(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 624 258**

(51) Int. CI.:

C07H 19/23 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/76 (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)
C12P 19/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2009 PCT/ES2009/070092**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09125042**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2009 E 09731404 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2277885**

(54) Título: **Indolocarbazoles glicosilados, procedimiento de obtención y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

08.04.2008 ES 200801077

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2017

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE OVIEDO (50.0%)
C/ San Francisco 5
33003 Oviedo, ES y
ENTRECHEM, S.L. (50.0%)

(72) Inventor/es:

PÉREZ SALAS, AAROA;
SÁNCHEZ REILLO, CÉSAR;
FERNÁNDEZ BRAÑA, ALFREDO;
MÉNDEZ FERNÁNDEZ, CARMEN;
SALAS FERNÁNDEZ, JOSE ANTONIO y
MORÍS VARAS, FRANCISCO

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

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

DESCRIPCION

Indolocarbazoles glicosilados, procedimiento de obtención y usos de los mismos

La invención se adscribe al campo farmacéutico y en concreto se refiere a compuestos con aplicación en oncología, con estructura química derivada de indolocarbazol, y que se obtienen por fermentación de microorganismos.

Estado de la técnica

Más de 120 productos naturales de tipo indolocarbazol han sido aislados a partir de bacterias, hongos e invertebrados marinos (*Studies in Natural Product Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, vol. 12, pp. 365-409, 1993; *Chem. Rev.* 2002, 102: 4303-4427; *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 1007-1045). Entre estos compuestos de origen natural destacan la estaurosporina (STP, Fig. 1) y la rebecamicina (RBM), que son indolocarbazoles glicosilados producidos por bacterias del grupo de los actinomicetos (U.S. Pat. No. 4,487,925; U.S. Pat. No 4,552,842; *J. Antibiot.* 1977, 30, 275-282; *Tetrahedron Lett.* 1985, 26, 4011-4014; *J. Antibiot.* 1987, 40, 668-678; *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 1007-1045). Además, se ha obtenido un elevado número de derivados de tipo indolocarbazol, incluyendo un número de derivados de tipo indolocarbazol, incluyendo indolocarbazoles glicosilados, mediante síntesis química o semi-síntesis (*Studies in Natural Product Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, vol. 12, pp. 365-409, 1993; *Chem. Rev.* 2002, 102: 4303-4427; *Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38, 123-140; *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 2002, 2, 255-266; *Anti-Cancer Drug Design* 2000, 15, 43-52; *J. Med. Chem.* 2005, 48, 2600-2611; Tetrahedron Letters 2004, 45 1095-1098; U.S. Pat. No. 4,785,085; EP0545195; EP0602597; WO9807433; WO9902532; WO9530682; US Pat. No. 5,475,110; US Pat. No. 5,468,872; U.S Pat. Num. 6,686,385; U.S Pat. Num. 6,610,727; U.S. Pat. No. 6,855,698).

Los indolocarbazoles presentan una amplia variedad de actividades biológicas de interés farmacéutico, con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, hipotensivas, antitumorales o neuroprotectoras. Por ejemplo, la rebecamicina (U.S. Pat. Nos. 4,487,925 y 4,552,842) y su análogo hidrosoluble 6-(2-dietilaminoetil)-rebecamicina (U.S. Pat. No. 4,785,085) presentan actividad antitumoral. Estas actividades biológicas pueden ser el resultado de diferentes mecanismos de acción, incluyendo la inhibición de proteína quinasas, la inhibición de ADN topoisomerasas o la unión intercalativa al DNA (*Anti-Cancer Drug Design* 2000, 15, 43-52; *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 2002, 2, 255-266; *Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38, 123-140; *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 1007-1045). Varios derivados de indolocarbazol han entrado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer o de ciertas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (*Nat. Prod. Rep.* 2005, 22: 162-195; *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 1007-1045). La mayoría de estos derivados son glicósidos, los cuales son generalmente más potentes que los correspondientes aglicones (*Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38, 123-140; *J. Med. Chem.* 2005, 48, 2600-2611). En los glicósidos, el azúcar puede estar unido al indolocarbazol mediante un único enlace *N*-glicosídico (como en el caso de la RBM, Fig. 1) o bien mediante dos enlaces, que consisten en un enlace *N*-glicosídico y un enlace C-N adicional (como en la STP). Otra diferencia relevante entre las estructuras de la RBM y la STP se encuentra en el grupo pirrol, que incluye una amida en la RBM y una imida en la STP. Estas diferencias son de gran importancia para el mecanismo de acción del compuesto, ya que la RBM es un inhibidor de la ADN topoisomerasa I, mientras que la STP es un inhibidor de proteína quinasas.

Actualmente existe una gran necesidad de nuevos agentes antitumorales, con actividad mejorada, con menos efectos secundarios indeseables y con mayor selectividad, en comparación con los fármacos actualmente en uso. Tradicionalmente, la industria farmacéutica ha desarrollado nuevos fármacos mediante dos vías fundamentales: (1) búsqueda de nuevos productos naturales, y (2) síntesis y/o modificación química de determinados compuestos. Estos métodos siguen siendo útiles, pero suelen requerir inversiones muy importantes de recursos (tiempo, dinero, energía), pues normalmente es necesario analizar miles de productos para encontrar un nuevo compuesto prometedor. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha abierto un interesante campo de investigación para la generación de nuevos compuestos bioactivos mediante la manipulación de genes implicados en la biosíntesis de agentes antitumorales, principalmente de bacterias del grupo de los actinomicetos (*Trends Biotechnol.* 2001, 19, 449-456; *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 9, 77-85; *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2005, 8, 748-756; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33, 560-568; *Curr. Opin. Microbiol.* 2006, 9, 252-260). Estas técnicas también pueden ser usadas para mejorar la producción de compuestos naturales ya conocidos, pues las cepas naturales suelen producir bajas concentraciones del metabolito de interés.

