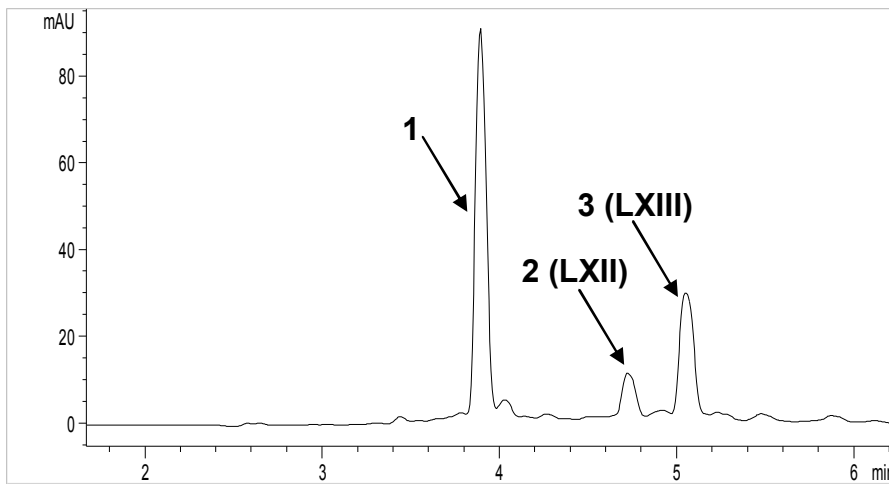


FIG. 36

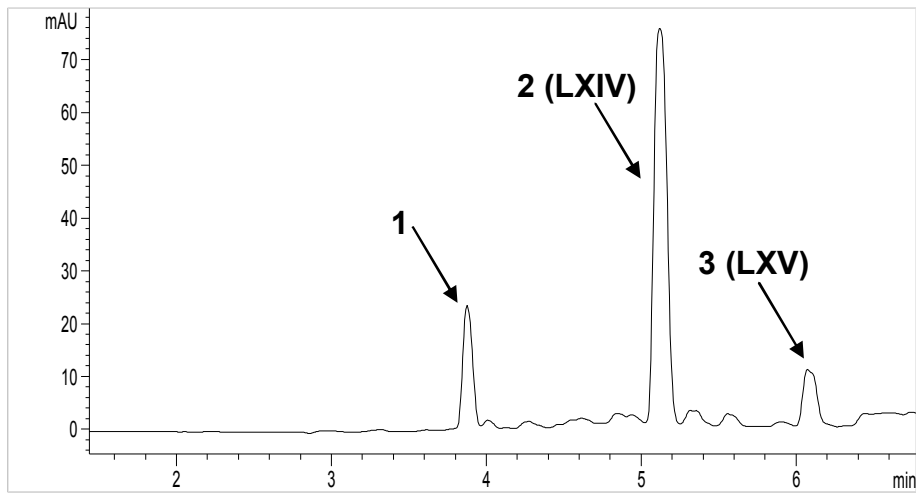


FIG. 37

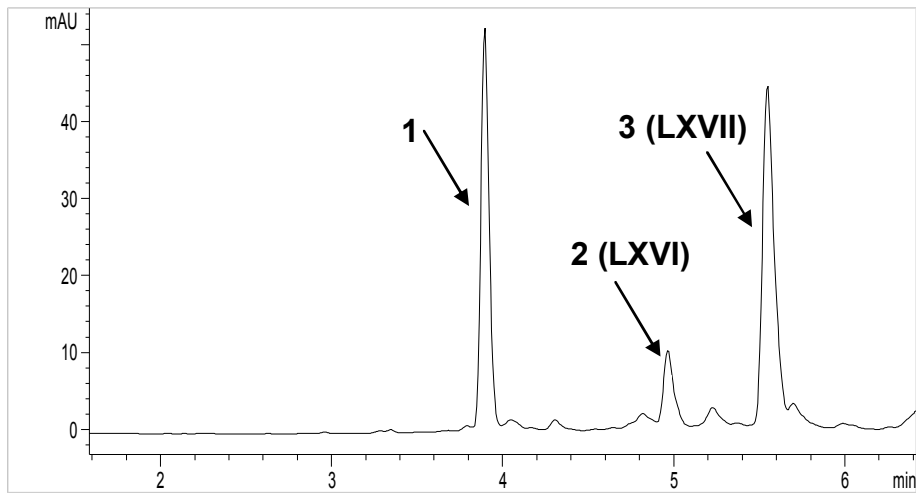


FIG. 38

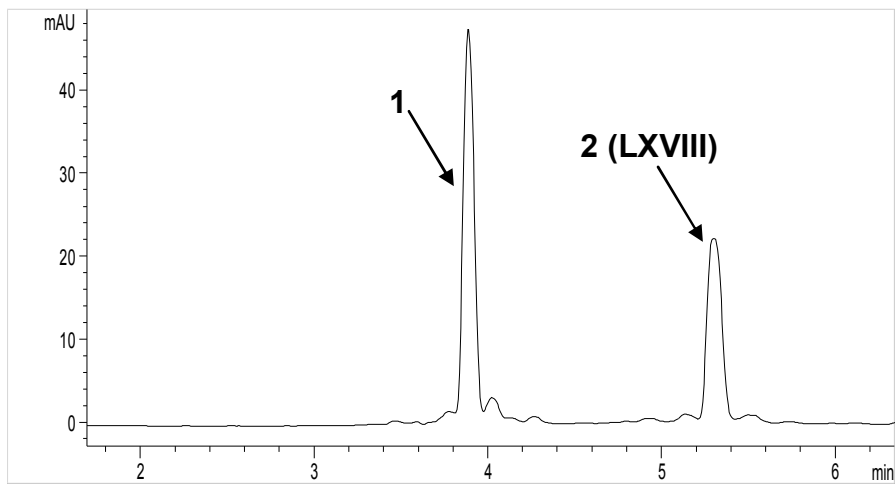


FIG. 39

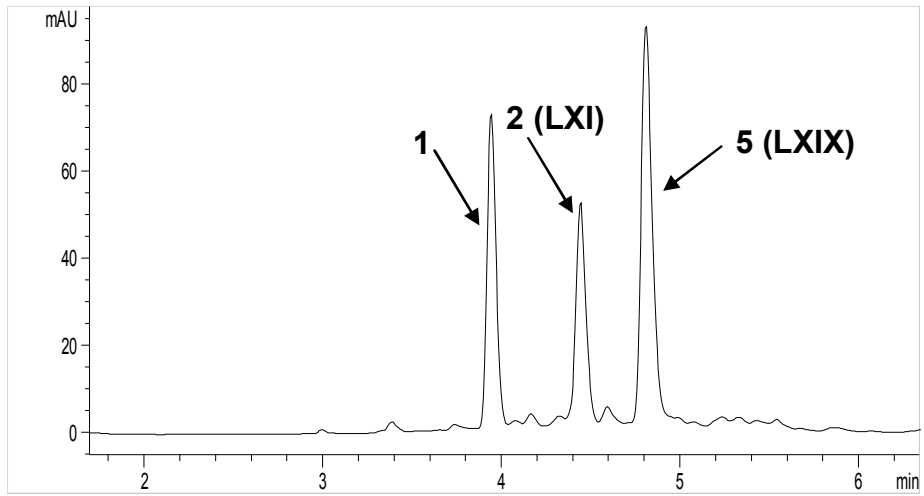


FIG. 40

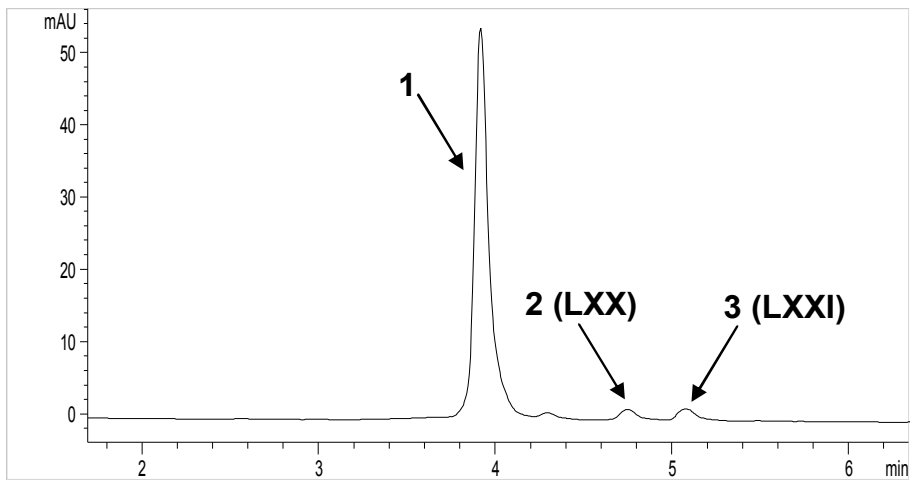


FIG. 41

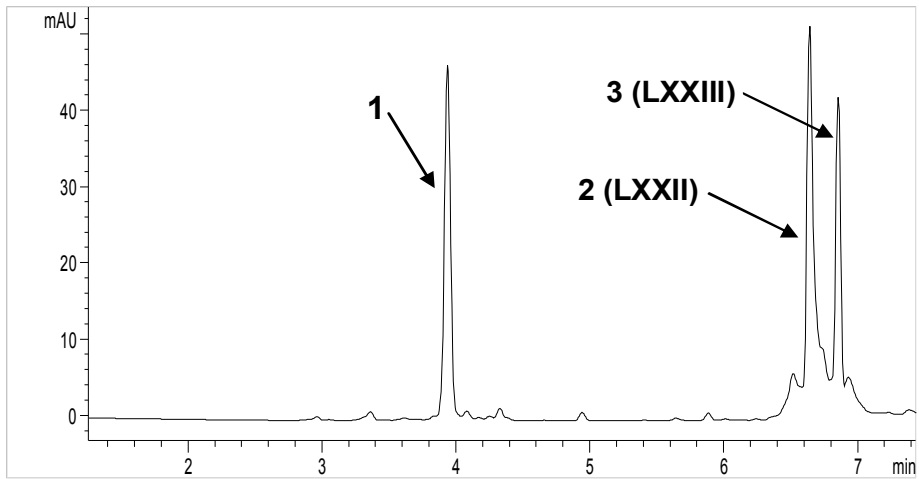


FIG. 42

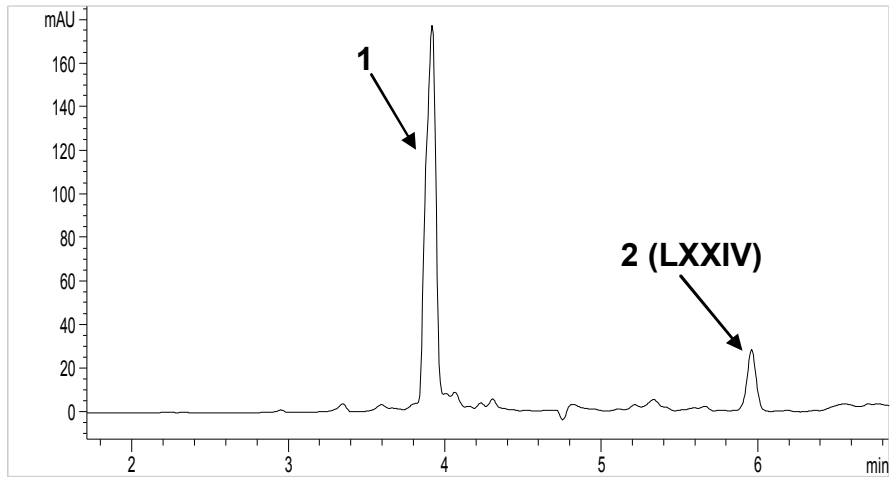


FIG. 43

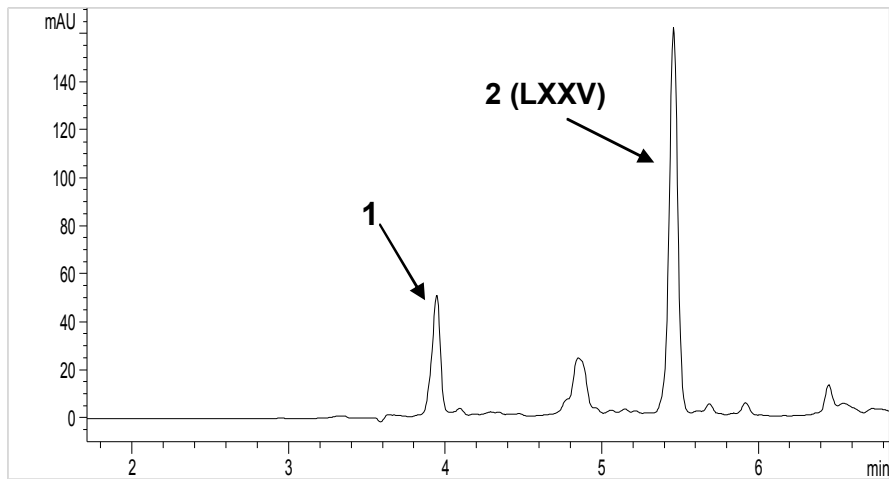


FIG. 44

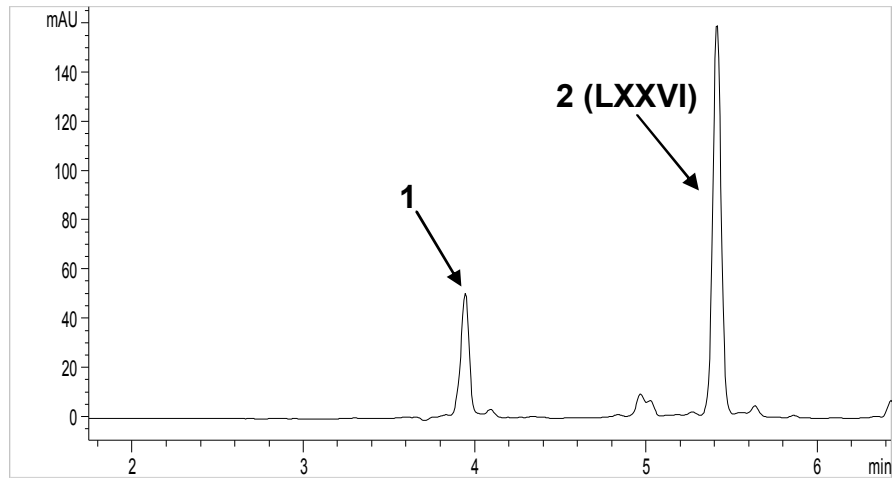


FIG. 45

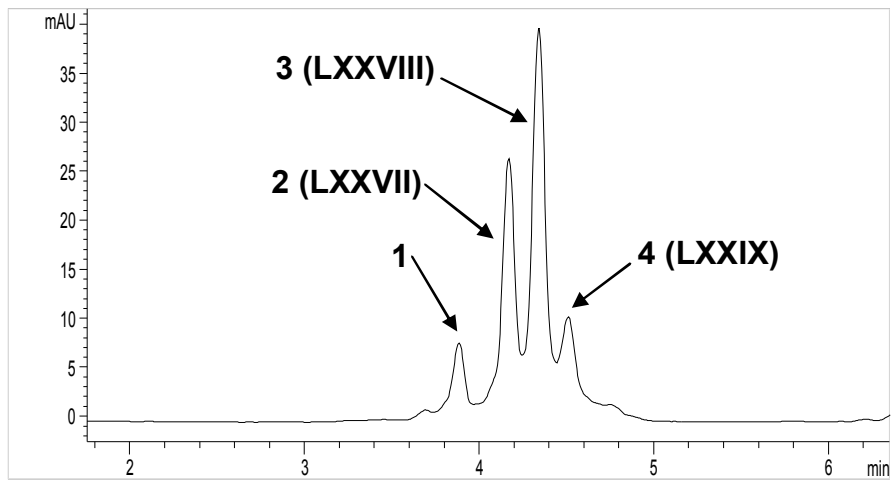


