

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 746**

21 Número de solicitud: 201700259

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C07D 309/08** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**13.03.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.05.2017**

Fecha de concesión:

**27.09.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**04.10.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.0%)**

**C/ San Francisco 3**

**33003 Oviedo (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**SARMIENTO VIZCAÍNO, Aida;**

**FERNÁNDEZ BRAÑA , Alfredo Javier;**

**GARCÍA DÍAZ , Luis Arsenio ;**

**ACUÑA FERNÁNDEZ, José Luis;**

**BLANCO BLANCO , María Gloria ;**

**REYES BENÍTEZ, José Fernando;**

**PÉREZ-VICTORIA MORENO DE BARREDA,**

**Ignacio;**

**MARTÍN SERRANO, Jesús Melchor;**

**VICENTE PÉREZ, María Francisca y**

**DE PEDRO MONTEJO, Nuria**

54 Título: **Cepa bacteriana de micromonospora matsumotoense productora de paulomicina y paulomicina producida por la misma**

57 Resumen:

Cepa bacteriana de Micromonospora matsumotoense productora de paulomicinas y paulomicina producida por la misma.

La invención proporciona una nueva cepa bacteriana de Micromonospora matsumotoense aislada de su medio natural y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso (CECT 9281), la cual es capaz de producir eficientemente por fermentación un compuesto antitumoral de la familia de las paulomicinas. Concretamente, esta cepa es productora de una nueva paulomicina, designada en la presente invención como paulomicina G, que presenta actividad citotóxica frente a células tumorales, preferiblemente humanas, preferiblemente de páncreas, mama e hígado.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

ES 2 613 746 B2

## DESCRIPCIÓN

**CEPA BACTERIANA DE MICROMONOSPORA MATSUMOTOENSE PRODUCTORA DE PAULOMICINAS Y PAULOMICINA 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, que se obtienen por fermentación de una cepa bacteriana productora de compuestos antitumorales de la familia de las paulomicinas. La invención también se refiere a una nueva paulomicina, la paulomicina G, 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, mama e hígado en humanos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Las paulomicinas son productos naturales glicosilados cuya estructura posee un residuo de ácido páulico, que incluye un grupo isotiocianato, con interés farmacológico debido a sus propiedades antibióticas. Las paulomicinas A y B son antibióticos con muy potentes actividades frente a bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y otros *Streptomyces*) y poseen uso terapéutico en el tratamiento de infecciones por gonococos y *Chlamydia* (Novak, 1988, Patent PCT/US1987/002420). Inicialmente descritas en *S. paulus* (Argoudelis *et al.*, 1982, J. Antibiot. 41:157–169) y más tarde en *S. albus* J1074 (Majer y Chater, 1987, Mol. Biol. Evol. 4: 406– 425), una serie de paulomicinas con varias modificaciones en las dos cadenas ramificadas de carbono de la paulomicosa se aislaron posteriormente de estas especies de *Streptomyces* (Argoudelis *et al.*, 1988. J. Antibiot. 41:1316–1330; Majer *et al.*, 1987, J. Gen. Microbiol. 133:2503–2507); Braña *et al.*, 2014, Arch Microbiol. 196: 345–355). La ruta biosintética de las paulomicinas constituye también un tema de investigación activo (Li *et al.* 2015, PLoS One.10:e0120542; González *et al.*, 2016, Microb. Cell. Fact. 15:56) y hasta la fecha no se ha descrito ninguna síntesis química.

En los océanos, los sedimentos son últimamente una de las fuentes marinas más estudiadas para el aislamiento de actinobacterias (Ward y Bora, 2006 Curr. Opin. Microbiol. 9:279-86; Hameş-Kocabaş y Uzel, 2012. J. Microbiol. Methods. 88:342-7). Trabajos anteriores 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: 512-24, Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2015, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 1328-34, Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2016, Microb. Ecol. 71:375-86). También se ha descrito que

5 las paulomicinas A y B son producidas por una cepa ubicua de *Streptomyces albidoflavus* ampliamente distribuida en ambientes terrestres, marinos y atmosféricos en la cornisa cantábrica (Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2016, Microb. Ecol. 71:375-86).

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una nueva cepa bacteriana de *Micromonospora*

10 *matsumotoense* que ha sido aislada de su medio natural y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso (CECT 9281), la cual es capaz de producir eficientemente por fermentación compuestos citotóxicos de la familia de las paulomicinas. Concretamente, esta cepa es productora de una nueva paulomicina designada en la presente invención como paulomicina G, que presenta actividades

15 citotóxicas frente a diferentes líneas celulares tumorales, preferiblemente humanas.

Los inventores de la presente invención han aislado dicha cepa, *Micromonospora matsumotoense* M-412, de los ecosistemas de arrecifes de coral el cañón submarino de Avilés. Dicha cepa fue estudiada e identificada posteriormente. Se describe por tanto en la presente invención dicha cepa, un procedimiento para obtener paulomicinas por

20 fermentación a partir de la misma y un nuevo producto natural de la familia de las paulomicinas con actividad citotóxica frente a líneas tumorales humanas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, líneas de adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de mama y carcinoma de hígado.