La manipulación genética de microorganismos ha sido ya utilizada para la obtención de varias decenas de derivados de tipo indolocarbazol (*ES2255331-A1* 2006; *Chem. Biol.* 2002, 9, 519-531; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003, 67, 127-138; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 461-466; *Mol. Microbiol.* 2005, 58, 17-27). Al menos algunos de estos derivados presentan actividad antitumoral (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 461-466). La biosíntesis de indolocarbazoles glicosilados puede conseguirse mediante la expresión de cuatro genes para la formación del aglicón, un gen que codifica una glicosiltransferasa, y un número variable de genes que codifican enzimas para la formación del azúcar. La expresión de un gen adicional (*staN*) permite la producción de análogos de STP, con el azúcar unido al aglicón mediante dos enlaces (*Mol. Microbiol.* 2005, 58, 17-27). La expresión de todos estos genes en una célula huésped adecuada da lugar a una ruta biosintética como, por ejemplo, la ilustrada en la Fig. 2.

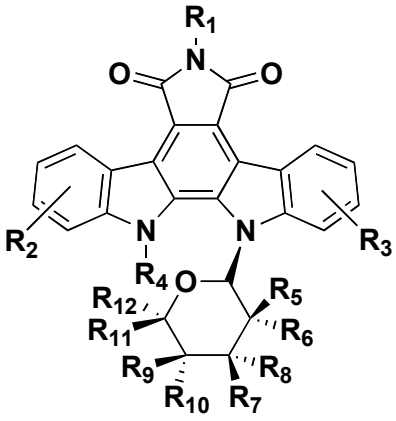
Descripción de la invención

La presente invención proporciona nuevos compuestos derivados de Rebecamicina y Estaurosporina, pertenecientes a la familia de indolocarbazoles glicosilados. La presente invención también proporciona nuevas cepas bacterianas que producen indolocarbazoles glicosilados. Estas cepas bacterianas son obtenidas mediante la introducción de ciertos ácidos nucleicos adicionales en cepas de *Streptomyces* spp. no productoras de indolocarbazoles, en particular de *Streptomyces albus*. Los ácidos nucleicos mencionados son de dos tipos. El primer tipo consiste en ácidos nucleicos que codifican actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis de Rebecamicina y Estaurosporina, y pueden ser obtenidos a partir de *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC39243, *Streptomyces longisporoflavus* DSM10189 o de cualquier otro organismo productor de indolocarbazoles. El segundo tipo consiste en ácidos nucleicos que codifican actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis de azúcares que forman parte de la estructura de diversos glicósidos (glicósidos tales como RBM, STP, eritromicina, oleandomicina, urdamicina, u otros), y pueden ser obtenidos a partir de *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC39243, *Streptomyces longisporoflavus* DSM10189, *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338, *Streptomyces antibioticus* ATCC11891, *Streptomyces fradiae* Tü2717 o cualquier organismo productor de glicósidos.

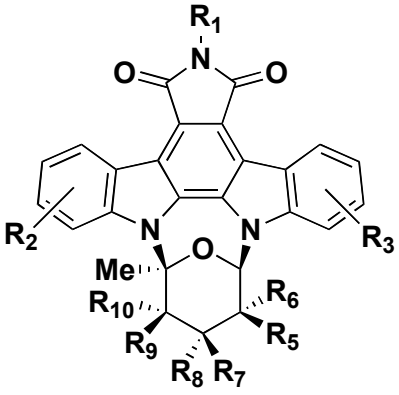
La introducción de ácidos nucleicos en *Streptomyces* spp. se puede realizar mediante transformación de protoplastos, conjugación u otros métodos conocidos (tales como los descritos en *Practical Streptomyces genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, Gran Bretaña, 2000), de tal forma que los ácidos nucleicos son replicables en el organismo, bien en forma de elemento extracromosómico o bien integrados en el cromosoma del organismo.

Las cepas bacterianas de esta invención pueden ser cultivadas en cualquier medio adecuado, en condiciones que permitan su crecimiento, tal como se describe enJU. Nat. Prod. 2002, 65, 779-782; Chembiochem. 2004, 5, 1181-1187. Tras varios días de incubación, estos cultivos contienen una cantidad elevada de células (micelio), junto con una mezcla de compuestos, incluyendo derivados de indolocarbazol. A continuación, los cultivos son sometidos a procesos para la separación de una fase líquida (sobrenadante) y una fase sólida (micelio). Seguidamente las dos fases son sometidas, separadamente, a diversos procedimientos que pueden incluir extracción con diversos solventes orgánicos y varios tipos de cromatografías (tales como HPLC, cromatografía líquida de alta presión), con el fin de obtener los derivados de indolocarbazol en forma de compuestos puros. Los derivados de indolocarbazol tienen actividad antitumoral y antibiótica, actividad inhibidora de proteína quinasas, actividad inhibidora de DNA topoisomerasas, y otras.