FIG. 46

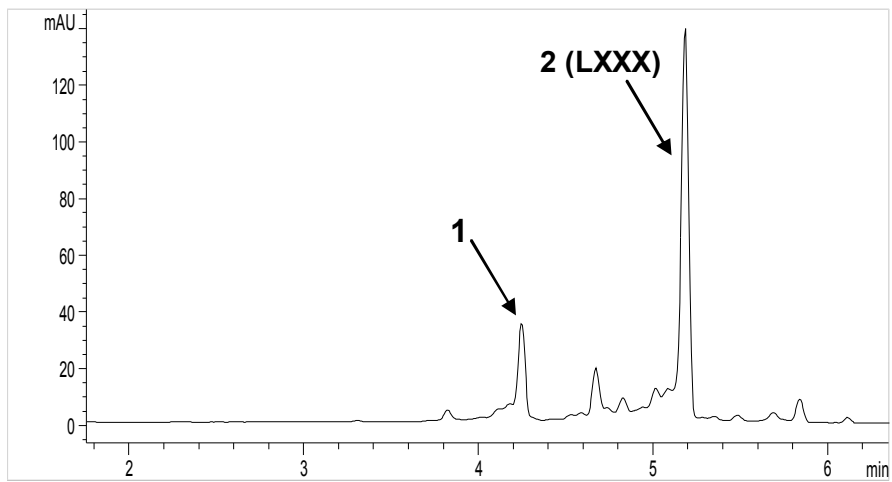


FIG. 47

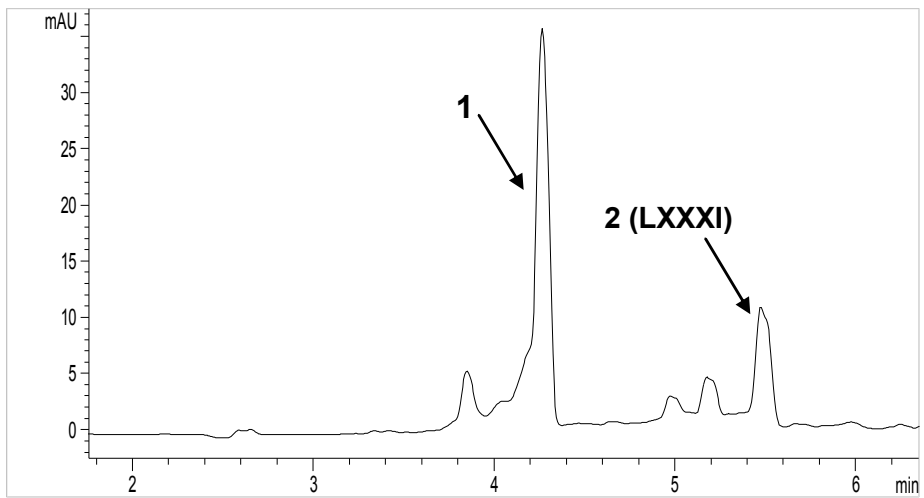


FIG. 48

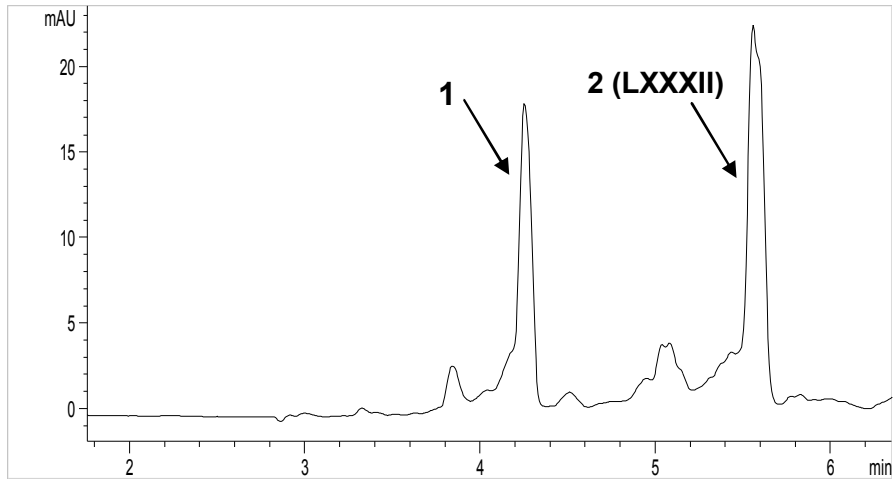


FIG. 49

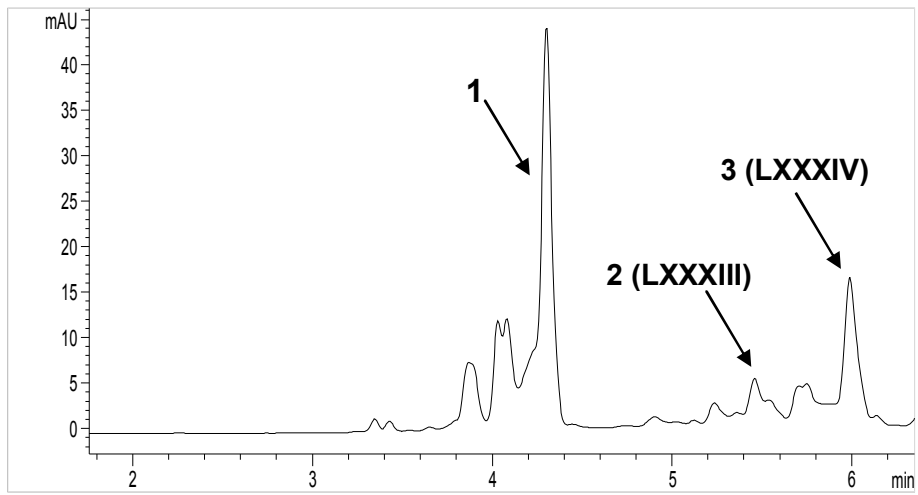


FIG. 50

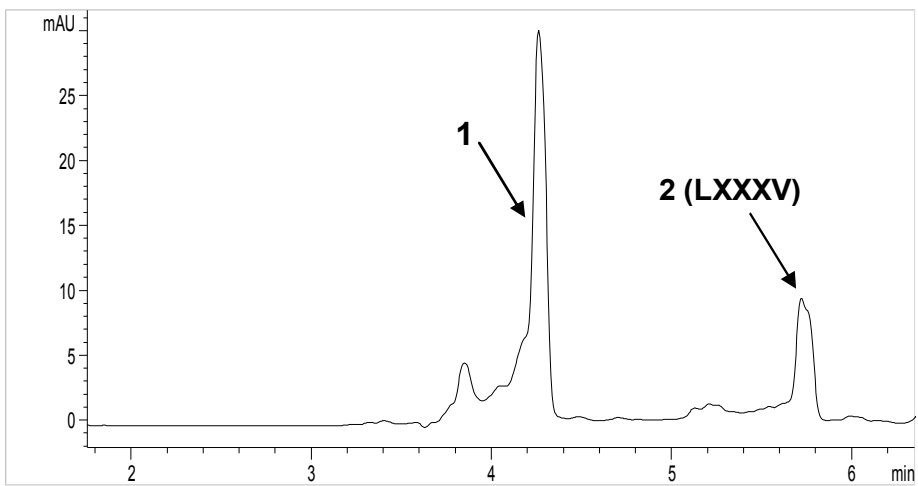


FIG. 51

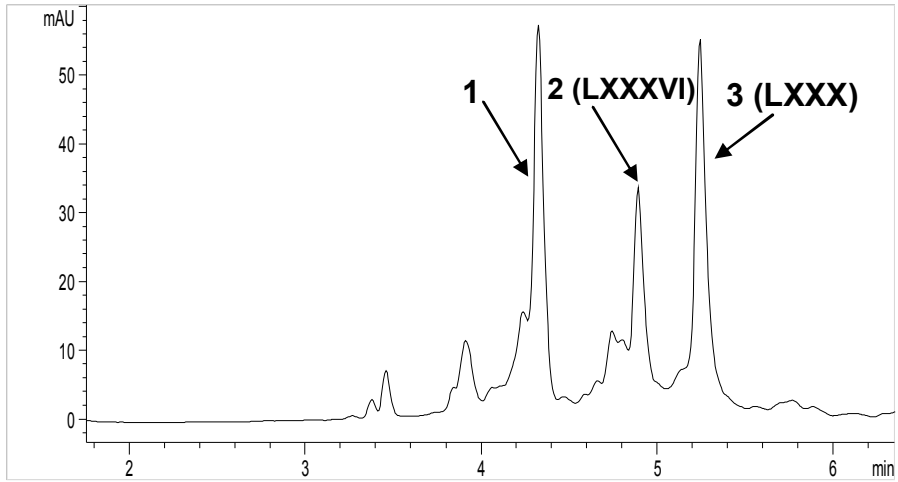


FIG. 52

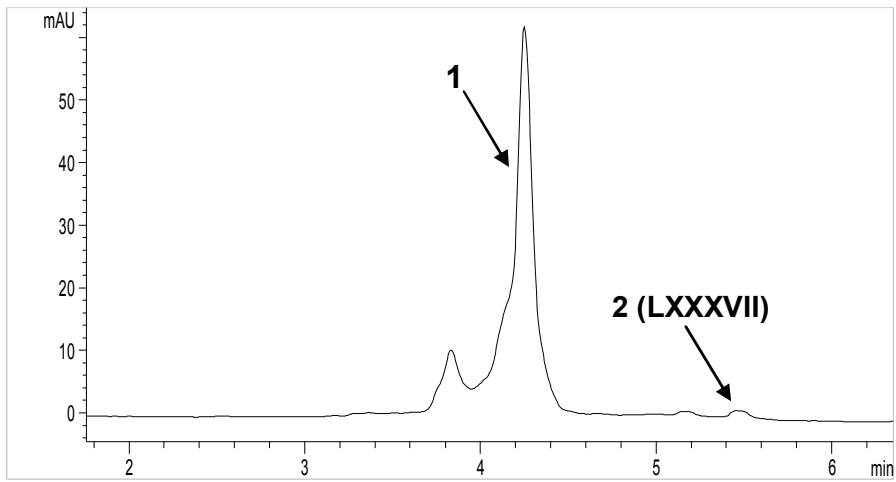


FIG. 53

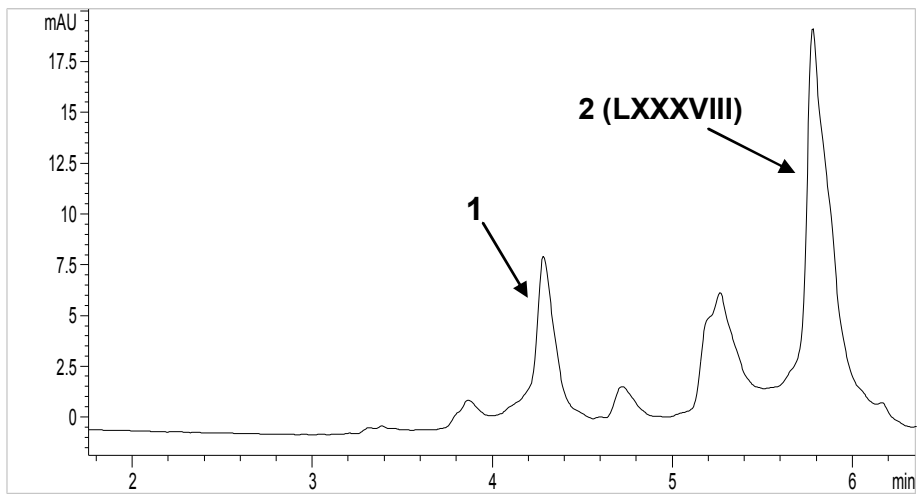


FIG. 54

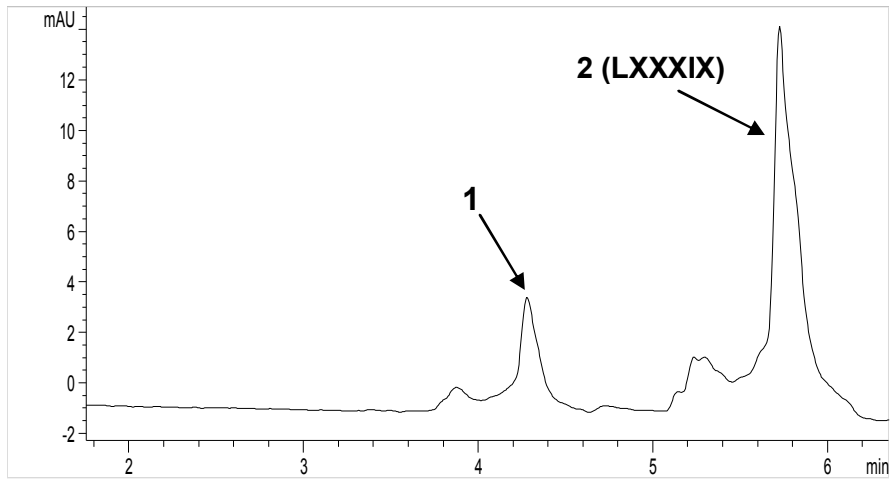


FIG. 55

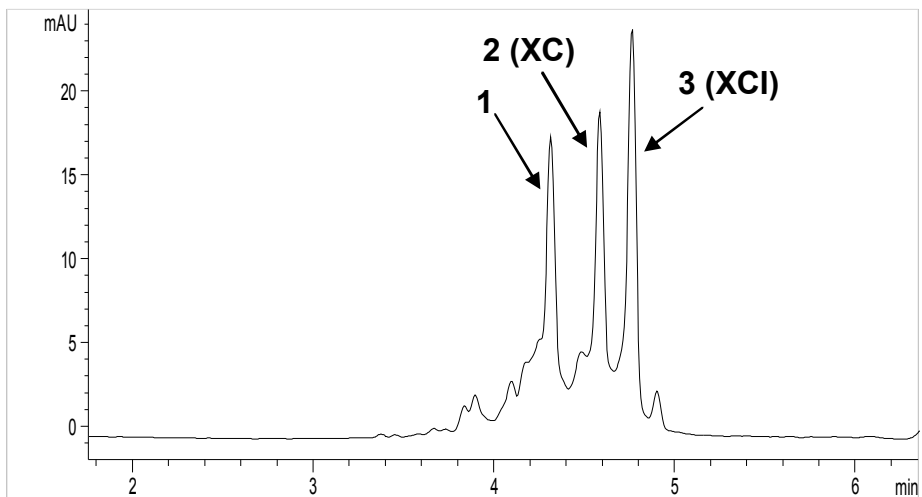


FIG. 56