Divulgamos por tanto aquí el descubrimiento de un nuevo producto natural, la

25 paulomicina G, obtenida de *Micromonospora matsumotoense* M-412, aislada de un sedimento recogido a 2.000 m. de profundidad durante una expedición Oceanográfica en el cañón submarino de Avilés. Todas las paulomicinas conocidas son producidas por especies del género *Streptomyces*, por lo tanto, la paulomicina G es el primer miembro de la familia producido por una especie del género *Micromonospora*. La paulomicina G

30 es un novedoso producto natural, estructuralmente único ya que, según nuestro conocimiento es el primer miembro de la familia de las paulomicinas que carece del residuo de paulomicosa. También es la paulomicina bioactiva más pequeña que se conoce, la mínima paulomicina descrita. Dadas sus características estructurales, la paulomicina G es también de interés en estudios biosintéticos y podría ser útil en futuras

investigaciones de biosíntesis de paulomicinas, o como una estructura de base en la generación de nuevos derivados mediante biosíntesis combinatoria para generar diversidad estructural en la familia de las paulomicinas.

La paulomicina G es también el primer miembro de la familia que muestra fuertes actividades citotóxicas contra diferentes líneas celulares tumorales humanas, tales como adenocarcinoma de páncreas (MiaPaca\_2), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de hígado (HepG2). Estas actividades no aparecen sin embargo en la paulomicina B, que fue analizada en paralelo. En base a sus actividades citotóxicas, la paulomicina G merece ser considerada como candidato en la quimioterapia contra el cáncer.

Los inventores determinaron las condiciones de cultivo de la cepa para la producción de la nueva paulomicina, posteriormente purificaron la misma, procedieron a su elucidación estructural y ensayaron su actividad citotóxica frente a diversas líneas tumorales humanas.

La presente invención representa así una solución a la necesidad de disponer de nuevos compuestos antitumorales con potencial biomédico. Asimismo, representa una solución a la necesidad de disponer de procedimientos simples, cortos y económicos para la obtención de dicho compuesto con actividad antitumoral, 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 paulomicinas, 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.

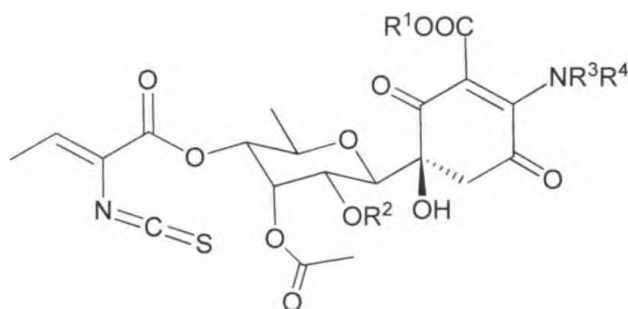
Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Micromonospora matsumotoense* M-412 depositada el 15.02.2017 en la Colección Española de Cultivo Tipo bajo el número de acceso CECT 9281. De ahora en adelante se hará referencia a esta cepa bacteriana como "cepa de 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 y condiciones de fermentación adecuados. 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<sup>1</sup> se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido.

R<sup>2</sup> se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alquilacilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, bencilo sustituido o no sustituido o benzoilo sustituido o no sustituido.

$R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, alquenilo  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido o alquinilo  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido, donde  $R_a$  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, arilo sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico 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:

- 10           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 oxígeno 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 5 y 8 días, más preferiblemente durante 7 días; a una temperatura esencialmente constante de entre 25 y 30°C, preferiblemente entre 27 y 29°C, más preferiblemente a 28°C; 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.

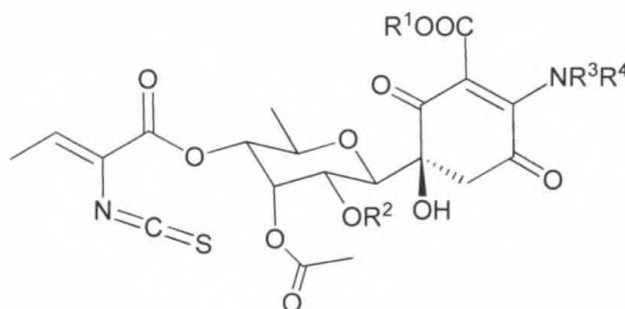
El compuesto de la invención secretado al medio de cultivo por la cepa de la invención puede recuperarse del medio empleando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, 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  
5 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.

10 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", "compuesto de la invención" o "paulomicina G"):



15 (I)

o cualquiera de sus sales o tautómeros

donde,

R<sup>1</sup> se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido.

20

Más preferentemente el grupo R<sup>1</sup> 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 o etinilo  
25 sustituido o no sustituido.

En otra realización preferida, el grupo R<sup>1</sup> se selecciona de entre hidrógeno y metilo.