Se describen compuestos caracterizados por las siguientes fórmulas (I) y (II):



(I)



(II)

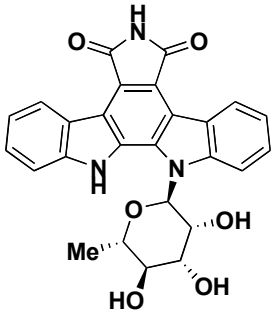
donde

R_1, R_2, R_3 y R_4 son, cada uno e independientemente, hidrógeno o un grupo protector. El grupo protector puede consistir en un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalquilo heterocíclico, un grupo hidroxialquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo alcoxialquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo alquilarilo, un grupo éster, un grupo carbonato, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo uretano, un grupo sililo, un grupo sulfoxido o una combinación de ellos,

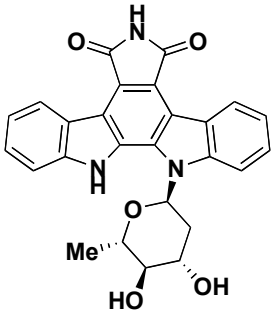
R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 y R_{10} son, cada uno e independientemente, hidrógeno, hidroxilo (–OH) o un grupo $–OR_{13}$, donde R_{13} es un grupo protector según la definición anterior,

R_{11} y R_{12} son cada uno e independientemente hidrógeno, metilo ($–CH_3$), un grupo hidroximetilo ($-CH_2OH$) o un grupo $-CH_2OR_{14}$, donde R_{14} es un grupo protector según la definición anterior.

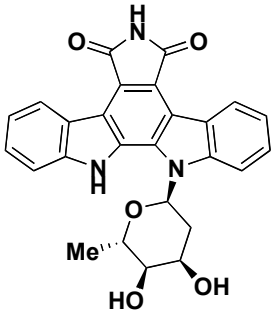
Se describen los compuestos con las fórmulas (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX):



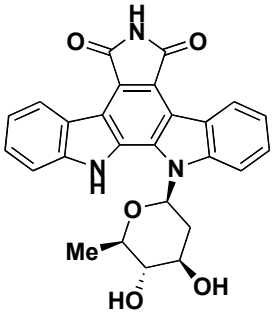
(III)



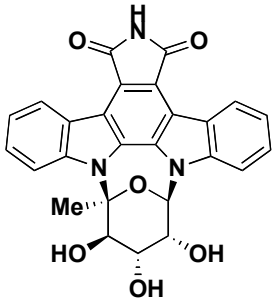
(IV)



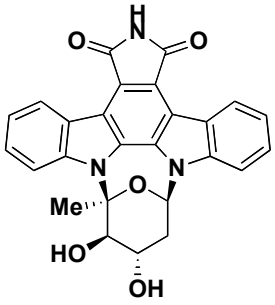
(V)



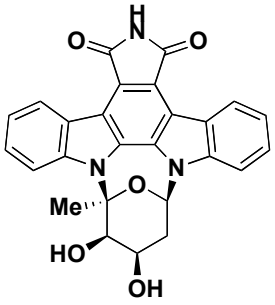
(VI)



(VII)



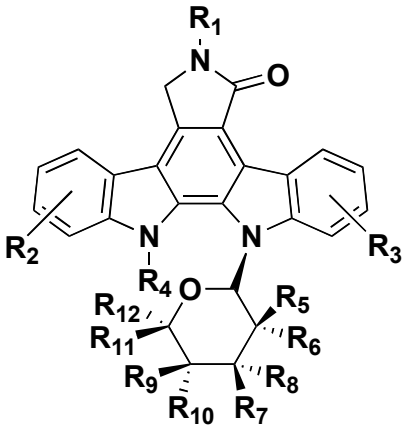
(VIII)



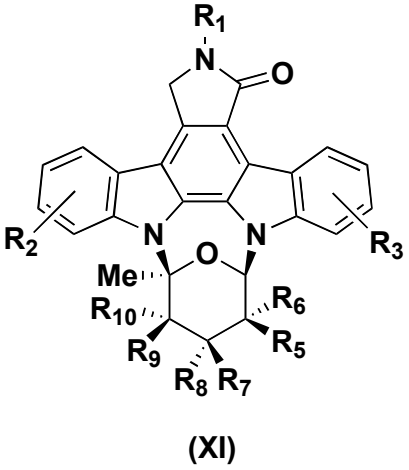
(IX)

El compuesto de fórmula (III) es nuevo pues anteriormente se describió un indolocarbarzol glicosilado similar pero cuya estereoquímica no está definida en el enlace glicosídico, que en el caso de esta invención es de configuración ß (Tetrahedron Lett. 2004, 45, 1095-1098).

Se describen usos para los compuestos caracterizados por las fórmulas (X) y (XI):



(X)



(XI)

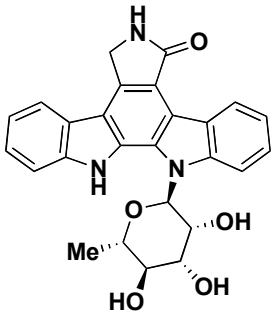
donde

R_1, R_2, R_3 y R_4 son, cada uno e independientemente, hidrógeno o un grupo protector. El grupo protector puede consistir en un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalquilo heterocíclico, un grupo hidroxialquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo alcoxialquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo alquilarilo, un grupo éster, un grupo carbonato, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo uretano, un grupo sililo, un grupo sulfoxido o una combinación de ellos,

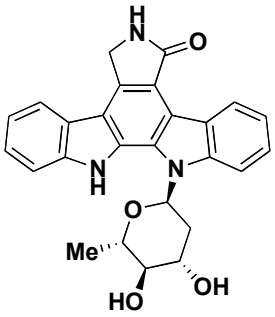
R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 y R_{10} son, cada uno e independientemente, hidrógeno, hidroxilo (–OH) o un grupo $–OR_{13}$, donde R_{13} es un grupo protector según la definición anterior,

R_{11} y R_{12} son cada uno e independientemente hidrógeno, metilo ($–CH_3$), un grupo hidroximetilo ($-CH_2OH$) o un grupo $-CH_2OR_{14}$, donde R_{14} es un grupo protector según la definición anterior.