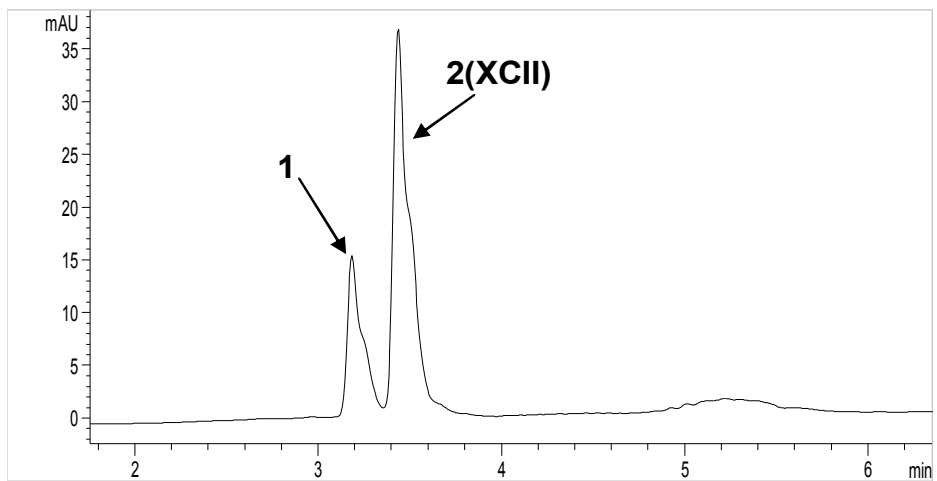


FIG. 57

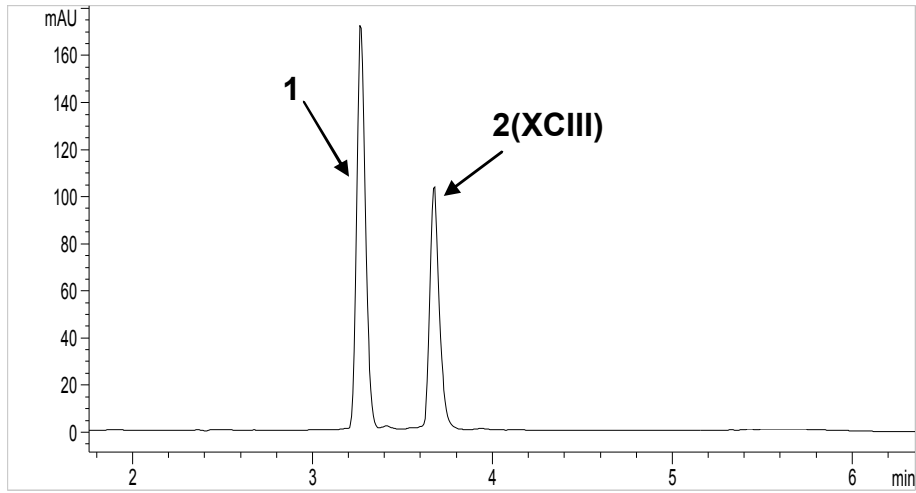


FIG. 58

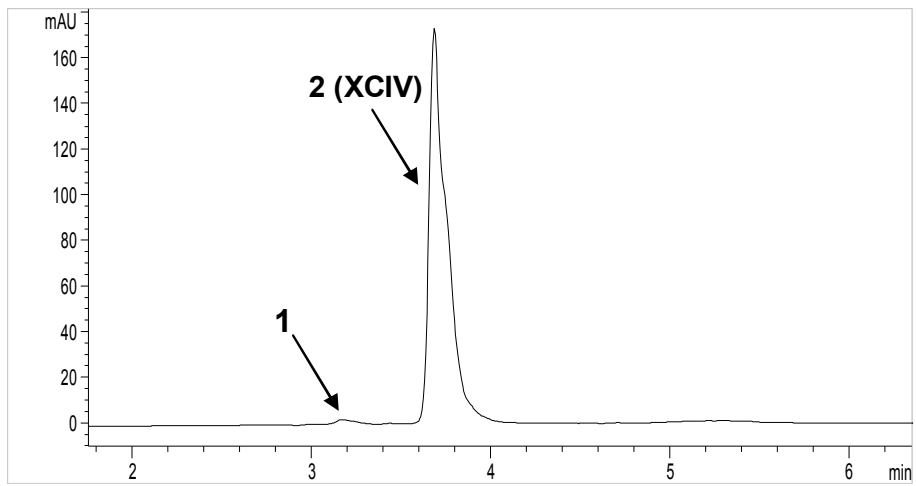


FIG. 59

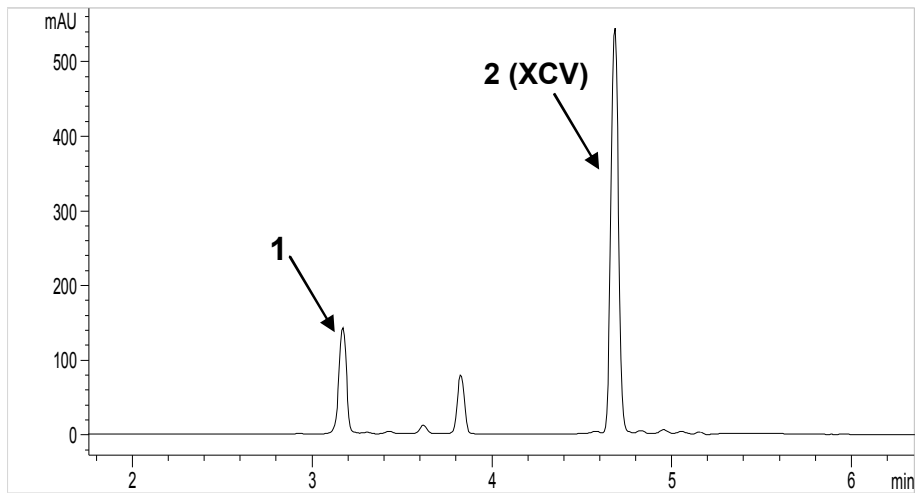
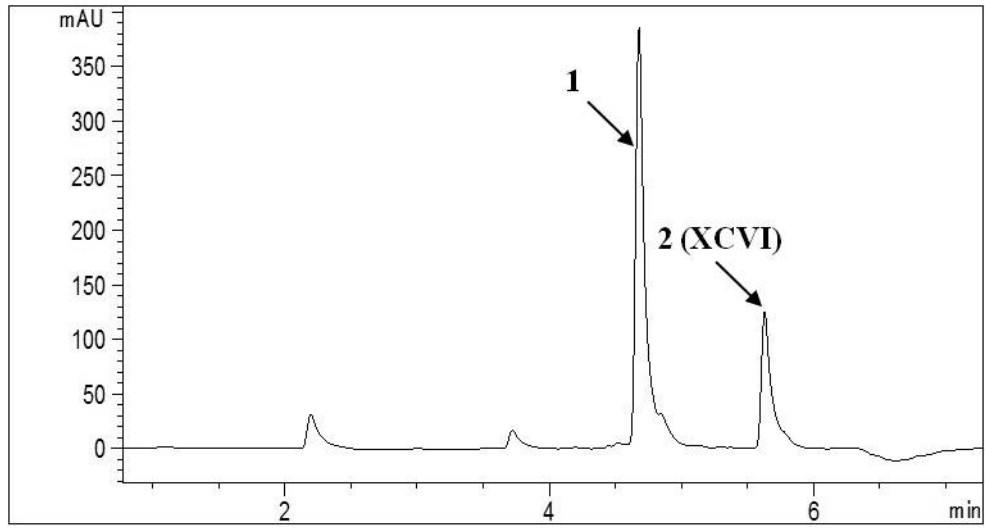


FIG. 60



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 7423008 B2 [0009] [0013] [0052] [0058]
- US 2005192432 A1 [0012]
- WO 2008096028 A1 [0012]
- US 3710795 A [0046]

Literatura no patente citada en la descripción

- *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 73, 1-14 [0002] [0006] [0009] [0013] [0051]