En otra realización preferida, el grupo  $R^1$  es hidrógeno.

$R^2$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, alqueno  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido, alquino  $C_2-C_6$  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  $R^2$  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 y benzoilo sustituido o no sustituido.

Incluso más preferentemente, el grupo  $R^2$  se selecciona de entre hidrógeno, acetilo, bencilo y benzoilo.

En otra realización más preferida, el grupo  $R^2$  es hidrógeno.

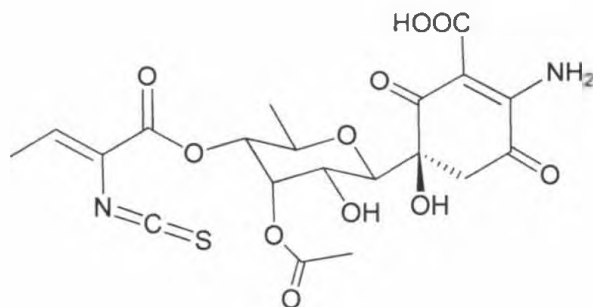
$R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, alqueno  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido y alquino  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido.

$R_a$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, alqueno  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido, alquino  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido.

Más preferentemente  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$  y alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, donde  $R_a$  se selecciona entre hidrógeno y alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido. Sustituyentes  $R_a$  particularmente preferidos son metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo y butilo, incluyendo n-butilo, terc-butilo, sec-butilo e iso-butilo.

Incluso todavía más preferido es el compuesto en el que  $R^3$  y  $R^4$  son hidrógeno.

En particular, la presente invención proporciona, entre otros, el compuesto con la siguiente fórmula (II):



(II)

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. En una realización preferida, dicha composición además comprende otro agente antitumoral.

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 produce el efecto deseado. Dicho efecto deseado puede ser, por ejemplo aunque sin limitarnos, eliminar o reducir el número de células tumorales. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo pero sin limitarnos, del tipo de tumor 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, betainas, glucósidos, maltósidos, alcoholes grasos, nonoxinóles, 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, gránulos, barras, lápices, vaporizadores, aerosoles, etc.), semisólida (ungüento, crema, pomada, gel, hidrogel, espuma, loción, jabón, jalea, gelatina, etc.) o líquida (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 fosfolípido-tensioactivo, 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, intracardiaca, 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, spray 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 en el tratamiento del cáncer.

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.

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.

- 5      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.

- 10      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 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.

- 15      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,  
20      pero no están limitados a ovario, próstata, testículo, melanoma, riñón, 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.

- 25      El término "medicamento", tal y como se usa en esta invención, hace referencia a cualquier sustancia usada para el tratamiento de tumores 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.

- 30      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 compuesto antitumoral.

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

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la infección, enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

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 "neighbor-joining" obtenido por análisis matriciales de distancias de las secuencias del gen 16S rRNA, mostrando la posición de *Micromonospora matsumotoense* M-412 y sus parientes filogenéticos más próximos.**

Los números de los nodos son valores *bootstrap* (1000 muestreos; solo se presentan valores >70%). La barra indica un 0.2% 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 paulomicinas (designado en la presente invención como paulomicina G), con actividad antitumoral frente a líneas tumorales humanas.

## 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 × 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 <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN, respectivamente) equipado con

una sonda TCI MicroCryoProbe™ de 1,7 mm, usando la señal del solvente residual como referencia interna ( $\delta_H$  2.50 y  $\delta_C$  39.5 ppm para DMSO- $d_6$ ). Los espectros de HRESIMS fueron adquiridos usando un espectrómetro de masas Bruker maXis QTOF.

#### Microorganismos y condiciones de fermentación

- 5 La cepa M-412 (CECT 9281) fue aislada de una muestra de sedimento recogida en el mar Cantábrico a una profundidad de 2.000 m. Se prepararon 20 matraces Erlenmeyer (250 ml), conteniendo cada uno 50 ml de medio GHSA con la siguiente composición: 1% glucosa, 1% harina de soja, 0.05% extracto de levadura, 2.1% MOPS, 0.06% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2% solución de oligoelementos del medio R5A (Fernández *et al.* 2015, J. Bacteriol 180:4929-4937), pH 6.8. Tras autoclavar, al medio se le añadió 0.4% de una  
10 solución 5M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 3% de DMSO. Los matraces se inocularon con esporas y se incubaron en un agitador orbital a 28 °C y 250 rpm durante 7 días.

