(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 605 011**

(21) Número de solicitud: 201600606

(51) Int. Cl.:

C07H 17/04 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

15.07.2016

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

10.03.2017

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.0%)
C/ San Francisco 3
33003 Oviedo (Asturias) ES

(72) Inventor/es:

FERNÁNDEZ BRAÑA , Alfredo Javier;
BLANCO BLANCO , María Gloria ;
GARCÍA DÍAZ , Luis Arsenio ;
SARMIENTO VIZCAINO , Aida ;
OSSET ALVAREZ, Miguel;
REYES BENÍTEZ , José Fernando ;
PÉREZ-VICTORIA MORENO DE BARREDA , Ignacio ;
MARTÍN SERRANO , Jesús Melchor ;
VICENTE PÉREZ, María Francisca;
DE PEDRO MONTEJO, Nuria y
DE LA CRUZ MORENO, Mercedes

(54) Título: **Cepa bacteriana de streptomyces carnosus productora de loboforinas y loboforina producida por la misma.**

(57) Resumen:

Cepa bacteriana de Streptomyces carnosus productora de loboforinas y loboforina producida por la misma.

La invención proporciona una nueva cepa bacteriana de Streptomyces carnosus que ha sido aislada de su medio natural y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso 9162, la cual es capaz de producir eficientemente por fermentación compuestos antibióticos de la familia de las loboforinas. Concretamente, esta cepa es productora de una nueva loboforina, designada en la presente invención como loboforina K, que presenta actividad citotóxica frente a células tumorales, preferiblemente humanas, y actividad antibiótica o antibacteriana frente a bacterias patógenas Gram-positivas, preferiblemente humanas.

ES 2 605 011 A1

DESCRIPCIÓN

Cepa bacteriana de *Streptomyces carnosus* productora de loboforinas y loboforina producida por la misma.

La presente invención se encuadra dentro del campo farmacéutico, y específicamente se refiere a nuevos productos naturales con aplicación en oncología y en el tratamiento de infecciones bacterianas, que se obtienen por fermentación de una cepa bacteriana productora de compuestos antitumorales y/o antibióticos de la familia de las loboforinas. La invención también se refiere a una nueva loboforina, la loboforina K, a su procedimiento de obtención y a composiciones farmacéuticas que la comprenden, las cuales son útiles para el tratamiento y/o prevención de tumores, preferiblemente de páncreas y mama en humanos y de infecciones bacterianas provocadas por bacterias patógenas Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*.

Estado de la técnica

Las loboforinas son productos naturales de origen marino con interés farmacológico debido a sus diversas actividades biológicas. Estructuralmente, son miembros de la familia de espirotetronato, descrita por primera vez como compuestos antiinflamatorios, como las loboforinas A y B (Jiang *et al.*, 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2003-2006). Otras loboforinas han sido estudiadas por sus actividades antibióticas tales como las loboforinas E y F (Niu *et al.*, 2011, J. Antibiot 64:711-6), la loboforina G (Chen *et al.*, 2013 Appl. Microbiol. Biotechnol. 97:3885-92) y loboforinas H e I (Pan *et al.*, 2013 Mar. Drugs 11:3891-901; Lin *et al.*, 2014, J. Antibiot 67:121-6). Desafortunadamente, debido a una superposición en las fechas de publicación, los dos últimos artículos añaden confusión a la nomenclatura de la familia de las loboforinas, dado que los nombres de loboforina H e I fueron asignados a nuevos compuestos aislados independientemente por dos grupos de investigación cuyas estructuras no son coincidentes. El compuesto llamado como loboforina I en el artículo de Lin *et al.* corresponde a loboforina H en el artículo de Pan *et al.*, y el compuesto cuyo nombre fue asignado como loboforina H en el de Lin *et al.* sería un nuevo producto natural cuyo nombre debería tal vez ser reasignado como loboforina I* con el fin de no añadir más confusión y teniendo en cuenta la fecha de la publicación de dichos artículos. Muy recientemente, tres miembros adicionales de la familia de las loboforinas, las loboforinas CR1, CR2 y CR3, fueron aislados de cultivos de *Streptomyces* sp. 7790_N4 (Cruz *et al.*, 2015, ACS Med. Chem. Lett. 6:877-81). Además, algunas loboforinas muestran actividades citotóxicas frente a diferentes líneas celulares tumorales, como las loboforinas C y D frente a líneas de células tumorales de hígado y de mama (Wei *et al.*, 2011, Mar. Drugs 9:359-68); loboforina F contra SNC, líneas de células tumorales de mama y pulmón (Niu *et al.*, 2011, J. Antibiot. 64:711-6) y loboforinas CR1 y CR2 contra líneas celulares de cáncer oral (Cruz *et al.*, 2015, ACS Med. Chem. Lett. 6:877-81).

Los ambientes marinos están emergiendo como una fuente de nuevos productos naturales de importancia farmacológica. Los arrecifes coralinos se han revelado como una fuente que merece ser investigada para descubrimiento de productos naturales estructuralmente únicos con relevancia biomédica (Seifried *et al.*, 2015, Microbiologyopen 4: 475-90). Los corales de aguas profundas, conocidos en todos los océanos del planeta, son ecosistemas delicados, muy vulnerables a las actividades humanas (Margan, 2005, Current: Journal of Marine Education 21: 1-4; Braña *et al.*, 2015, Microb. Ecol. 69: 512-524;). Existen pocos informes acerca de actinobacterias asociadas a corales de aguas

profundas, y todos ellos se refieren al noreste Atlántico (Galkiewicz et al., 2011, FEMS Microbiol. Ecol. 77: 333-46; Neulinger et al., 2008, Appl. Enviran. Microbiol. 74: 7272-85).

Trabajos previos en el mar Cantábrico (Bahía de Vizcaya), Atlántico Noreste, han revelado que actinobacterias con actividad biológica, principalmente especies de *Streptomyces*, están asociadas a corales y otros invertebrados que viven hasta 4.700 m de profundidad en el cañón submarino de Avilés (Braña *et al.,* 2015, Microb. Ecol. 69: 512-524; Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2015, Int J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 1328-1334).

En resumen, existe una necesidad creciente de nuevos agentes antitumorales, con actividades mejoradas, con menos efectos secundarios indeseables y con mayor selectividad, en comparación con los fármacos actualmente en uso. En la lucha contra el cáncer se hace necesaria la obtención de nuevos antitumorales con propiedades farmacológicas mejoradas. Además, debido a la creciente aparición en el ámbito clínico de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos de uso actual, se hace necesaria la obtención de nuevos antibióticos con potencial biomédico en el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas. Asimismo, es necesario disponer de procedimientos simples, cortos y económicos para la obtención de dichos compuestos con actividad antitumoral y/o antibacteriana.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una nueva cepa bacteriana de *Streptomyces carnosus* que ha sido aislada de su medio natural y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso 9162, la cual es capaz de producir eficientemente por fermentación compuestos citotóxicos de la familia de las loboforinas. Concretamente, esta cepa es productora de una nueva loboforina, designada en la presente invención como loboforina K, que presenta actividades citotóxicas frente a diferentes líneas celulares tumorales, preferiblemente humanas.

Los inventores de la presente invención han aislado dicha cepa, *Streptomyces carnosus* M-207, de los ecosistemas de arrecifes de coral desde el cañón submarino de Avilés. Dicha cepa fue aislada asociada al coral de agua fría *Lophelia pertussa* recolectado a 1.800 m de profundidad durante una expedición Oceanográfica al cañón submarino de Avilés y fue estudiada e identificada posteriormente. Se describe por tanto en la presente invención dicha cepa, un procedimiento para obtener loboforinas por fermentación a partir de la misma y un nuevo producto natural de la familia de las loboforinas con actividad citotóxica frente a líneas tumorales humanas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, líneas de carcinoma pancreático y adenocarcinoma de mama. La loboforina K presenta además actividad antibacteriana in vivo frente a bacterias patógenas clínicas Gram-positivas, como por ejemplo aunque sin limitarnos, *Staphylococcus aureus*.

Los inventores determinaron las condiciones de cultivo de la cepa para la producción de la nueva loboforina, posteriormente purificaron la misma, procedieron a su elucidación estructural y ensayaron su actividad citotóxica frente a diversas líneas tumorales humanas y antibiótica frente a una variedad de patógenos clínicos tanto Gram-negativos como Gram-positivos.

La presente invención representa así una solución a la necesidad de disponer de nuevos compuestos antitumorales con potencial biomédico en el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas Gram positivas.