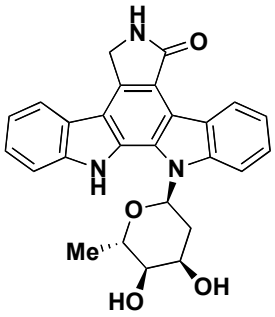
Se describen usos para, entre otros, los compuestos con las fórmulas (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII):



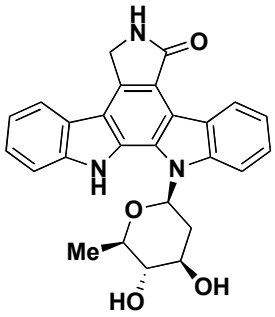
(XII)



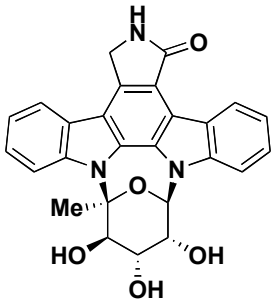
(XIII)



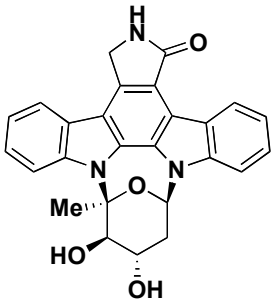
(XIV)



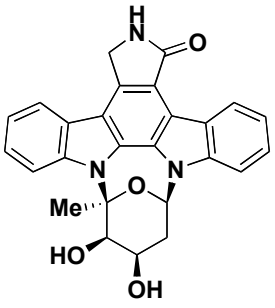
(XV)



(XVI)



(XVII)



(XVIII)

De todos estos compuestos, se ha descrito uso como inhibidor de proteína quinasa C (PKC) el compuesto de fórmula (XII), también denominado K252d, (*J. Antibiot.* 1986, 39, 1059-1065; *J. Antibiot.* 1986, 39, 1066-1071) y el compuesto de fórmula (XIV), también denominado RK-286D, (J. Antibiot. 1990, 43, 168-173; J. Antibiot. 1990, 43, 163-167; J. Antibiot. 1992, 45, 278-279).

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

Se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se describe también el uso de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento.

Se describe el uso de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), 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.

Se describe también el uso de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar el cáncer.

Se describe también el uso de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la manufactura de un medicamento con actividad antitumoral.

Se describe también el uso de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Se describe además un método de tratamiento de un sujeto, incluyendo un ser humano, diagnosticado con cáncer, que consiste en tratar a dicho mamífero con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

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

Las dosis o cantidades de los compuestos de la invención deben ser suficientemente grandes para producir el efecto deseado. Sin embargo, la dosis no debe ser tan grande que cause efectos secundarios adversos, por ejemplo reacciones cruzadas indeseadas, reacciones anafilácticas y similares. Generalmente, la dosis variará con la edad, condición, sexo y el grado de la enfermedad del sujeto, y puede ser determinada por cualquier experto en la materia. La dosis puede ser ajustada por cada médico, en base a la condición clínica del sujeto implicado. La dosis, régimen de dosificación y ruta de la administración pueden variarse.

Se describe también el uso de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Se describe además un método de tratamiento de un sujeto, incluyendo un ser humano, diagnosticado con una enfermedad neurológica, que consiste en tratar a dicho sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) o (XVIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, y el compuesto puede ser, entre otras vías, administrado parenteralmente.

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

Los compuestos de la invención pueden ser útiles para la investigación en bioquímica o biología celular. Por ejemplo, los compuestos pueden ser eficaces para inhibir la actividad de DNA topoisomerasas y de varias proteína quinasas en cultivos *in vitro* de diversos tipos celulares. Ejemplos de DNA topoisomerasas que pueden ser inhibidas por los compuestos de la invención incluyen topoisomerasa I, topoisomerasa II, girasa y otras. Ejemplos de proteína quinasas que pueden ser inhibidas por los compuestos de la invención incluyen AurA, AurB, Chk1, Dyrk1a, Ftl3, FGFR1, HGK, Ikkb, Jak2, KDR, SYK, y otras.

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

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

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

A los efectos de la presente descripción y su descripción, el término “derivado” de la rebecamicina o estaurosporina debe interpretarse como un compuesto recubierto por cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (X) o (XI). Del mismo modo, el término “prodroga” debe interpretarse a los efectos de la presente descripción y de la descripción de la misma, como cualquier compuesto que libere, al circular en sangre o entrar en la célula, la rebecamicina, estaurosporina o un derivado, de acuerdo con cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (X) o (XI), de las mismas.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Estructura química de la estaurosporina (STP) y la rebecamicina (RBM).