- *Oncology*, 1973, vol. 28, 147-163 [0003]
- *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 195, 1245-1253 [0003]
- *Treat. Endocrinol.*, 2002, vol. 1, 241-257 [0003]
- *Treat. Endocrinol.*, 2003, vol. 2, 273-292 [0003]
- *Ann. Neurol.*, 2001, vol. 49, 345-354 [0003]
- *J. Neurosci.*, 2004, vol. 24, 10335-10342 [0003]
- *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, 16672-16680 [0003]
- *Cancer Res*, 2007, vol. 67, 4878-4885 [0003]
- *J. Clin. Invest.*, 1989, vol. 83, 2003-2007 [0004]
- *J. Clin. Invest.*, 1991, vol. 88, 1613-1621 [0004]
- *J. Cell. Physiol.*, 2001, vol. 188, 143-160 [0004]
- *Biochem.*, 1997, vol. 36, 2291-2299 [0007]
- *Mol. Microbiol.*, 2004, vol. 53, 903-915 [0007] [0017] [0062] [0071]
- *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, 5745-5753 [0009] [0013]
- *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, vol. 5, 106-111 [0010]
- *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, vol. 10, 130-136 [0010]
- *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, 6644-6652 [0014] [0056]
- *Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, Norwich, UK*, 2000 [0015]