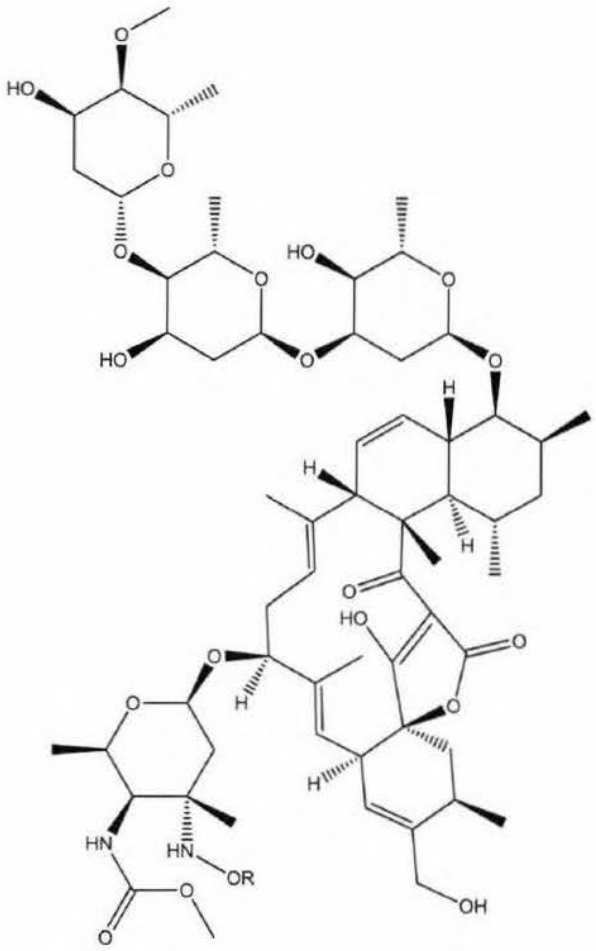
Asimismo, representa una solución a la necesidad de disponer de procedimientos simples, cortos y económicos para la obtención de dicho compuesto con actividad antitumoral y antibiótica, ya que el procedimiento descrito en la presente invención permite producir el citado compuesto por fermentación con una actinobacteria, en lugar de por síntesis química, proceso más complejo, largo y costoso. En este sentido, en procesos biotecnológicos que implican la obtención de productos naturales estructuralmente complejos, como es el caso de las loboforinas, la producción por fermentación mediante el microorganismo productor es el procedimiento preferido, ya que es más sencillo, más corto y más económico que el procedimiento de síntesis orgánica.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Streptomyces carnosus M-207* depositada el 16 de junio de 2016 en la Colección Española de Cultivo Tipo bajo el número de acceso 9162. De ahora en adelante se hará referencia a esta cepa bacteriana como “cepa de la invención” o “cepa bacteriana de la invención”.

Otro aspecto de la invención se refiere a un sobrenadante o extracto de un cultivo de la cepa bacteriana de la invención. A este sobrenadante se hará referencia como “sobrenadante de la invención”, y comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) descrito más adelante.

El sobrenadante de la invención que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) puede obtenerse mediante el cultivo de la cepa de la invención en presencia de un medio de cultivo adecuado y en condiciones de fermentación. Dichas condiciones de fermentación y dicho medio de cultivo son, preferiblemente, los que se describen más adelante en el procedimiento de la invención. Posteriormente, se puede proceder a la centrifugación de dicho cultivo bacteriano, mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia para tal fin, y a la eliminación de los sedimentos depositados como consecuencia de este paso de centrifugación, obteniéndose así el sobrenadante de la invención que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) y otros metabolitos producidos y secretados por la cepa de la invención en cultivo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa bacteriana de la invención para la producción de compuestos de fórmula general (I):



(I)

o cualquiera de sus sales o tautómeros,

donde R se selecciona entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido o acilo sustituido o no sustituido;

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula general (I) descrito anteriormente, de ahora en adelante "procedimiento de la invención ", que comprende:

a. cultivar la cepa bacteriana de la invención en un medio de cultivo en condiciones de fermentación, y

b. purificar el compuesto de fórmula general (I) producido por la cepa en cultivo de la etapa (a).

El cultivo de la etapa (a) del procedimiento de la invención se puede llevar a cabo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, inoculando la cepa o esporas de la cepa en un medio de cultivo apropiado. Los expertos en la materia reconocerán los medios de cultivo bacterianos que pueden ser empleados en esta etapa del procedimiento de la invención.

El “medio de cultivo” es un medio nutritivo adecuado, es decir, que comprende los nutrientes necesarios para el mantenimiento y crecimiento *in vitro* de la cepa de la invención, para el desarrollo de su actividad fermentadora y, por tanto, para la producción de los compuestos de fórmula (I) descritos anteriormente. Dicho medio de cultivo puede ser líquido, sólido o semisólido. Para que la cepa de la invención crezca adecuadamente en el medio de cultivo, éste debe reunir una serie de condiciones como son temperatura, agitación, grado de humedad, luz/oscuridad y presión de oxigeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad (pH). Asimismo, el medio de cultivo debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

Así, el cultivo de la etapa (a) tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende, por ejemplo aunque sin limitarnos, agar o gelatina o albúmina, fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa o manitol), fuentes de nitrógeno (por ejemplo, peptonas), azufre, fósforo, fuentes de vitaminas, aminoácidos y hormonas y/o factores de crecimiento (por ejemplo, extracto de carne o extracto de levadura), MOPS, sales inorgánicas (por ejemplo, calcio en forma de $CaCl_2$, magnesio, manganeso, sodio o potasio), iones de hidrógeno, etc. En una realización preferida, el medio de cultivo empleado en el procedimiento de la invención es un medio de cultivo que comprende nutrientes y propiedades físico-químicas similares a las del medio marino. más preferiblemente el medio es R5A marino.

La cepa de la invención se puede cultivar, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante cultivo en matraz con agitación, y fermentación a pequeña o a gran escala (que incluye las fermentaciones continua, discontinua o *batch*, de alimentación discontinua o *feed-batch*, o en estado sólido) llevada a cabo en un biorreactor de laboratorio o industrial en un medio adecuado y en condiciones que permitan expresar y/o aislar los compuestos de fórmula (I) descritos anteriormente. Los compuestos de la invención se secretan, junto con otros metabolitos o compuestos, en el medio nutritivo. y éstos se pueden recuperar directamente del medio.

El experto en la materia reconocerá las condiciones de fermentación adecuadas para ser aplicadas en el paso (a) del procedimiento de la invención. Preferiblemente, dichas condiciones comprenden la incubación en agitación, más preferiblemente en agitador orbital, del cultivo de la invención durante entre 2 y 7 días, preferiblemente entre 3 y 5 días, más preferiblemente durante 4 días; a una temperatura esencialmente constante de entre 25 y 30ºC, preferiblemente entre 27 y 29ºC, más preferiblemente a 28ºC; a entre 200 y 300 rpm, preferiblemente entre 250 y 270 rpm, más preferiblemente a 250 rpm y a un pH constante de entre 6.0 y 7.5, preferiblemente de entre 6.0 y 7.0, más preferiblemente a 6.7.

Tras el cultivo de la etapa (a) del procedimiento de la invención, puede tener lugar un paso adicional de centrifugación tras el cual se descartan los sedimentos y se seleccionan los sobrenadantes, obteniendo así el sobrenadante de la invención. Dichos sobrenadantes pueden ser posteriormente filtrados en el paso (b) del procedimiento de la invención y se pueden someter a continuación a un procedimiento de extracción, como por ejemplo aunque sin limitarnos, a extracción en fase sólida, con el fin de eluir el compuesto de la invención presente en los mismos.

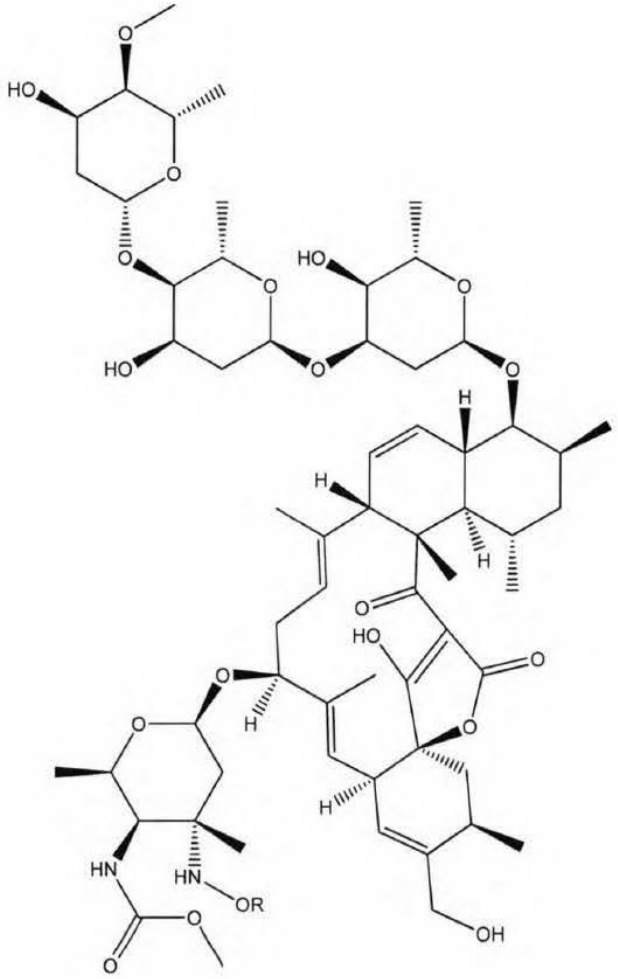
El compuesto de la invención secretado al medio de cultivo por la cepa de la invención puede recuperarse del medio empleando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitación,

centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación y/o precipitación.