Fig. 2. Biosíntesis de un indolocarbazol glicosilado. Abreviaturas: Trp (triptófano), CPA (ácido cromopirrólico), AF (arciriaflavina A), NDP-L-rham (nucleosidil difosfato [NDP]-L-ramnosa), Glc-1-P (glucosa 1-fosfato), IG(1N) (indolocarbazol glicosilado con azúcar unido por un solo enlace), IG(2N) (indolocarbazol glicosilado con azúcar unido por dos enlaces). RebO, RebD, RebC y RebP son enzimas que participan en la biosíntesis de rebecamicina. StaG y StaN son enzimas de la ruta de formación de estaurosporina. OleL, OleS, OleE y OleU son enzimas implicados en la formación de los azúcares de la oleandomicina.

Fig. 3. Plásmidos utilizados, mostrando su composición genética. Los triángulos negros representan el promotor P^*_{ermE}.

Fig. 4A, Fig. 4B, Fig. 4C, Fig. 4D. Análisis mediante HPLC de los cultivos de las cepas recombinantes generadas con plásmidos que dirigen la biosíntesis de diferentes desoxiazúcares: *S. albus* 16GNT(pRHAM) (Fig. 4A), *S. albus* 16GNT(pLN2) (Fig. 4B), *S. albus* 16GNT(pLNR) (Fig. 4C) y *S. albus* 16GNT(pLNBIV) (Fig. 4D). Guía de picos: **(VII)**: N^{12}-5’(*S*)-N^{13}-1’-(*R*)-L-ramnosilarciriaflavina [fórmula (VII)]; **(III)**: N^{13}-1’-ß-L-rhamnosilarciriaflavina [fórmula (III)]; **(VIII)**: N^{12}-5’(*S*)-N^{13}-1’-(*R*)-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (VIII)]; **(IV)**: N^{13}-1’-ß-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (IV)]**; (VI)**: N^{13}-1’-ß-D-olivosilarciriaflavina [fórmula (VI)]; **(V)**: N^{13}-1’-ß-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (V)]; **(IX)**: N^{12}-5’(*S*)-N^{13}-1’-(*R*)-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (IX)].

Fig. 5. Estructuras químicas de [fórmula (III)], [fórmula (IV)], [fórmula (V)], [fórmula (VI)], [fórmula (VII)], [fórmula (VIII)], [fórmula (IX)], [fórmula (XII)], [fórmula (XIII)], [fórmula (XIV)], [fórmula (XV)], [fórmula (XVI)], [fórmula (XVII)] y [fórmula (XVIII)].

Explicación de una forma de realización preferente

Para una mejor comprensión de la presente descripción, se exponen los siguientes ejemplos.

En los siguientes ejemplos se emplean técnicas de manipulación de DNA bien conocidas en el estado de la técnica, tales como las descritas por Sambrook y colaboradores (*Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989), y por Kieser y colaboradores (*Practical Streptomyces genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, Gran Bretaña, 2000).

Ejemplo 1. Obtención de las cepas bacterianas *Streptomyces albus* 16GNT(pRHAM), *Streptomyces albus* 16GNT(pLNBIV), *Streptomyces albus* 16GNT(pLN2) y *Streptomyces albus* 16GNT(pLNR).

En primer lugar, se construyó el plásmido pKC16GNT, el cual codifica cuatro enzimas para la formación del aglicón indolocarbazol (RebO, RebD, RebC y RebP), una glicosiltransferasa para la formación del enlace *N*-glicosídico (StaG), una oxigenasa de tipo P-450 para la formación del segundo enlace aglicón-azúcar (StaN), y una proteína que confiere resistencia a rebecamicina (RebT). Para ello, un fragmento de DNA incluyendo *staG* y *staN* fue obtenido por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) empleando DNA total de *Streptomyces longisporoflavus* DSM10189 y los oligonucleótidos CS043 (5’-TATATTACTAGTCGCGGAGGCGACGTTGAC-3’) y STAN2 (5’-TATCTAGAGTCAGTTCAGTACGGCGGGC-3’). Este fragmento de DNA fue clonado como un fragmento *Spe*I-*Xba*I en los mismos sitios de LITMUS 28 (New England BioLabs), generándose el plásmido pLGTFstaN. Seguidamente, el plásmido pKC16GNT fue obtenido mediante la clonación en tándem, en el sitio *Xba*I de pKC016 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 461-466), de tres fragmentos de DNA conteniendo: el promotor *ermE**p (aislado como un fragmento

*Hin*dIII-*Bam*HI a partir del plásmido pEM4 [*Mol. Microbiol.* 1998, 28, 1177-1185]), el inserto de pLGTFstaN (conteniendo *staG* y *staN*) y el gen *rebT* (obtenido mediante PCR de la forma descrita en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 461-466), respectivamente.

A continuación, se introdujo dicho plásmido pKC16GNT en *Streptomyces albus* J1074 (*J. Gen. Microbiol.* 1980, 116, 323-334), generándose la cepa *Streptomyces albus* 16GNT. La introducción del plásmido se realizó mediante transformación de protoplastos, siguiendo procedimientos estándar (Kieser et al., *Practical Streptomyces genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, Gran Bretaña, 2000). A partir de la cepa *Streptomyces albus* 16GNT se obtuvieron las cepas bacterianas *Streptomyces albus* 16GNT(pRHAM), *Streptomyces albus* 16GNT(pLNBIV), *Streptomyces albus* 16GNT(pLN2) y *Streptomyces albus* 16GNT(pLNR) mediante la introducción, por separado, de cada uno de los siguientes plásmidos: pRHAM, pLNBIV, pLN2 y pLNR, respectivamente. Estos cuatro plásmidos han sido descritos con anterioridad (*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 2, 271-276; *Chem. Biol.* 2002, 9, 721-729; *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1685-1689), y codifican enzimas para la biosíntesis de los siguientes azúcares (en forma de derivados NDP o nucleosidil difosfato): L-ramnosa, L-digitoxosa, L-olivosa y D-olivosa, respectivamente.