- *Gene*, 1996, vol. 172, 87-91 [0015]
- *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, 4929-4937 [0015] [0049] [0058] [0062] [0071]
- *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, 5745-5753 [0015] [0058]
- *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, 167-177 [0017] [0062] [0071]
- *Tetrahedron*, 2004, vol. 60, 501-519 [0018]
- *Chem. Soc. Rev.*, 2004, vol. 33, 201-209 [0018]
- *Adv. Synth. Catal.*, 2006, vol. 348, 797-812 [0018]
- *Cancer Treat. Rep.*, 1979, vol. 63, 1835-1838 [0034]
- *Ann. Intern. Med.*, 1975, vol. 83, 659-660 [0034]
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0048]
- **KIESER et al.** Practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation, Norwich, 2000 [0048]
- **KIESER et al.** Practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation [0049]
- *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 3065-3074 [0051]
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 73, 1-14 [0051]
- Biosynthesis of mithramycin by *Streptomyces argillaceus*: characterization of genes involved in methylation of the polyketide structure. Thesis. 1999 [0051]
- *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, 5745-5753 [0052] [0053] [0059]
- *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, 642-647 [0053]
- *Chem Biol*, 2004, vol. 11, 87-97 [0053]
- **KEISER et al.** Practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation, 2000 [0054]
- *Chem Biol*, 2002, vol. 9, 519-531 [0058]
- *Nucleic Acids Res.*, 2006, vol. 34, 1721-1734 [0058]
- *Chem. Biol*, 2002, vol. 9, 519-531 [0062]
- *Chem. Biol.*, 2002, vol. 9, 519-531 [0071]