El compuesto de la invención producido por la cepa en cultivo puede purificarse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, HPLC, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatoenfoque, y exclusión molecular), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico), SDS-PAGE, precipitación o extracción, con el fin de obtener el compuesto de la invención sustancialmente puros.

El compuesto de la invención producido por la cepa en cultivo puede detectarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos de detección pueden incluir, por ejemplo aunque sin limitarnos, UPLC, UV, RMN, espectrometría de masas, o similares.

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) o a cualquiera de sus sales o tautómeros (a partir de ahora “compuesto de fórmula (I) de la invención”)



(I)

donde R se selecciona entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido o acilo sustituido o no sustituido.

En los compuestos de la presente invención, R se selecciona preferentemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_6 sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_6 sustituido o no sustituido, alquilacilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, bencilo sustituido o no sustituido y benzoilo sustituido o no sustituido.

Más preferentemente el grupo R se elige de entre hidrógeno, metilo sustituido o no sustituido, etilo sustituido o no sustituido, n-propilo sustituido o no sustituido, iso-propilo sustituido o no sustituido, n-butilo sustituido o no sustituido, terc-butilo sustituido o no sustituido, vinilo sustituido o no sustituido, alilo sustituido o no sustituido, etinilo sustituido o no sustituido, acetilo sustituido o no sustituido, bencilo sustituido o no sustituido o benzoilo sustituido o no sustituido.

Incluso más preferentemente, el grupo R se selecciona de entre hidrógeno, acetilo, bencilo y benzoilo

Incluso todavía más preferido es el compuesto en el que R es hidrógeno.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende la cepa de la invención, el sobrenadante de la invención o el compuesto de fórmula (I) de la invención. Dicha composición puede ser una composición farmacéutica o cosmética, que comprende la cepa de la invención, el sobrenadante de la invención o el compuesto de fórmula (I) de la invención, y un excipiente o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable. Preferiblemente, la composición de la invención comprende la cepa de la invención, el sobrenadante de la invención o el compuesto de fórmula (I) de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Se entiende por “cantidad terapéuticamente efectiva” la cantidad de cepa de la invención, sobrenadante de la invención o compuesto de la invención, que cuando se administra al sujeto para tratar un proceso tumoral o para tratar y/o prevenir una infección bacteriana produce el efecto deseado. Dicho efecto deseado puede ser, por ejemplo aunque sin limitarnos, eliminar o reducir el número de células tumorales o el número de bacterias causantes de la infección. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo pero sin limitarnos, del tipo de tumor o infección y su severidad, así como de la edad, peso, sexo, condición física, capacidad de respuesta o tolerancia, etc. del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención.

Los excipientes y vehículos farmacéutica o cosméticamente aceptables que pueden ser utilizados en la composición de la invención son los conocidos por los expertos en la materia.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por

ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante. la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo es el caso del fosfato de calcio dibásico, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El "vehículo farmacológicamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia o combinación de sustancias que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se debe administrar la composición de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dicha composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser, aunque sin limitarnos, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Ejemplos de vehículos son, aunque sin limitarnos, agua, aceites o surfactantes, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como por ejemplo, y sin sentido limitativo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, aceites de ricino, polisorbatos, ésteres de sorbitano, éter sulfatos, sulfatos, betaínas, glucósidos, maltósidos, alcoholes grasos, nonoxinoles, poloxámeros, polioxietilenos, polietilenglicoles, dextrosa, glicerol, digitonina y similares. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

La composición de la presente invención puede formularse para su administración a un animal, preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, granulas, barras, lápices, vaporizadores. aerosoles. etc.), semisólida (ungüento. crema, pomada, gel, hidrogel, espuma, loción, jabón, jalea, gelatina, etc.) o liquida (soluciones acuosas o no acuosas, soluciones hidroalcohólicas o hidroglicólicas, suspensiones, emulsiones, jarabes, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, linimentos. sueros, etc.) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida o de cualquier otro sistema convencional de liberación. El término "liberación sostenida" se utiliza en sentido convencional refiriéndose a un sistema de vehiculización de un compuesto que proporciona la liberación gradual de dicho compuesto durante un período de tiempo y preferiblemente, aunque no necesariamente, con niveles de liberación del compuesto relativamente constantes a lo largo de un período de tiempo. Ejemplos ilustrativos de vehículos o sistemas de liberación sostenida incluyen, aunque no se limitan a, liposomas, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, ciclodextrinas, vesículas, micelas, micelas mixtas de tensioactivos, micelas mixtas fosfolípidotensioactivo, miliesferas, microesferas, nanoesferas, lipoesferas, microemulsiones, nanoemulsiones, minipartículas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas, nanopartículas sólidas lipídicas, soportes lipídicos nanoestructurados, materiales poliméricos, parches o implantes biodegradables o no biodegradables, o micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardíaca, intramuscular, intranasal, intracraneal. cutánea o subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, oftalmológica u ocular, mediante parches transdérmicos o vía rectal o vaginal, mediante la administración de un supositorio o encapsulado, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

Las composiciones de la presente invención son aptas para su aplicación mediante dispositivos médicos que permitan la liberación del principio activo en concentraciones adecuadas para el tratamiento de procesos tumorales o infecciones bacterianas. Estos dispositivos deben ser, preferiblemente, adecuados para la administración del principio activo de forma local, permitiendo que el tratamiento actúe en la zona afectada y no se disperse. Los dispositivos pueden, por ejemplo, pero sin limitarse, llevar el principio activo en su interior o ir recubiertos con el mismo.

El uso de la cepa de la invención, del sobrenadante de la invención, del compuesto de fórmula (I) de la invención o de la composición de la invención puede ser usado tanto en el tratamiento del cáncer como en la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas, preferiblemente de enfermedades de origen infeccioso provocadas por bacterias patógenas resistentes o multi-resistentes, y en la inhibición de la formación de biopelículas bacterianas sobre cualquier superficie.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del sobrenadante de la invención, del compuesto de fórmula (I) de la invención o de la composición, preferiblemente farmacéutica, de la invención, para la elaboración de un medicamento. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al sobrenadante de la invención, el compuesto de fórmula (I) de la invención o la composición de la invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del sobrenadante de la invención, del compuesto de fórmula (I) de la invención o de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al sobrenadante de la invención, el compuesto de fórmula (I) de la invención o la composición de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas.

El compuesto de fórmula (I) de la invención es inhibidor del crecimiento de tumores y es por tanto útil en el tratamiento del cáncer.

De esta forma, están incluidas en 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 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Está también incluido 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.

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

Está también incluido 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.

Está también incluido 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.

Esta también incluido 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.

Está también incluido 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.

En otra realización preferida, el medicamento al que se refiere la presente invención es para el tratamiento del 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 páncreas y mama, pero no están limitados a ovario, próstata, testículo, melanoma, riñón, sistema nervioso central y leucemia (etc.). 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.

En otra realización preferida, el medicamento al que se refiere la presente invención es como agente antibacteriano para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas.

Se entiende por “agente antibacteriano” una sustancia química, producida de forma sintética o natural (sintetizada por ejemplo por hongos o bacterias), que inhibe el crecimiento (bacteriostático) o mata (bactericida) a las bacterias. El agente antibacteriano

puede ser, por ejemplo aunque sin limitarnos, un antibiótico, un inhibidor de la bomba de eflujo o un agente permeabilizante de la membrana bacteriana.

Las infecciones bacterianas a las que se refiere la presente invención son provocadas por una bacteria Gram positiva. En una realización más preferida, las infecciones bacterianas a las que se refiere la presente invención son provocadas por una bacteria de la especie *Staphylococcus aureus*.