Las cepas Streptomyces albus 16GNT(pRHAM) Streptomyces albus 16GNT(pLNBIV), Streptomyces albus 16GNT(pLN2) y Streptomyces albus 16GNT(pLNR) fueron depositadas con fecha 14/03/2008 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot (Valencia, España) con números de acceso CECT 7388, CECT 7389, CECT 7390 y CECT 7391, respectivamente.

Ejemplo 2. Producción de los compuestos de fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), y de los compuestos de fórmula (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) y (XVIII).

La obtención de los nuevos derivados indolocarbazólicos se realizó mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) preparativa. Para la obtención de los compuestos de fórmulas (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX), las cepas *Streptomyces albus* 16GNT(pRHAM) *Streptomyces albus* 16GNT(pLNBIV), *Streptomyces albus* 16GNT(pLN2) y *Streptomyces albus* 16GNT(pLNR) se cultivaron primero en 50 ml de TSB con el marcador de resistencia adecuado y se dejaron crecer 24 horas a 30°C y a 250 rpm. Pasadas 24 horas, a partir del pre-inóculo se inocularon al 2,5% matraces con 400 ml de medio R5A líquido, tal como se ha descrito anteriormente (*Mol. Microbiol.* 2005, 58, 17-27).

En el paso de producción, se emplearon 8 matraces Erlenmeyer de 2 litros, cada uno de ellos conteniendo 400 ml de medio, los cuales fueron incubados a 30°C y 250 rpm, durante 4-5 días. Los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 minutos. La mayoría de estos compuestos se encuentran tanto en el caldo como en las células. Los precipitados se extrajeron con acetona y los sobrenadantes se filtraron usando un cartucho Mini Profil de 1µm (Pall). El caldo filtrado se sometió a extracción en fase sólida (SepPaK Vac C18, Waters). Los compuestos retenidos se eluyeron con un gradiente lineal de metanol y 0,1% TFA en agua (0 a 100% metanol en 60 min, a 10 ml/min), recogiendo fracciones cada 5 minutos.

Los extractos obtenidos fueron analizados por HPLC. Se realizó utilizando un módulo cromatográfico Alliance acoplado a un detector de fotodiodos 2996 y a un espectrómetro de masas ZQ4000 (Waters-Micromass). La columna utilizada fue una Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, Waters) utilizando como solventes acetonitrilo y 0,1% ácido trifluoroacético en agua. La elución empezó con 10% de acetonitrilo durante 4 minutos, seguido por un gradiente linear hasta alcanzar el 88% en el minuto 30, finalmente se bombeó 100% acetonitrilo durante 5 minutos, con un flujo de 0,25 ml/min. se realizó mediante ionización por electrospray (ESI) en modo positivo, con un voltaje de capilar de 3KV y voltajes de cono de 20, 60 y 100V. La longitud de onda a la que se obtuvieron los cromatogramas fue de 290 nm para los compuestos con espectro de estaurosporina y de 316 nm para los compuestos con espectro de rebecamicina.

Tras su análisis, aquellas que contenían los compuestos buscados se evaporaron en el rotavapor, previa adición de 10 ml de tampón fosfato 0,1M pH 7 a cada una de ellas. Los extractos, previamente disueltos en un pequeño volumen de DMSO y acetona (50:50) se cromatografiaron en un cartucho de compresión radial µBondapak C18 (PrepPaK Cartridge, 25 x 100 mm, Waters), utilizando como fase móvil mezclas de acetonitrilo (o metanol) y 0,1% TFA en agua a un flujo de 10 ml/min y recogiendo los compuestos de interés en múltiples inyecciones. En otras purificaciones se usó una columna XTerra (7,8 x 300 mm, Waters) y se siguió el mismo procedimiento aunque trabajando a 3 ml/min. Las soluciones de compuesto purificado se diluyeron con tres volúmenes de agua y se sometieron a extracción en fase sólida para eliminar el ácido de la fase móvil y concentrar los compuestos. Finalmente, éstos se liofilizaron para su conservación.

De esta manera se obtuvieron los siguientes compuestos (Fig. 4). A partir de *S. albus* 16GNT(pRHAM): 1 mg de N^{13}-1'-ß-L-rhamnosilarciriaflavina [fórmula (III)] y 1,2 mg de N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-ramnosilarciriaflavina [fórmula (VII)]. A partir de *S. albus* 16GNT(pLN2): 2,1 mg de N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (VIII)] y 1,2 mg de N^{13}-1'-ß-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (IV)]. A partir de *S. albus* 16GNT(pLNR): 0,8 mg de N^{13}-1'-ß-D-olivosilarciriaflavina [fórmula (VI)]. A partir de *S. albus* 16GNT(pLNBIV): 1,6 mg de N^{13}-1'-ß-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (V)] y 1,1 mg de N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (IX)].

Los compuestos de fórmulas (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) y (XVIII) se obtuvieron de forma similar, descrita en *Mol. Microbiol.* 2005, 58, 17-27.

Ejemplo 3. Caracterización de los compuestos de fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), y de los compuestos de fórmula (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) y (XVIII).