#### Análisis filogenético (taxonomía) del microorganismo productor

- La cepa M-412 (CECT 9281) fue sometida a análisis filogenético en base al análisis de  
15 la secuencia del 16S rRNA. El análisis filogenético fue realizado usando MEGA versión 6.0 después de un alineamiento múltiple de los datos mediante CLUSTALO. 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 citotóxica del compuesto

- Los ensayos colorimétricos MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio), que miden la actividad metabólica mitocondrial, se realizaron con cinco líneas de células tumorales y una línea de células no tumoral. Diez mil células por pocillo (para análisis de 72 h) fueron introducidas en placas de 96 pocillos con un sistema  
25 robótico de cultivo celular, Select (TAP Biosystems, Royston, Reino Unido). Después de 24 h de incubación, el compuesto fue agregado con un pipeteador automático Biomek FX (Beckman Coulter, Pasadena, CA), y las placas se incubaron durante 72h adicionales. El compuesto fue ensayado por triplicado, empleando distintas concentraciones, en una curva de diluciones 1/2. Se agregó MTT y las placas fueron  
30 leídas en un espectrofluorómetro Victor2™ Wallac (PerkinElmer).

## EJEMPLO 2. RESULTADOS

### Taxonomía de la cepa M-412

El 16S rDNA de la cepa productora M-412 (CECT 9281) fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciado. El análisis de la secuencia  
 5 demostró una identidad del 100% con *Micromonospora matsumotoense* (accession number AF152109); por tanto, esta cepa fue designada como *Micromonospora matsumotoense* M-412. 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-412 con un grupo de especies de *Micromonospora* conocidas (Figura 1).

10

### Aislamiento y purificación de paulomicina G

Los cultivos se centrifugaron y los sedimentos se extrajeron con acetato de etilo con 1% de ácido fórmico. 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  
 15 usando un gradiente de metanol y 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua de 0 a 100% metanol en 60 min, a 5 ml/min. Se tomaron fracciones cada 5 min y se analizaron mediante UPLC usando condiciones cromatográficas previamente descritas (Braña et al., 2014, Microb Ecol 69: 512-24). En las fracciones recogidas entre 40 y 45 min se observó un pico correspondiente a una paulomicina desconocida. Estas fracciones se  
 20 agruparon, se secaron parcialmente al vacío y se aplicaron a un cartucho de extracción en fase sólida (Sep-Pak Vac C18, 2g, Waters). El cartucho se lavó con agua y los compuestos retenidos se eluyeron con metanol y se secaron al vacío. El residuo fue posteriormente redissuelto en un pequeño volumen de acetonitrilo y DMSO (2:1). El mismo pico de la paulomicina desconocida fue también encontrado en el extracto  
 25 orgánico de los sedimentos del cultivo, que fue secado y redissuelto como se ha indicado anteriormente. El compuesto deseado fue purificado mediante HPLC semipreparativa usando una columna Atlantis C18 (10 µm, 10 x 150 mm, Waters). La purificación se realizó en dos pasos. La fase móvil fue una mezcla de 50% acetonitrilo en agua en el primer paso y 55% metanol y agua en el segundo paso, usando elución isocrática a 5  
 30 ml/min. En ambos casos, la solución que contiene el pico recogido fue evaporada y finalmente liofilizada, con un rendimiento de 2.7 mg de producto en estado puro.

Paulomicina G: sólido amarillo pálido;  $[\alpha]_D^{20} + 10.6^\circ$  (c 0.18, MeOH); UV (DAD)  $\lambda_{\max}$  238, 276 y 320 nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3359, 3229, 2979, 2933, 2041, 1736, 1695, 1626, 1571, 1442, 1381, 1260, 1227, 1129, 1025, 909, 751  $\text{cm}^{-1}$ ; para los datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN ver Tabla 1; HRESIMS  $m/z$  521.0828  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{SNa}^+$ , 521.0837)  
 5 516.1278  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{S}^+$ , 516.1283), 499.1015  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. Para  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}^+$ , 499.1017).

### Elucidación estructural

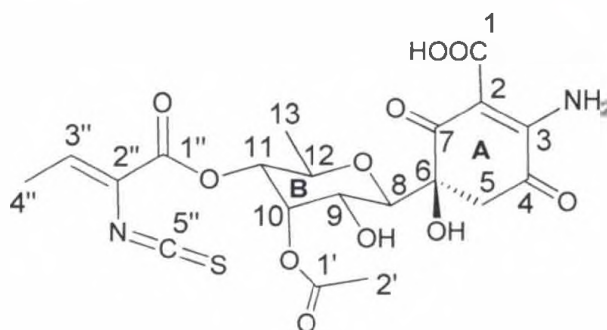
La paulomicina G tiene como fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}$  de acuerdo con sus datos de ESI-TOF MS ( $m/z$  499.1015  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calcd. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}^+$ , 499.1017). Su  
 10 espectro UV muestra máximos a 238, 276 y 320 nm, en concordancia con una estructura de tipo paulomicina. Una intensa banda de absorción a 2041  $\text{cm}^{-1}$  en su espectro IR confirmó la presencia en la molécula de un grupo isotiocianato, presente en el residuo de ácido páulico de todas las paulomicinas. Los espectros de RMN (Tabla 1) confirmaron la presencia de este residuo de ácido páulico, con señales para un grupo  
 15 metilo ( $\delta_{\text{H}}$  1.89,  $\delta_{\text{C}}$  14.6 ppm) acoplado a un protón  $sp^2$  ( $\delta_{\text{H}}$  6.71,  $\delta_{\text{C}}$  136.9 ppm) en el espectro COSY. Las correlaciones HMBC del último protón a los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  159.8 (grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado C1''), 122.3 ppm ( $sp^2$  carbono cuaternario C2''), 141.6 ppm (carbono isotiocianato C5'', distancia de correlación de 4-enlaces), y 14.6 ppm (metilo C4'') completaron la asignación estructural del residuo de ácido páulico.