En una realización preferida, el medicamento al que se refiere la presente invención es para el tratamiento y/o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas o enfermedades provocadas por infecciones bacterianas. Más preferiblemente, dichas enfermedades se seleccionan de la lista que consiste en: infecciones cutáneas (tales como impétigo, foliculitis, celulitis, abscesos, infección de heridas), osteomielitis, mastitis, faringoamigdalitis, conjuntivitis, epiglotitis, otitis, meningitis, meningococemia, bacteriemia, sepsis, endocarditis, infecciones del tracto respiratorio (tales como neumonía o sinusitis), infecciones intraabdominales (colecistitis, peritonitis, abscesos viscerales), así como infecciones nosocomiales.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta invención, hace referencia a cualquier sustancia usada para el tratamiento de tumores y la prevención, alivio, tratamiento o curación de infecciones en el hombre, o cualquier otro animal, y plantas. En el contexto de la presente invención, este término se refiere a una preparación que comprenda el sobrenadante de la invención, el compuesto de fórmula (I) de la invención o la composición de la invención.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario, incluyendo, pero sin limitarse, a las premezclas medicamentosas. Se entiende por “premezcla medicamentosa”, o “premezcla para alimentos medicamentosos”, todo medicamento veterinario preparado de antemano con vistas a la fabricación ulterior de alimentos medicamentosos. Se entiende por “alimento medicamentoso” toda mezcla de medicamento(s) veterinario(s) y de alimento(s) preparada previamente a su comercialización y destinada a ser administrada a los animales sin transformación, en razón de las propiedades curativas o preventivas o de otras propiedades del medicamento.

El medicamento de la invención puede utilizarse tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el tratamiento de procesos tumorales. Así, los medicamentos de la presente invención pueden ser empleados junto a otros principios activos o terapias a modo de terapia combinada. Los otros principios activos pueden formar parte de la misma composición o bien pueden ser proporcionados mediante una composición distinta, siendo administrados al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

La composición de la presente invención, preferiblemente farmacéutica o cosmética, puede incluir alternativa o adicionalmente otro antibiótico, antibacteriano y/o antifúngico, fungicida o fungistático.

EL término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la infección, enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

(i) inhibir la infección, enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;

(ii) aliviar la infección, enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la infección, enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;

(iii) estabilizar la infección, enfermedad o la condición patológica.

El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la infección o enfermedad infecciosa o biopelícula bacteriana, es decir, evitar la aparición de una biopelícula en una superficie o evitar que se produzca la infección o la enfermedad infecciosa en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular cuando dicho sujeto tiene predisposición para sufrir una infección pero aún no se ha diagnosticado que la tenga, como es el caso, por ejemplo, de neonatos, ancianos o pacientes inmunodeprimidos o sometidos recientemente a intervención quirúrgica.

El término “infección” es el término clínico empleado para describir la colonización de un organismo huésped por microorganismos de otras especies. En clínica, el organismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y supervivencia del huésped. Como se usa aquí, el término “enfermedades infecciosas bacterianas” o “enfermedades de origen infeccioso provocadas por bacterias” se refiere a enfermedades precedidas por una infección bacteriana, incluyendo infecciones sistémicas (bacteriemia y sepsis) e infecciones en cualquier órgano o tejido del organismo huésped. Los órganos o tejidos incluyen, pero sin limitación, músculo esquelético, piel, tejidos blandos o mucosas, torrente sanguíneo, riñones o cualquier otro tejido del tracto urinario, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, órganos sexuales, oído, ojo, corazón, pulmones o hueso. Estas infecciones pueden estar causadas por bacterias Gram positivas y/o Gram negativas.

En la presente invención, dichas infecciones ocurren en un sujeto que puede ser, pero sin limitarnos, un animal, en particular un mamífero y más particularmente un humano, o un animal doméstico, por ejemplo cerdo, ratón, rata, gato, jerbo, conejo, perro, mono, chimpancé, etc., o un ave.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de la invención, del sobrenadante de la invención, del compuesto de fórmula (I) de la invención o de la composición de la invención para la eliminación y/o prevención y/o inhibición de la formación de biopelículas bacterianas, preferiblemente sobre superficies inertes, es decir *ex vivo*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, las biopelículas bacterianas son provocadas por una o más bacterias del género *Staphylococcus*. En una realización

más preferida, las biopelículas bacterianas son provocadas por bacterias de la especie *Staphylococcus aureus*.

Se entiende por “biopelículas” o “biofilms” las comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o a un tejido *in vivo* o *ex vivo* (en cultivo). Es una comunidad de bacterias (de una única especie o varias) que se adhiere a una superficie sólida. Las biopelículas son una causa común de infecciones bacterianas, tanto en humanos como en otros animales y plantas. Ejemplos de biopelículas son aquellas que se forman en la cavidad oral, tales como las caries (placa dental) o enfermedad periodontal.

Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, pero se ha sugerido que las bacterias del biofilm pueden producir exotoxinas, se pueden liberar grupos de bacterias al torrente sanguíneo, se vuelven resistentes a la acción fagocitaría de las células del sistema inmune y, por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos. Este último aspecto puede ser especialmente relevante dado que las bacterias resistentes originadas en un biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario.

Por otro lado, la contaminación biológica de superficies por formación de biofilms es común, pudiendo desarrollarse el biofilm sobre superficies hidrófobas, hidrófilas, bióticas o abióticas, y conduce a la degradación del material, productos de contaminación, bloqueo mecánico e impedancia de la transferencia de calor en procesos acuáticos. Los biofilms son también la primera causa de contaminación biológica en alimentos, catéteres, drenajes o implantes, así como en los sistemas de distribución de agua potable, y otras conducciones, siendo especialmente importante el control de biofilms en los sistemas antiincendios.

El término “Gram positiva” se refiere a las bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta en el protocolo de tinción Gram e incluyen, pero sin limitarse, *Staphylococcus* (incluyendo *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. hominis, S. saprophytics*). *Streptococcus* (incluyendo *Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. agalactiae, S. avium, S. bovis, S. lactis, S. sanguis* y *Streptococcus* del grupo C, *Streptococcus* del grupo G y *Streptococcus viridans*), *Enterococcus* (incluyendo *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*), *Clostridium, Corynebacterium, Listeria monocytogenes, Corynebacterium jeikeium, Chlamydia* spp. (incluyendo *C. pneumoniae*), *Micrococcus* y *Mycobacterium* tuberculosis. Las cepas habituales de *S. aureus* son resistentes a la penicilina. La aparición de cepas de esta especie resistentes a la meticilina y vancomicina representa un serio problema sanitario.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de la figura

FIG. 1. Árbol filogenético obtenido por el método "neighbour-joining" obtenido por análisis matriciales de distancias de las secuencias del gen 16S rRNA, mostrando la posición de *Streptomyces carnosus* M-207 y sus parientes filogenéticos más próximos.

Los números de los nodos son valores *bootstrap* (1000 muestreos; solo se presentan valores >50%). La barra indica un 0.5% de divergencia de secuencias.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. que ponen de manifiesto la efectividad de la cepa de la invención en la producción de un nuevo compuesto de la familia de las loboforinas (designado en la presente invención como loboforina K), con actividad antitumoral así como actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas Gram positivas.

Ejemplo 1. Sección experimental

Procedimientos experimentales generales

Los análisis y separaciones mediante HPLC semipreparativo se llevaron a cabo utilizando un sistema cromatográfico de Alliance con una columna SunFire C18 (10 µm, 10 x 250 mm, Waters). Para los análisis de UPLC se usó un UPLC Acquity equipado con una columna BEH C18 (1,7 µm, 2.1 x 100 mm, Waters). La rotación óptica fue determinada con un polarímetro JASCO P-2000. Los espectros de IR fueron medidos con un espectrómetro JASCO FT/IR-4100 equipado con un accesorio ATR de PIKE MIRacle™ (reflexión simple). Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III (500 y 125 MHz para ^{1}H y ^{13}C RMN, respectivamente) equipado con una sonda TCI MicroCryoProbe™ de 1,7 mm, usando la señal del solvente residual como referencia interna (δ_H 7,27 y δ_C 77,0 ppm para $CDCl_3$). Los espectros de HRESIMS fueron adquiridos usando un espectrómetro de masas Bruker maXis QTOF.

Microorganismos y condiciones de fermentación

La cepa M-207 (CECT 9162) fue aislada de una muestra de coral de profundidad recogida en el mar Cantábrico a una profundidad de 1.800 m. 30 matraces Erlenmeyer (250 ml), conteniendo cada uno 50 ml de medio R5A, anteriormente descrito (Braña *et al.*, 2014. Microb Ecol 69: 512-24), fueron inoculados con esporas y se incubaron en un agitador orbital a 28ºC y 250 rpm durante 4 días.

Análisis filogenético (taxonomía) del microorganismo productor

La cepa M-207 (CECT 9162) fue sometida a análisis filogenético en base al análisis de la secuencia del 16S rRNA. El análisis filogenético fue realizado usando MEGA versión 6.0 después de un alineamiento múltiple de los datos mediante CLUST ALO. Las distancias (opciones de distancia según el modelo de dos parámetros de Kimura) y alineamiento con el método *neighbour-joining* fueron determinadas usando valores *bootstrap* basadas en 1000 replicaciones.