Los compuestos se identificaron inicialmente mediante análisis por HPLC, comparando el espectro de absorción y analizando la masa del ion molecular. El análisis de los extractos de la cepa *S. albus* 16GNT (pRHAM) mostró dos picos (Fig. 4A) con iones m/z 472 y 470, respectivamente, consistentes con la presencia de L-ramnosa unida a uno y a ambos átomos de nitrógeno del anillo indolocarbazol, respectivamente. El cromatograma correspondiente a la cepa 16GNT(pLN2) también mostró dos picos con el espectro característico de indolocarbazol (Fig. 4B), uno con ión m/z de 454 y otro con ión m/z de 456. Estas masas son las esperadas para la incorporación de L-olivosa unida al aglicón a través de dos y un enlace C-N, respectivamente. En la cepa 16GNT(pLNR) se detectó un único pico (Fig. 4C) con ión m/z de 456 consistente con la unión de D-olivosa a uno sólo de los nitrógenos del aglicón indolocarbazol. Finalmente la cepa 16GNT(pLNBIV) mostró dos picos (Fig. 4D) con iones m/z 456 y 454 respectivamente consistentes con la unión de L-digitoxosa a través de uno y de dos enlaces C-N.

La identificación definitiva se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón. La preparación de la muestra se hizo disolviendo 95-160 µg de producto puro en 200 µl de acetona-d_6 y trasferido a un tubo de RMN de 3 mm. Las señales del disolvente se utilizaron como referencia interna. Los espectros de RMN fueron registrados a 298K en un espectrofotómetro Bruker Avance 600 equipado con una criosonda de 5mm TCI. Los valores típicos para experimentos 2D fueron: COSY, 256 y 2048 puntos en F1 y F2, respectivamente, 16 transientes cada uno; HSQC-editado, 256 y 2048 puntos en F1 y F2, respectivamente, 48 transientes cada uno; HMBC, 512 y 2048 puntos en F1 y F2, respectivamente, 64 transientes cada uno. Los tiempos de mezcla para los experimentos 1D sel-nOe fueron 400 ms. Los experimentos de RMN fueron procesados usando el programa Topspin 1.3 (Bruker GmbH, Karlsruhe, Alemania). Las Tablas 1 a 7 muestran los datos obtenidos para los compuestos de fórmulas (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX).

Los compuestos de fórmulas (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) y (XVIII) se caracterizaron de forma similar, tal como se describe en *Mol. Microbiol.* 2005, 58, 17-27.

Ejemplo 4. Inhibición de proteína quinasas por parte de los compuestos de fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX) y de los compuestos de fórmula (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) y (XVIII).

El análisis de actividad kinasa descrito aquí fue realizado utilizando la tecnología LabChip (Caliper Life Sciences), concretamente los instrumentos Caliper LC3000 y el EZ Reader II.

El ensayo kinasa utilizado mide la conversión de un péptido fluorescente (sustrato) a un producto fosforilado. La mezcla de reacción, en un pocillo de microplaca, se introduce mediante un capilar en un chip donde el sustrato no fosforilado y el producto fosforilado se separan por electroforesis y se detectan por fluorescencia inducida por láser. La intensidad de la señal fluorescente con el tiempo se relaciona con el progreso de la reacción. El producto fosforilado migra más rápidamente que el sustrato no fosforilado y las señales de las dos formas del péptido aparecen como picos diferenciados. El software de Caliper determina la altura de picos y calcula la proporción de producto en relación a la suma de picos (P/(P+S)). Este valor su usa para comparar pocillos con compuestos y pocillos con controles y así determinar el % de inhibición para un compuesto dado.

Las siguientes quinasas se utilizaron para los estudios de inhibición enzimáticos, entre paréntesis el valor de la constante de Michaelis-Menten, Km, del ATP (Adenosina trifosfato) para cada quinasa, en µM: obtenidas de Carna Biosciences: MAPKAPK2 (4,6), AurA (3,6), AurB (5), PKCζ (3,8), RSK1 (23,3), PRAK (5), Erk1 (33,4), PKD2 (32,1), CK1d (16,3), CHK1 (33), ABL (61,7), FYN (36), LYNa (17), CHK2 (57,8), MET (79,5), LCK (28,5), SRC (38), GSK3ß (7,3), Erk2 (62,1), PKACα (1,7), AKT2 (186,1), INSR (871,8), p38a (396,5), AKT1(48), MSK1 (21,2), PKCß2 (84,8), ROCK2 (3,3), PIM2 (4,9), AMPK (38,6), KDR (164,8), IRAK4 (196,5), SGK1 (121,8), SYK (33,5); obtenidas de Invitrogen: CDK2 (57,6), BTK (123), HGK (80); obtenidas de Upstate: MST2 (36,6), PKGα (16), PAK2 (1,9), IGF1R (320), FGFR1 (171), MARK1 (33), CAMK2δ (22,4), c-TAK1 (66), DYRK1a (18,1), CaMK4 (3,9), FLT3 (350), c-Raf (6,2), P70S6K (95).