20 Además, señales para un metileno alifático a  $\delta_{\text{H}}$  3.22 and 3.17 que se correlaciona en el espectro HMBC con señales de carbono a  $\delta_{\text{C}}$  159.4 (C3), 188.8 (C4), 77.5 (C6 y C8), y 197.5 (C7), y la presencia de dos señales adicionales a  $\delta_{\text{C}}$  169.0 y 99.1 ppm indicaron la presencia en la molécula de la subestructura del ácido 2-amino-5-hidroxi-3,6-dioxociclohex-1-enecarboxílico sustituido en posición C6, presente en la familia de  
 25 compuestos de las paulomicinas. Adicionalmente, señales para cinco metinos oxigenados a  $\delta_{\text{H}}$  3.69, 3.61, 5.29, 4.51, y 3.79 ppm, y un grupo metilo alifático a 0.88 ppm conformaron un sistema de spin, que de acuerdo con las correlaciones observadas en el espectro COSY, representan el anillo B en la estructura de la molécula. La conexión entre el carbono C6 del anillo A y el carbono C8 en el anillo B fue confirmada  
 30 adicionalmente mediante las correlaciones HMBC observadas entre H8 y C5, C6, y C7. Finalmente, se observaron señales para una funcionalidad acetilo ( $\delta_{\text{H}}$  2.10 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  170.1 y 20.8 ppm). Este grupo acetilo fue situado en C10 en base a correlaciones HMBC de H2' y H10 al carbono carbonílico C1' y el desplazamiento químico a campo bajo de

H10. El residuo de ácido páulico fue situado de manera similar en C11 en base a una correlación HMBC observada entre H11 y C1''. La configuración relativa propuesta en torno a los centros quirales en el anillo B se basó en constantes de acoplamiento y correlaciones observadas en el espectro NOESY, y la configuración absoluta se asumió que era la misma que en otros compuestos de la serie de paulomicinas.

Tabla 1. Datos de RMN ( $\delta$  en ppm) para la paulomicina G (DMSO- $d_6$ , 500 MHz, 24 °C).

| Pos.                | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ), (mult, $J$ en Hz) |
|---------------------|------------------------------|----------------------------------------------|
| 1                   | 169.0                        |                                              |
| 2                   | 99.1                         |                                              |
| 3                   | 159.4                        |                                              |
| 4                   | 188.8                        |                                              |
| 5                   | 47.7                         | 3.22 (d, 16.0), 3.17 (d, 16.0)               |
| 6                   | 77.5                         |                                              |
| 7                   | 197.5                        |                                              |
| 8                   | 77.5                         | 3.69 (d, 9.9)                                |
| 9                   | 67.0                         | 3.61 (br dt, 9.7, 3.3)                       |
| 10                  | 69.8                         | 5.29 (dd, 2.6, 2.6)                          |
| 11                  | 73.4                         | 4.51 (dd, 9.9, 2.6)                          |
| 12                  | 69.9                         | 3.79 (dq, 9.9, 6.2)                          |
| 13                  | 16.3                         | 0.88 (d, 6.2)                                |
| 1'                  | 170.1                        |                                              |
| 2'                  | 20.8                         | 2.10 (s)                                     |
| 1''                 | 159.8                        |                                              |
| 3''                 | 136.9                        | 6.71 (quart., 7.1)                           |
| 4''                 | 14.6                         | 1.89 (d, 7.1)                                |
| 5''                 | 141.6                        |                                              |
| NH <sub>2</sub> (3) |                              | 9.71 (br s), 9.35 (br s)                     |
| OH (6)              |                              | 5.43 (s)                                     |
| OH (9)              |                              | 5.78 (d, 4.4)                                |



#### Actividad citotóxica de la paulomicina G

Se observó actividad citotóxica para el compuesto a las concentraciones ensayadas frente a las líneas celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7),



adenocarcinoma pancreático (MiaPaca\_2) y carcinoma hepatocelular (HepG2) (Tabla 2). La paulomicina B no mostró ninguna actividad citotóxica frente a estas tres líneas celulares cuando se ensayó en paralelo.