Actividad antimicrobiana del compuesto

Para probar las propiedades antibióticas del compuesto se utilizaron métodos previamente descritos (Audoin *et al.*, 2013, Mar Drugs 11: 1477-1489). El compuesto se diluyó en serie en DMSO con un factor de dilución de 2 para proporcionar 10 concentraciones para todos los ensayos. La CMI se definió como la concentración más baja del compuesto que inhibe ≥ 90% del crecimiento de un microorganismo después de la incubación durante la noche. El Software Genedata discriminador (Genedata, Inc.) fue utilizado para analizar los datos y calcular el factor RZ' para estimar la solidez de las pruebas (Zhang el al., 1999, Biomol Screen 4: 67-73). En todos los experimentos realizados el factor RZ' obtenido fue entre 0,85 y 0,92. El compuesto fue probado en dos días diferentes y en triplicado en las concentraciones de ensayo final entre 160 µg/ml y de 0,31 µg/ml.

Actividad citotóxica del compuesto

Los ensayos calorimétricos MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio), que miden la actividad metabólica mitocondrial, se realizaron con cinco líneas de células tumorales y una línea de células saludables. diez mil células por pocillo (para análisis de 72 h) fueron introducidas en placas de 96 pocillos con un sistema robótica del cultivo celular, SelecT (TAP Biosystems, Royston, Reino Unido). Después de 24 h de incubación, el compuesto fue agregado con el sistema automatizado de manejo líquido Biomek FX (Beckman Coulter, Pasadena, CA), y las placas se incubaron durante 72 h adicionales. El compuesto fue ensayado por triplicado con las diluciones ½ de la curva. Se agregó MTI y las placas fueron leídas en un espectrofluorómetro Victor2TM Wallac (PerkinEimer).

Ejemplo 2. Resultados

Taxonomía de la ceca M-207

El 16S rDNA de la cepa productora M-207 (CECT 9162) fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciado. El análisis de la secuencia demostró una identidad del 100% con *Streptomyces carnosus* M-40 (HG965214). El árbol filogenético generado por el método de *neighbour-joining* basado en la secuencia del gen 16S rRNA reveló claramente la relación evolutiva de la cepa M-207 con un grupo de especies de *Streptomyces* conocidas (Figura 1). Por lo tanto, esta cepa fue identificada como *Streptomyces carnosus* M-207.

Aislamiento y purificación de loboforina K

Los cultivos se centrifugaron, se descartaron los sedimentos y los sobrenadantes fueron filtrados y aplicados a un cartucho de extracción en fase sólida (Sep-Pak Vac C18, 10g, Waters). El material retenido se eluyó con una mezcla de metanol y 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua. Un gradiente lineal de 0 a 100% metanol en 60 min, a 10 ml/min, fue utilizado. Las fracciones fueron recogidas cada 5 minutos y analizadas por UPLC con condiciones cromatográficas descritas (Braña *et al.*, 2014, Microb Ecol 69: 512-24). En fracciones tomadas entre 45 y 55 min se observó un pico correspondiente a una loboforina desconocida. Estas fracciones se agruparon y secaron en vacío, y el residuo fue posteriormente redisuelto en un pequeño volumen de DMSO y m etanol (1:1). El mismo pico también fue encontrado en el extracto orgánico de los sedimentos del

cultivo, que fue procesado en la misma forma. El compuesto deseado se purificó por HPLC preparativa usando una columna SunFire C18 (10 µm, 10 x 250 mm, Waters). La fase móvil era una mezcla de acetonitrilo y 0.05% TFA en el agua en condiciones isocráticas, a 7 ml/mín. La purificación se realizó en dos pasos, con 90% de acetonitrilo en el primer paso y el 50% en el segundo paso. En ambos casos, la solución que contiene el pico recogido fue parcialmente evaporada en el rotavapor para reducir la concentración de solvente orgánico y luego aplicada a un cartucho de extracción en fase sólida (Sep-Pak C18, aguas). El cartucho fue lavado con agua, el compuesto retenido fue eluido con metanol y finalmente liofilizado, con un rendimiento de 1,9 mg de producto en estado puro.

Loboforina K: sólido amarillo; $[\alpha]^{20}_{D}$ -102.2º (*c* 0.1, MeOH); IR (ATR) v_{max} 3427, 2931, 1708, 1630, 1549,1454, 1412, 1378, 1126, 1095, 1060, 1013, 926, 868 cm^{-1}; para los datos de ^{1}H y ^{13}C NMR ver Tabla 1; HRESIMS *m/z* 1173.6346 $[M+H]^{+}$ (calcd. para $C_{61}H_{93}N_2O_{20}^{+}$, 1173.6316), 1190.6610 $[M+NH_4]^{+}$ (calcd. para $C_{61}H_{96}N_3O_{20}^{+}$, 1190.6582), 1195.6154 $[M+Na]^{+}$ (calcd. para $C_{61}H_{92}N_2O_{20}Na^{+}$, 1195.6136).