Tabla 2. Actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares tumorales

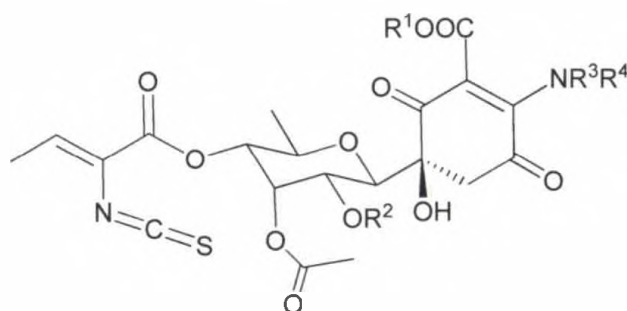
5

|           | Paulomicina G<br>(ED <sub>50</sub> μM) | Paulomicina B<br>(ED <sub>50</sub> μM) |
|-----------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| HepG2     | 4.3                                    | >36                                    |
| MCF-7     | 1.6                                    | >36                                    |
| MiaPaca_2 | 2.7                                    | >36                                    |

- 10 En conclusión, un nuevo producto natural, la paulomicina G, fue aislado y caracterizado a partir de una actinobacteria marina, *Micromonospora matsumotoense* M-412, obtenida de un sedimento recogido a 2.000 m de profundidad en el Cañón submarino de Avilés, en el mar Cantábrico. Este compuesto exhibe importantes actividades citotóxicas contra líneas celulares tumorales humanas. Estos resultados son un ejemplo de la relevancia
- 15 de los productos naturales marinos como candidatos en quimioterapia antitumoral.

# REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana de *Micromonospora matsumotoense* M-412 depositada en la Colección Española de Cultivo Tipo bajo el número de acceso CECT 9281.
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:

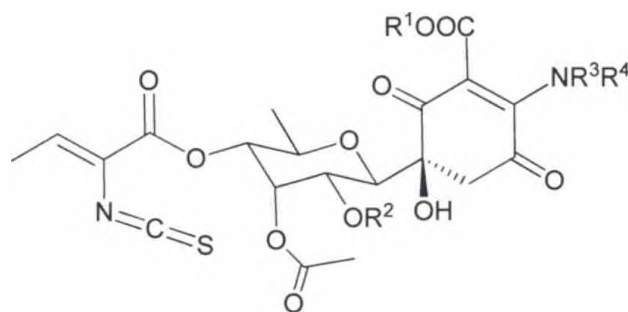


(I)

- donde,
- $\text{R}^1$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, alquenilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido o alquinilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido;
- $\text{R}^2$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, alquenilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, alquinilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, alquilacilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, bencilo sustituido o no sustituido o benzoilo sustituido o no sustituido;
- $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno,  $\text{COR}_a$ ,  $\text{COOR}_a$ , alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, alquenilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido o alquinilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, donde  $\text{R}_a$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, alquenilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, alquinilo  $\text{C}_2\text{-C}_6$  sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico 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,

$R^1$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, alquenilo  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido o alquinilo  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido;

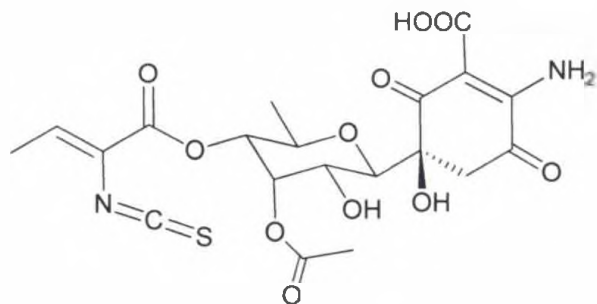
$R^2$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, alquenilo  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido, alquinilo  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido, alquilacilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, bencilo sustituido o no sustituido o benzoilo sustituido o no sustituido;

$R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, alquenilo  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido o alquinilo  $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido donde  $R_a$  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, arilo sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el grupo  $R^1$  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 o etinilo sustituido o no sustituido.