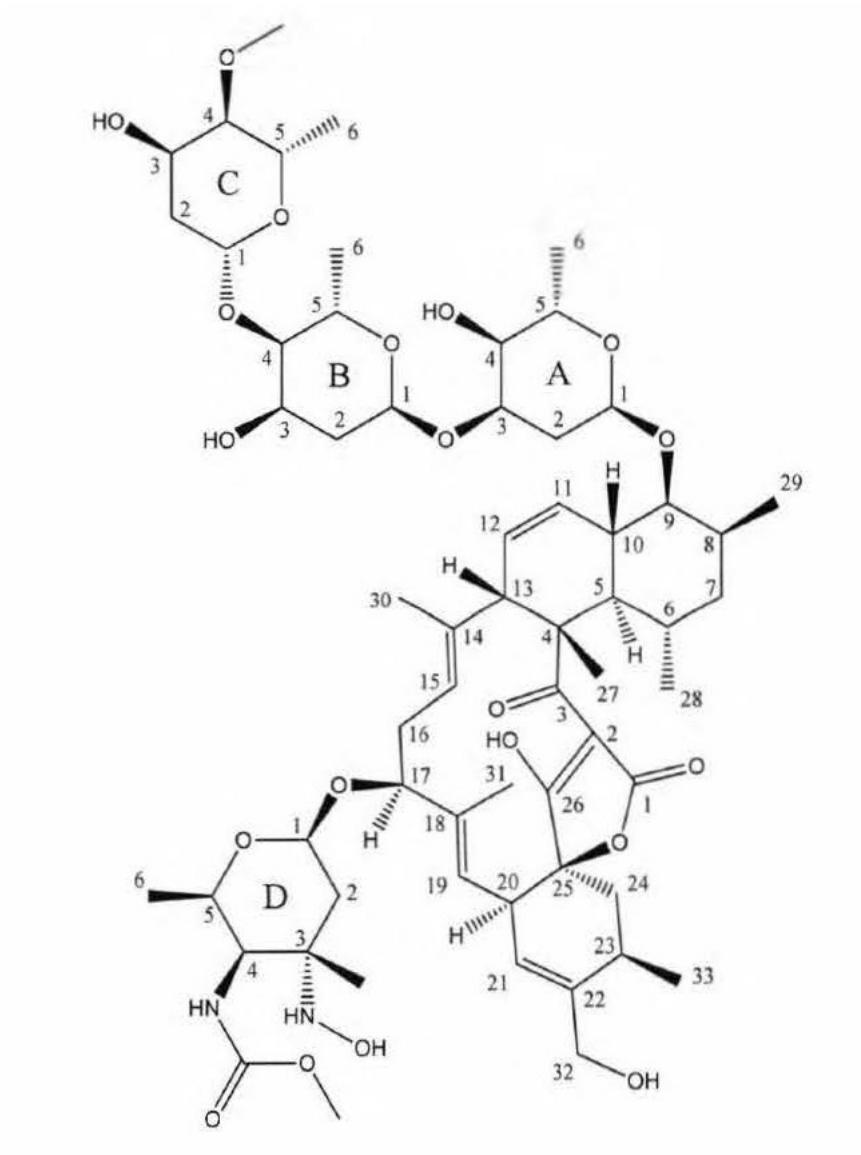
Elucidación estructural

La loboforina K tiene como fórmula molecular $C_{61}H_{92}N_2O_{20}$ de acuerdo con el ion protonado a m/z 1173.6346 observado en su espectro ESI-TOF (calc. para $C_{61}H_{93}N_2O_{20}^{+}$, 1173.6316, Δ 2.6 ppm). Las señales observadas en sus espectros de ^{1}H y ^{13}C RMN (Tabla 1) son indicativas de una estructura tipo loboforina para el compuesto. La molécula presenta un átomo de oxígeno adicional con respecto a la loboforina A y las principales diferencias entre el espectro de este nuevo compuesto y los de otras loboforinas se encontraron en torno al residuo de desoxiaminoazúcar unido al carbono C17 (unidad D). En la mayoría de los compuestos de la serie de loboforinas, un sustituyente amino ($-NH_2$) o nitro ($-NO_2$) se encuentra en la posición D3. Es de interés que la nueva loboforina presenta un grupo hidroxilamina (-NHOH) sustituyendo esa posición. Esto representa un estado de oxidación intermedio entre los grupos funcionales amino y nitro que se encuentran en la serie de las loboforinas en la posición D3. Este estado de oxidación intermedio representaría un producto biosintético intermediario entre ambos tipos de loboforinas. Para la loboforina H y loboforina I (de acuerdo a Lin *et al.*, 2014, J Antibiot (Tokyo) 67: 121-6), que llevan respectivamente un sustituyente amino y nitro en la posición 03. Los datos de RMN se han descrito en CD30D, lo que permite una comparación directa de los desplazamientos químicos observados para el anillo D con los de la nueva loboforina aquí presentada. Esta comparación reveló las diferencias esperadas, especialmente en la frecuencia de resonancia del carbono en la posición D3, que se encuentra a 61.6 ppm en la nueva loboforina y a 57.0 y 92.9 ppm en las loboforinas H e I respectivamente. El desplazamiento químico observado en la posición D3 para la nueva loboforina está de acuerdo con El desapantallamiento esperado para el grupo funcional hidroxilamino (61.6 ppm) con respecto al grupo amino (57.0 ppm), estando además fuertemente apantallado en comparación con el grupo funcional nitro (61.6 ppm vs. 92.9 ppm).

Tabla 1. Espectros ^{1}H y ^{13}C de RMN para la loboforina K (CD_3OD, 500 MHz)

	^{1}H RMN	^{13}C RMN		^{1}H RMN	^{13}C RMN
Posición	δ en ppm (mult, J en Hz)	δ en ppm	Posición	δ in ppm (mult, J en Hz)	δ en ppm
1	-	n. d.			
2	-	100.7	A1	4.77 (br d, 4.1)	99.7
3	-	205.0[a]	A2	2.39 (m), 1.74 (m)	31.0
4	-	52.4	A3	4.02 (dd, 6.1, 2.9)	69.3
5	2.08 (m)	44.8	A4	3.26 (dd, 9.6, 3.3)	73.4
6	1.61 (m)	32.5	A5	4.10 (m)	66.0
7	1.61 (m), 1.53 (m)	43.0	A6	1.21 (d, 6.4)	18.2
8	2.24 (m)	35.9			
9	3.42 (dd, 10.1, 5.3)	86.2	B1	5.17 (brd, 3.5)	93.2
10	2.09 (m)	39.7	B2	2.09 (m), 1.99 (dt, 14.6, 3.7)	35.9
11	5.81 (brd, 10.2)	127.2	B3	4.18 (dd, 6.5, 3.5)	68.1
12	5.38 (ddd, 10.2, 4.9, 1.8)	127.9	B4	3.29 (m)	83.3
13	3.65 (m)	52.7	B5	4.06 (m)	63.7
14	-	137.1	B6	1.21 (d, 6.3)	18.0
15	5.20 (brd, 9.4)	124.9			
16	2.40 (m), 2.26 (m)	32.5	C1	4.95 (dd, 9.7, 1.7)	100.7
17	4.20 (m)	80.3	C2	2.05 (m) , 1.72 (m)	38.8
18	-	139.3	C3	4.29 (dd, 5.8, 2.8)	64.4
19	5.12 (brd 10.5)	120.2	C4	2.85 (dd, 9.4, 2.8)	83.8
20	3.59 (brd, 10.4)	41.5	C5	3.81 (dq, 9.4, 6.2)	69.6
21	5.43 (brs)	122.7	C6	1.23 (d, 6.3)	18.6
22	-	142.5	C7	3.38 (s)	57.0
23	2.62 (brp)	29.0			
24	2.39 (m), 1.79 (d, 14.2)	36.4	D1	4.73 (dd, 9.8, 2.5)	99.2
25	-	84.9	D2	1.61 (m), 1.50 (dd, 14.3, 9.8)	37.5
26	-	200.9	D3	-	61.6
27	1.55 (s)	15.5	D4	3.66 (m)	54.1
28	0.65 (brd, 4.2)	22.9	D5	4.23 (qd, 6.4, 1.6)	69.4
29	1.14 (d, 7.0)	14.8	D6	1.08 (d, 6.4)	17.5
30	1.38 (brs)	14.2	D7	1.15 (s)	22.6
31	1.41 (brs)	15.3	D8	-	160.1
32	4.14 (brs), 4.09 (m)	65.0	D9	3.65 (s)	52.4
33	1.28 (d, 7.2)	20.5			

No determinado (n. d.); [a] obtenido del HMBC



Actividad citotóxica de la loboforina K

Actividad citotóxica fue observada para el compuesto a las concentraciones ensayadas frente a las línea celulares MiaPaca_2 de carcinoma pancreático y de MCF-7 de adenocarcinoma humano, así como la línea inmortalizada de hepatocitos THLE-2 (Tabla 2). Esta loboforina no presentó actividad, a la concentración máxima ensayada, frente a otras líneas tumorales humanas como pulmón (A-549), colon (HT-29) y hepatocarcinoma (HepG2).

Tabla 2. Actividad citotóxica de la loboforina K frente a diferentes líneas celulares tumorales

	Loboforina K (ED_{50} µM)
A549	>42.6
HT29	>42.6
HepG2	>42.6
MCF-7	23.04
MiaPaca_2	34.05
THLE2	6.30

Actividad antibacteriana de la loboforina K.

Para determinar las propiedades antibióticas de la molécula, se ha probado contra un panel de patógenos clínicos, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Como se muestra en la Tabla 3, la loboforina K muestra actividad moderada y selectiva frente a bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* EPI167, sensible a meticilina con una MIC_{90} de 40-80 µg/ml. No exhibió, sin embargo, propiedades notables como compuesto antiinfectivo frente a bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa, A. baumannii, K. pneumoniae* o *E. coli*.

Tabla 3. Valores de CIM90 del compuesto frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos.

	Loboforina K (CIM_{90} µg.mL^{-1})
Gram-positivos	
Staphylococcus aureus MSSA EPI167	40-80
Staphylococcus aureus MRSA	>160
Gram-negativos	
Acinetobacter baumanii 5973	>160
Pseudomonas aeruginosa 5919	>160
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	>160
Escherichia coli MB2884	>160

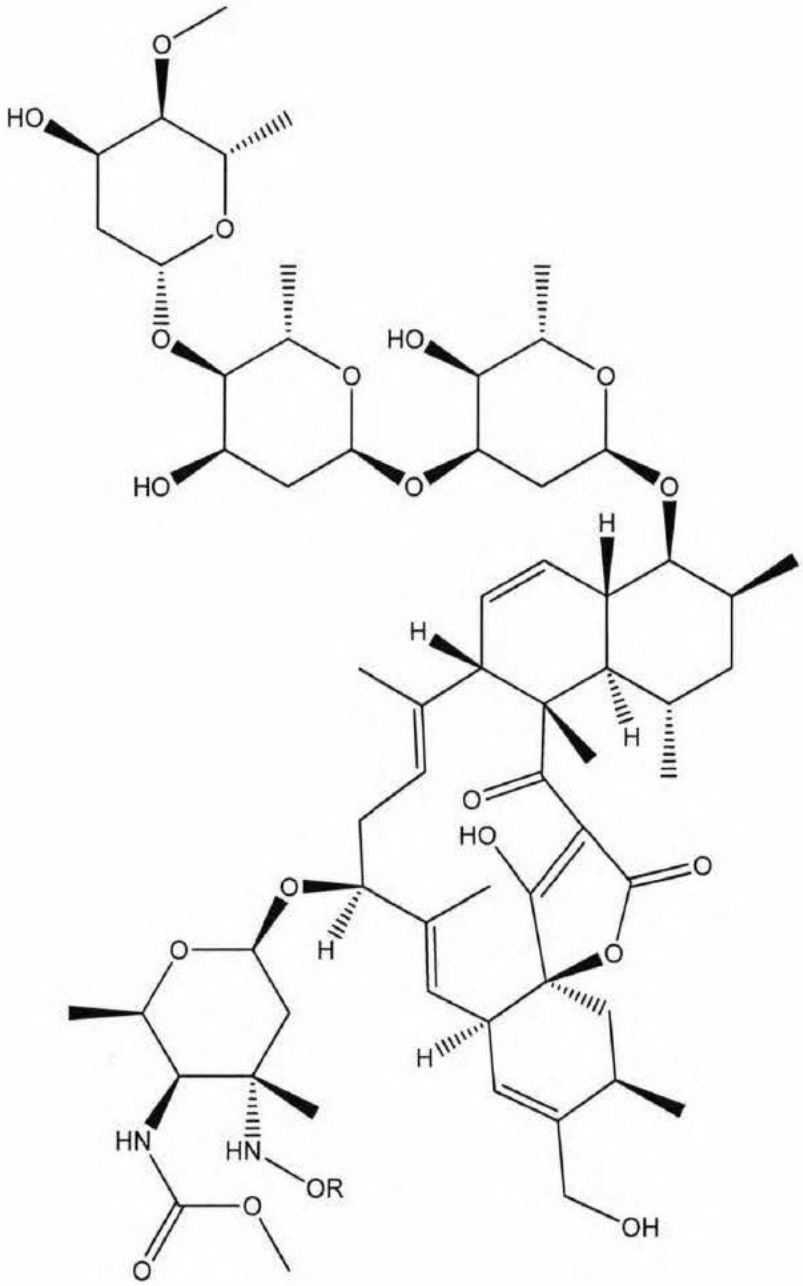
En conclusión, un nuevo producto natural, la loboforina K. fue aislado y caracterizado a partir de una actinobacteria marina, *Streptomyces carnosus* M-207, asociada a un coral de aguas frías de la especie Lophelia pertusa, recogido a 1.800 m de profundidad en el mar Cantábrico. Este compuesto exhibe importantes actividades citotóxicas contra líneas celulares tumorales humanas, así como actividades inhibitorias contra bacterias patógenas Gram-positivas. Estos resultados son un ejemplo de la relevancia de los productos naturales marinos como candidatos en quimioterapia antitumoral y antibacteriana.

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana de *Streptomyces carnosus* M-207 depositada en la Colección Española de Cultivo Tipo bajo el número de acceso 9162.

2. Sobrenadante de un cultivo de la cepa según la reivindicación 1.

3. Uso de la cepa según la reivindicación 1 para la producción del compuesto de fórmula (I) o cualquiera de sus sales o tautómeros:



(I)

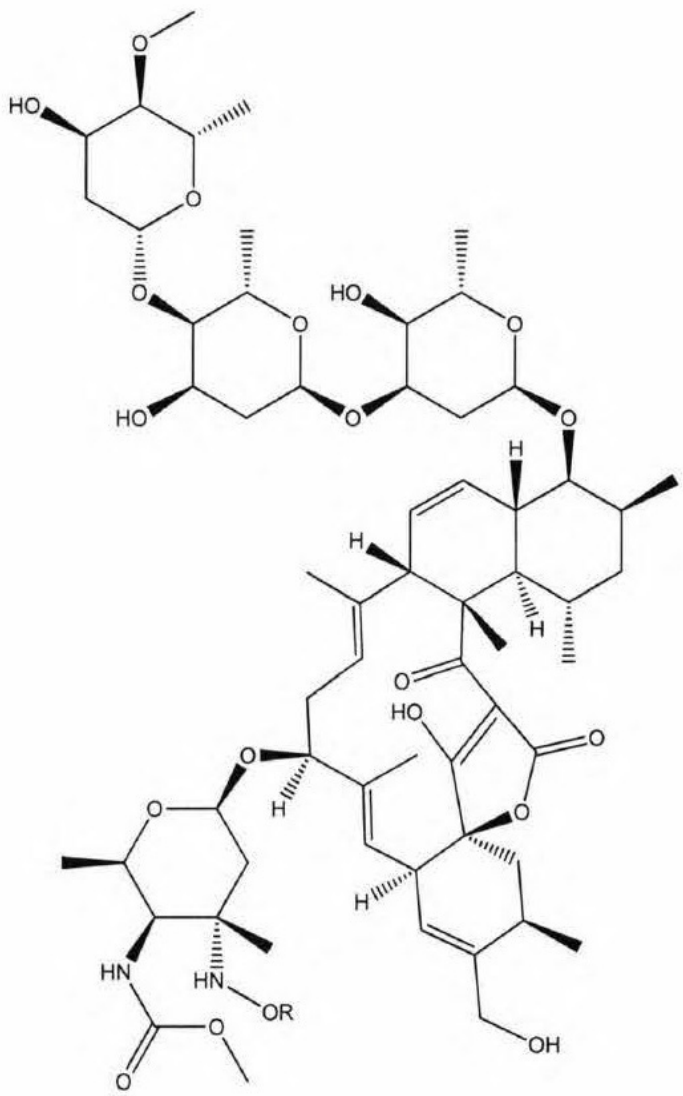
donde R se selecciona entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido o acilo sustituido o no sustituido.

4. Procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula general (I), o cualquiera de sus sales o tautómeros, descrito en la reivindicación 3 que comprende:

a. cultivar la cepa según la reivindicación 1 en un medio de cultivo en condiciones de fermentación, y

b. purificar el compuesto de fórmula (I) producido por la cepa en cultivo de la etapa (a).

5. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

o cualquiera de sus sales o tautómeros.

donde R se selecciona entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido o acilo sustituido o no sustituido.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 en el que R se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_6 sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_6 sustituido o no sustituido, alquilacil C_1-C_6 sustituido o no sustituido, bencilo sustituido o no sustituido y benzoilo sustituido o no sustituido.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 en el que R se elige de entre hidrógeno, metilo sustituido o no sustituido, etilo sustituido o no sustituido, n-propilo sustituido o no sustituido, iso-propilo sustituido o no sustituido, n-butilo sustituido o no sustituido, terc-butilo sustituido o no sustituido. vinilo sustituido o no sustituido, alilo sustituido o no sustituido, etinilo sustituido o no sustituido, acetilo sustituido o no sustituido, o benzoilo sustituido o no sustituido.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 en el que el grupo R se selecciona de entre hidrógeno, acetilo, bencilo y benzoilo.

9. Un compuesto según la reivindicación 8 en el que R es hidrógeno.

10. Composición que comprende el sobrenadante según la reivindicación 2 o el compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 5 a 9.

11. Composición según la reivindicación 10, que además comprende otro agente antitumoral y o antibacteriano.

12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, donde la composición es una composición farmacéutica o cosmética y además comprende un excipiente o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.

13. Uso del sobrenadante según la reivindicación 2, del compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 5 a 9o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, para la elaboración de un medicamento.

14. Uso del sobrenadante según la reivindicación 2, del compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 5 a 9 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de tumores y/o para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas.

15. Uso de la reivindicación 14, donde los tumores son de páncreas o de mama.

16. Uso según la reivindicación 14, donde las infecciones bacterianas son provocadas por bacterias Gram-positivas.

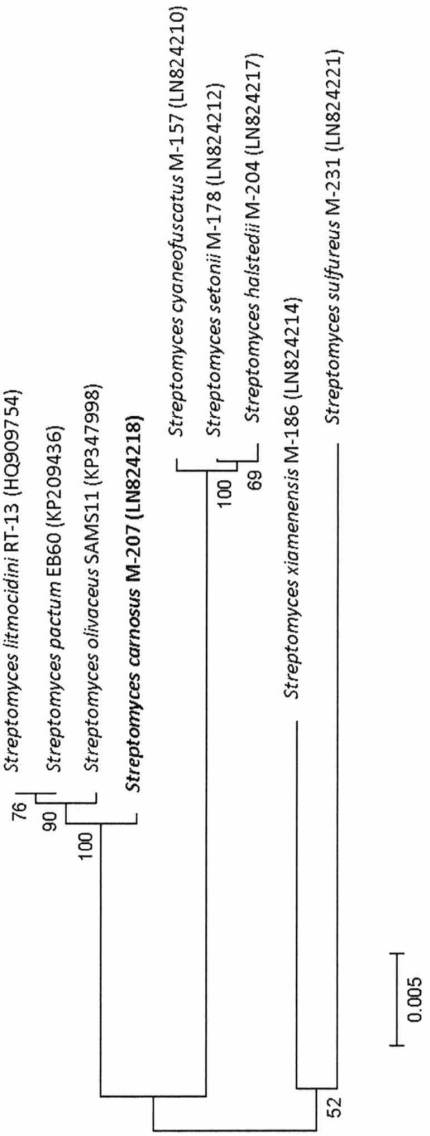
17. Uso según la reivindicación 16, donde la bacteria es *Staphylococcus aureus*.

18. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del sobrenadante según la reivindicación 2, del compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 5 a 9 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, para la eliminación y/o prevención de la formación de biopelículas bacterianas sobre superficies inertes.

19. Uso según la reivindicación 18, donde las biopelículas bacterianas son provocadas por bacterias del género *Staphylococcus*.