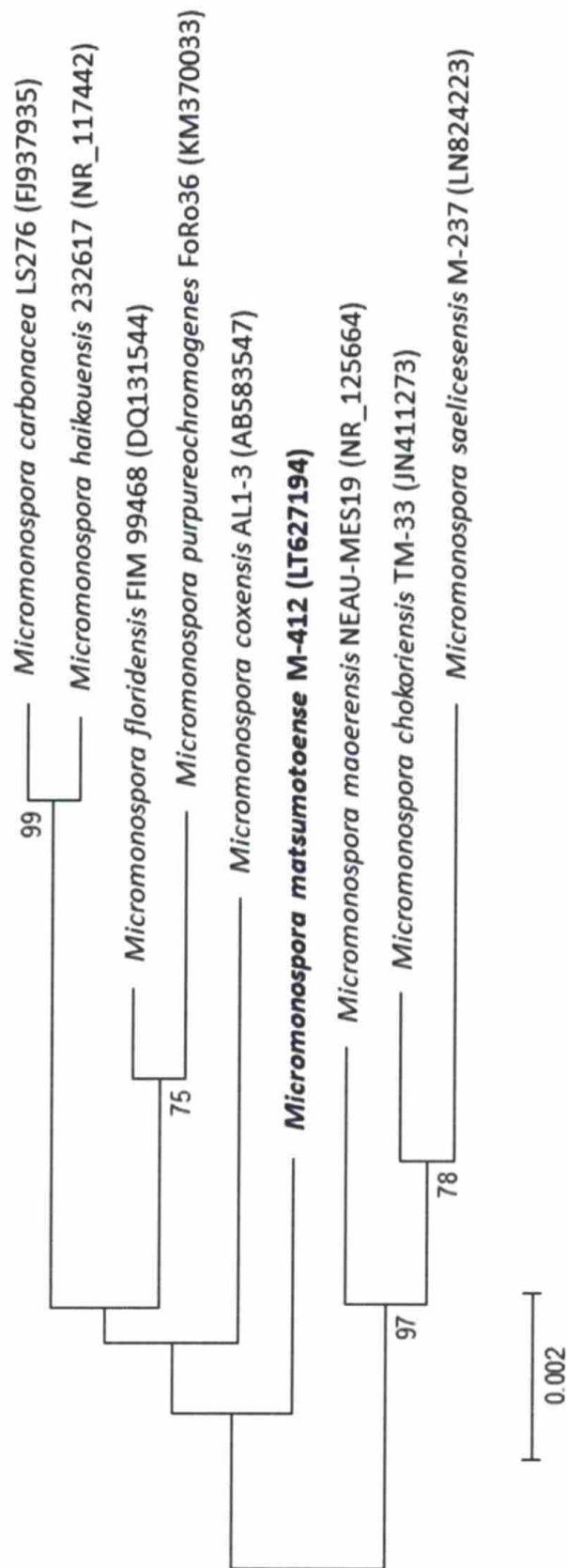
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el grupo  $R^1$  se selecciona de entre hidrógeno y metilo.
- 5 8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el grupo  $R^1$  es hidrógeno.
9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8 en el que el grupo  $R^2$  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, 10 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 y benzoilo sustituido o no sustituido.
10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 el que el grupo  $R^2$  se selecciona de entre hidrógeno, acetilo, bencilo y benzoilo.
- 15 11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 el que el grupo  $R^2$  es hidrógeno.
12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-11 el que los grupos  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$  y alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, donde  $R_a$  se selecciona entre hidrógeno y alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido.
- 20 13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 en el que  $R_a$  se selecciona entre metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo y butilo, incluyendo n-butilo, terc-butilo, sec-butilo e iso-butilo.
14. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 el que los grupos  $R^3$  y  $R^4$  son hidrógeno.
- 25 15. El compuesto de la reivindicación 5 con la siguiente fórmula (II):



(II)

16. Composición que comprende el sobrenadante según la reivindicación 2 o el  
5 compuesto según las reivindicaciones 5 a 15.
17. Composición según la reivindicación 16, que además comprende otro agente antitumoral.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde la  
composición es una composición farmacéutica o cosmética y además comprende un  
10 excipiente o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.
19. Uso del sobrenadante según la reivindicación 2, del compuesto según las  
reivindicaciones 5 a 15 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones  
16 o 17, para la elaboración de un medicamento.
20. Uso del sobrenadante según la reivindicación 2, del compuesto según las  
15 reivindicaciones 5 a 15 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones  
16 o 17, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de tumores.
21. Uso de la reivindicación 20, donde los tumores son de páncreas o de mama o de  
hígado.

Fig. 1







OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201700259

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.03.2017

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)  
**C07D309/08** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A         | SARMIENTO-VIZCAINO A. et al. "Atmospheric dispersal of bioactive <i>Streptomyces albidoflavus</i> strains among terrestrial and marine environments". 30/07/2015, Microbiologic Ecology, Vol. 71, Páginas 375 - 386, ISSN 0095-3628, <DOI: doi:10.1007/s00248-015-0654-z>. Resumen; páginas 381-383.  | 1-21                       |
| A         | ARGOUEDELIS A. D. et al. "New paulomycins produced by <i>Streptomyces Paulus</i> ". 30/11/1987, The Journal of Antibiotics, Vol. 41, Páginas 157-169, ISSN 0021-8820. Resumen; página 159, párrafos 1 y 2; Figura 6.                                                                                  | 1-21                       |
| A         | HERZOG H L et al. "Chemistry of antibiotics from micromonospora. III . Isolation and characterization of everninomicin D and B". 30/06/1965, Applied Microbiology, Vol. 13, páginas 515 - 520, ISSN 0003-6919 (Print), <DOI: pubmed:14346980>. Resumen; página 518, columna 2; página 519, columna 1. | 1-21                       |
| A         | ASANO K et al. " <i>Catellatospora matsumotoense</i> new-species and <i>catallatospora tsunoense</i> new-species actinomycetes found in woodland soils". 30/11/1988, International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 39, páginas 309-313, ISSN 0020-7713. Resumen; Resultados.                 | 1-21                       |

#### 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  
16.05.2017

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/5

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

C12N, C07D

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, XPESP, BIOSIS, CAS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.05.2017

**Declaración**

|                                                 |                       |           |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-21 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-21 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

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       | SARMIENTO-VIZCAINO A. et al. "Atmospheric dispersal of bioactive <i>Streptomyces albidoflavus</i> strains among terrestrial and marine environments". 30/07/2015, Microbiologic Ecology, Vol. 71, Páginas 375 - 386, ISSN 0095-3628, <DOI: doi:10.1007/s00248-015-0654-z>. | 30.07.2015        |
| D02       | ARGOUEDELIS A. D. et al. "New paulomycins produced by <i>Streptomyces Paulus</i> ". 30/11/1987, The Journal of Antibiotics, Vol. 41, Páginas 157-169, ISSN 0021-8820                                                                                                       | 30.11.1987        |
| D03       | HERZOG H L et al. "Chemistry of antibiotics from micromonospora. 3. isolation and characterization of everninomicin D and B". 30/06/1965, Applied Microbiology, Vol. 13, páginas 515 - 520, ISSN 0003-6919 (Print), <DOI: pubmed:14346980>.                                | 30.06.1965        |
| D04       | ASANO K et al. " <i>Catellatospora matsumotoense</i> new-species and <i>catallatospora tsunoense</i> new-species actinomycetes found in woodland soils". 30/11/1988, International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 39, páginas 309-313, ISSN 0020-7713.           | 30.11.1988        |

**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 solicitud se refiere a una cepa bacteriana de *Micromonospora matsumotoense*, al uso de dicha cepa para la producción de paulomicinas, a paulomicinas de fórmula general I y a composiciones farmacéuticas que las contienen.

El documento D01 divulga cepas aisladas de *Spreptomices albidoflavus* las cuales producen antibióticos paulomicina A y B. Dichas paulomicinas difieren en su estructura de las definidas en la solicitud por la diferente sustitución en las posiciones 3'y 5' del grupo glicósido (Resumen; páginas 381-383).

El documento D02 divulga cepas de *Spreptomices paulus* las cuales producen paulomicina A2 (C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>S), paulomicina C (C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>S), paulomicina D (C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>S), paulomicina E (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>16</sub>S) y paulomicina F (C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>16</sub>S), las cuales difieren de las paulomicinas definidas en la solicitud en los diferentes sustituyentes del grupo glicosilo que presentan en su estructura (Resumen; página 159, párrafos 1 y 2; Figura 6).

El documento D03 divulga cepas de *Micromonospora carbonacea* las cuales producen los antibióticos polisacáridos everninomicina D y everninomicina B, antibióticos polisacáridos pero de estructura diferente a las paulomicinas definidas en la solicitud (Resumen; página 518, columna 2; página 519, columna 1).

El documento D04 divulga el aislamiento de cepas de la especie *Catellatospora matsumotoense*. Dichas cepas se aislaron a partir de suelos de zonas boscosas llevándose a cabo un estudio de las propiedades morfológicas y fisiológicas de dichas cepas (Resumen; Resultados).

En relación a las reivindicaciones 1-4, referentes a la cepa de *Micromonospora matsumotoense* M-412, dado que en el estado de la técnica no se ha encontrado ninguna referencia a una cepa con el mismo número de depósito que la definida en la reivindicación 1 de la solicitud se considera que dicha cepa es nueva.

Por otro lado aunque son conocidas cepas capaces de producir antibióticos paulomicina, dichas cepas pertenecen distinto género a las definidas en la solicitud (*Streptomices*) y las paulomicinas producidas difieren de las definidas en la reivindicación 5 de la solicitud en la diferente sustitución en las posiciones 3'y 5' del grupo glicósido.

Dado que el aislamiento de la cepa definida en la reivindicación 1 de la solicitud soluciona el problema de disponer de una cepa que produzca compuestos paulomicina con estructura como la definida en la solicitud, se considera que dicha cepa presenta ventajas técnicas sobre las demás cepas conocidas por lo que cumple el requisito de actividad inventiva.

En consecuencia la invención definida en las reivindicaciones 1-4 es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Respecto a la reivindicación 5, referente a compuestos paulomicina de formula general I, no se han encontrado en el estado de la técnica documentos que divulguen dichos compuestos por lo que se reconoce novedad. Del mismo modo se reconoce actividad inventiva ya que aunque son conocidas paulomicinas A y B como las recogidas en el documento D01 producidos por *Spreptomices albidoflavus*, dichos compuestos difieren de las paulomicinas definidas en la reivindicación 5 de la solicitud en la funcionalización en posición 3' del azúcar con un grupo acetoxi y en posición 5' con un grupo metilo, no existiendo indicios en el estado de la técnica que lleven a formular compuestos paulomicina con dichos sustituyentes, como son los producidos por la cepa bacteriana de *Micromonospora matsumotoense* definida en la solicitud.

Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 5-21, referentes a los compuestos paulomicinas de formula general I, a composiciones que los contienen así como a su uso para la preparación de medicamentos, es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1-21 satisfacen los requisitos de patentabilidad establecidos en el art. 4.1 LP 11/1986.