20. Uso según la reivindicación 19, donde la bacteria es *Staphylococcus aureus*.

Fig. 1


Streptomyces litmocidini RT-13 (HQ909754)
Streptomyces pactum EB60 (KP209436)
Streptomyces olivaceus SAMS11 (KP347998)
Streptomyces carnosus M-207 (LN824218)
Streptomyces cyaneofuscatus M-157 (LN824210)
Streptomyces setonii M-178 (LN824212)
Streptomyces halstedii M-204 (LN824217)
Streptomyces xiamenensis M-186 (LN824214)
Streptomyces sulfureus M-231 (LN824221)
76
90
100
100
69
52
0.005

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201600606

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.07.2016

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C07H17/04*** (2006.01)
A61K31/7048 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JIANG Z-D et al. Lobophorins A and B, new antiinflammatory macrolides produced by a tropical marine bacterium.Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19990719 Pergamon, AMSTERDAM, NL 19/07/1999 VOL: 9 No: 14 Pags: 2003 - 2006 ISSN 0960-894X Doi: doi:10.1016/S0960-894X(99)00337-6, página 2004, compuestos 1 y 2	1-20
A	WEI RONG-BIAN et al. Lobophorin C and D, New Kijanimicin Derivatives from a Marine Sponge-Associated Actinomycetal Strain AZS17.Marine Drugs MAR 2011 00/03/2011 VOL: 9 No: 3 Paginas: 359-368 ISSN 1660-3397(print) ISSN 1660-3397(electronic) Doi: doi:10.3390/md9030359, figura 3	1-20
A	NIU SIWEN et al. Lobophorins E and F, new spirotetronate antibiotics from a South China Sea-derived Streptomyces sp SCSIO 01127.Journal of Antibiotics (Tokyo) NOV 2011 00/11/2011 VOL: 64 No: 11 Paginas: 711-716 ISSN 0021-8820(print) ISSN 0021-8820(electronic) Doi: doi:10.1038/ja.2011.78, figura 2	1-20

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
28.02.2017	H. Aylagas Cancio	1/5

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201600606

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.07.2016

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C07H17/04*** (2006.01)
A61K31/7048 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHEN CAIXIA et al. Three antimycobacterial metabolites identified from a marine-derivedStreptomycessp. MS100061.Applied Microbiology and Biotechnology, 20130117 Springer, DE 17/01/2013 VOL: 97 No: 9 Pags: 3885 - 3892 ISSN 0175-7598 Doi: doi:10.1007/s00253-012-4681-0 Malhautier Luc, figura 1.	1-20
A	PAN HUA-QI et al. New Spirotetronate Antibiotics, Lobophorins H and I, from a South China Sea-Derived Streptomyces sp 12A35.Marine Drugs OCT 2013 00/10/2013 VOL: 11 No: 10 Pags: 3891-3901 ISSN 1660-3397(print) ISSN 1660-3397(electronic) Doi: doi:10.3390/md11103891, figura 3.	1-20
A	BRAÑA AFREDO F et al. TwoStreptomycesSpecies Producing Antibiotic, Antitumor, and Anti-Inflammatory Compounds Are Widespread Among Intertidal Macroalgae and Deep-Sea Coral Reef Invertebrates from the Central Cantabrian Sea.MICROBIAL ECOLOGY, 20141016 SPRINGER VERLAG, NEW YORK, NY, US 16/10/2014 VOL: 69 No: 3 Paginas: 512 - 524 ISSN 0095-3628 Doi: doi:10.1007/s00248-014-0508-0 Talbot Jennifer; Sayer Emma, tabla 3 y figura 3	1-20

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado
☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
28.02.2017	H. Aylagas Cancio	2/5

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

C07H, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.02.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-20	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-20	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JIANG Z-D et al. Lobophorins A and B, new anti-inflammatory macrolides produced by a tropical marine bacterium.Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19990719 Pergamon, AMSTERDAM, NL 19/07/1999 VOL: 9 No: 14 Paginas: 2003 - 2006 ISSN 0960-894X Doi: doi:10.1016/S0960-894X(99)00337-6, página 2004, compuestos 1 y 2	19.07.1999
D02	WEI RONG-BIAN et al. Lobophorin C and D, New Kijanimicin Derivatives from a Marine Sponge-Associated Actinomycetal Strain AZS17.Marine Drugs MAR 2011 00/03/2011 VOL: 9 No: 3 Paginas: 359-368 ISSN 1660-3397(print) ISSN 1660-3397(electronic) Doi: doi:10.3390/md9030359, figura 3	28.02.2011
D03	NIU SIWEN et al. Lobophorins E and F, new spirotetronate antibiotics from a South China Sea-derived Streptomyces sp SCSIO 01127.Journal of Antibiotics (Tokyo) NOV 2011 00/11/2011 VOL: 64 No: 11 Paginas: 711-716 ISSN 0021-8820(print) ISSN 0021-8820(electronic) Doi: doi:10.1038/ja.2011.78, figura 2	31.10.2011
D04	CHEN CAIXIA et al. Three antimycobacterial metabolites identified from a marine-derivedStreptomycessp. MS100061.Applied Microbiology and Biotechnology, 20130117 Springer, DE 17/01/2013 VOL: 97 No: 9 Paginas: 3885 - 3892 ISSN 0175-7598 Doi: doi: 10.1007/s00253-012-4681-0 Malhautier Luc, figura 1.	17.01.2013
D05	PAN HUA-QI et al. New Spirotetronate Antibiotics, Lobophorins H and I, from a South China Sea-Derived Streptomyces sp 12A35.Marine Drugs OCT 2013 00/10/2013 VOL: 11 No: 10 Pags: 3891-3901 ISSN 1660-3397(print) ISSN 1660-3397(electronic) Doi: doi: 10.3390/md11103891, figura 3.	30.09.2013
D06	BRAÑA AFREDO F et al. TwoStreptomycesSpecies Producing Antibiotic, Antitumor, and Anti-Inflammatory Compounds Are Widespread Among Intertidal Macroalgae and Deep-Sea Coral Reef Invertebrates from the Central Cantabrian Sea.MICROBIAL ECOLOGY, 20141016 SPRINGER VERLAG, NEW YORK, NY, US 16/10/2014 VOL: 69 No: 3 Paginas: 512 - 524 ISSN 0095-3628 Doi: doi:10.1007/s00248-014-0508-0 Talbot Jennifer; Sayer Emma, tabla 3 y figura 3	16.10.2014

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

La presente solicitud se refiere a una cepa bacteriana de Streptomyces carnosus M-207, el sobrenadante obtenido de su cultivo y al uso de la cepa para la producción de un compuesto de fórmula I (loboforinas). Se reivindican así mismo los compuestos, específicamente la loboforina K, procedimiento de obtención de los mismos y uso para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de tumores y/o para el tratamiento y/o prevención de enfermedades bacterianas.
Son conocidas en el estado de la técnica las loboforinas, productos naturales de origen marino, derivados de espirotetronato. Así en el documento D1 se citan las loboforinas A y B (ver página 2004, compuestos 1 y 2) con potente actividad antiinflamatoria. Loboforinas C y D (documento D2, figura 3) obtenidas a partir de Streptomyces carnosus cepa AZS17. Las loboforinas E y F (ver documento D3 figura 2) aisladas a partir del Streptomyces sp. SCSIO01127 se usan como antibióticos. La loboforina G junto con las ya antes comentadas A y B se describen en el documento D4 y se obtienen a partir del Streptomyces sp. MS100061 (ver figura 1). Las loboforinas H e I se describen en el documento D5 (ver figura 3) derivadas del Streptomyces sp. 12A35 y con actividad como antibióticos. En el documento D6 se citan especies de Streptomyces como productores de compuestos antibióticos, antitumorales y antiinflamatorios, así se identifica el Streptomyces carnosus M-40.
Ninguno de los documentos citados, ni ninguna combinación relevante de los mismos divulga ni dirige al experto en la materia hacia los compuestos reivindicados y específicamente a la loboforina K (Reiv. 5-9) ni a su uso en el tratamiento de las enfermedades bacterianas (Reiv. 13-17). Por lo tanto las reivindicaciones 5-17 relativa al compuesto y a la composición y a su uso terapéutico tienen novedad y actividad inventiva.

La cepa bacteriana de Streptomyces carnosus M-207 con número de acceso 9162 reivindicada en la presente solicitud es nueva ya que no se haya descrita en el estado de la técnica. Dado que el producto obtenido a partir de ella tiene actividad inventiva, se considera que la cepa también tiene actividad inventiva. Por lo tanto, las reivindicaciones 1-4 y 13-20 relativas a la cepa bacteriana, el sobrenadante oobtenido y el uso, son nuevas y tienen actividad inventiva
En consecuencia, a la vista de los documentos citados, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1- 20 de la presente solicitud tiene novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la LP.