Los compuestos se disolvieron en 100% DMSO y se diluyeron a 25 veces la concentración final deseada para el ensayo. En el caso de la determinación de valores IC_{50}, se realizaron diluciones seriadas para alcanzar ocho concentraciones y dar lugar a la curva de inhibición. Se transfiere 1µL de cada concentración, en duplicado, a una microplaca de 384 pocillos. Se añade a cada pocillo 12µL de tampón enzimático conteniendo kinasa purificada (varios proveedores como se indica arriba), 100 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM DTT (Calbiochem), 0.002% Brij-35 (Sigma) y también en presencia de 10mM $MgCl_2$ como cofactor, excepto para INSR y IRAK4 en que se usa 10mM $MnCl_2$ en lugar del $MgCl_2$. Para las quinasas CAMK2δ y CAMK4 se añade además 1mM $CaCl_2$ y 6,7 µg/mL de calmodulina. Para la quinasa KDR, se añade 0,05% del detergente CHAPSO. Para la quinasa c-Raf se añade 10mM $MnCl_2$. Para PKCß2 se añaden 0,02 µg/mL de PS/PMA. Para PKGα se añade 10µM de cGMP (guanosina monofosfato ciclico). El compuesto y el enzima se dejan 15 minutos preincubando, y a continuación se añaden a cada pocillo 12 µL de tampón péptido/ATP conteniendo 100 mM HEPES, pH 7.5, 1.5 µM péptido marcado con fluoresceina (específico para la kinasa correspondiente), ATP (a la concentración K_M), y 0.002% Brij-35 para iniciar la reacción. Generalmente las reacciones se incuban durante 1-1,5h a temperatura ambiente para obtener una conversión adecuada (15-40%) del péptido al producto fosforilado. Las reacciones fueron terminadas mediante la adición de 45µL de tampón conteniendo 0mM

EDTA. Las microplacas fueron leídas por el LabChip 3000 utilizando un LabChip de 12 canales. Los valores P/(P+S) fueron obtenidos como se describe arriba y las curvas IC50 fueron generadas usando Xlfit.

La Tabla 9a presenta los datos de IC50 obtenidos en parejas de compuesto-quinasa seleccionadas entre los compuestos de fórmula (VII), (VIII), (IX), (XVI), (XVII) y (XVIII) tras realizar medidas de inhibición a 100nM y 10nM. Aquéllas parejas que proveían >70% de inhibición a 10nM se consideraron para medir su IC50.

La Tabla 9b muestra el porcentaje de inhibición obtenido por compuestos de fórmula (III), (IV), (V), (VI), (XII), (XIII), (XIV) y (XV) cuando se utilizan a concentraciones 100nM y 10nM. Por ejemplo, la actividad de la quinasa Dyrk1a es inhibida en un 87% por el compuesto de fórmula (III) y completamente por el compuesto de fórmula (XII) cuando se utilizan a una concentración 10nM.

Ejemplo 5. Actividad antitumoral de los compuestos de fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX) y de los compuestos de fórmula (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) y (XVIII).

Los compuestos generados se ensayaron frente a una serie de líneas celulares procedentes de tumores. Se determinó cuantitativamente el crecimiento celular y la viabilidad, utilizando un ensayo tipo colorimétrico, usando la reacción con sulforrodamina B (SRB), según la técnica descrita por Faircloth y colaboradores (*Journal of Tissue and Culture Methods* 1988, 11, 201-205). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Se inoculan placas de “microtiter” de 96 pocillos, con células ($5x10^3$ células por pocillo) en alícuotas de 195 µl de medio, incubándolas durante 18 h, en medio sin compuesto añadido, para permitir que las células se adhieran a la superficie. A continuación, se añaden los compuestos a ensayar, en muestras de 5 µl, en un rango de concentraciones de 10 a 10^{-8} µg/ml, disueltas en DMSO/EtOH (0.2% en tampón PS). Tras 48 h de exposición, se mide el efecto antitumoral utilizando la técnica de Sulforodamina B (SRB): se fijan las células añadiendo 50 µl de ácido tricloroacético frío al 50% (p/v) y se incuba durante 60 min. a 4ºC. Las placas se lavan con agua desionizada y se secan. Se añaden 100 µl de solución de SRB (0.4% p/v en ácido acético al 1%) a cada pocillo, y se incuba durante 10 min. a temperatura ambiente. Se elimina la SRB no unida, lavando con ácido acético al 1%. Las placas se secan al aire y el colorante unido se disuelve con tampón Tris. Se leen las densidades ópticas en un lector espectrofotómetro de placas automático a una longitud de onda de 490 nm.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de las GI_{50} (inhibición del crecimiento) en µM. Para los compuestos de fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX) y los compuestos de fórmula (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) y (XVIII).

Tabla 1. Datos de espectros de RMN de N13-1'-ß-L-rhamnosilarciriaflavina [fórmula (III)] en acetona-*d*6. (1H a 600 MHz, 13C a 150 MHz).

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	$\delta^{1}H$ (ppm)	Multipl.	*J* (H, H) (Hz)
1	110,83	7,826	d	8,3
2	127,4	7,608	td	7,5, 1,2
3	121,17	7,402	td	7,6, 0,8
4	125,76	9,339	d	7,6
4a	122,72	-		
4b	119,08	-		
4c	NO	-		
5	NO	-		
6	-	9,871	s	
7	NO	-		
7a	NO	-		
7b	117,87	-		
7c	122,46	-		
8	125,76	9,232	d	7,9
9	120,88	7,328	td	7,6, 1,1
10	127,39	7,533	td	7,5, 1,2
11	111,81	7,647	d	8,3 8,4
12	-	11,727	s	
11a	141,62	-		
12a	NO	-		
12b	129,51	-		
13a	142,87	-		
1'	78,5	6,629	d	9,5
2'	68,76	4,774	ddd	9,9, 6,8, 3,3
2'OH	-	4,654	m	
3'	73,09	4,469	d	3,2
3'OH	-	4,65	m	
4'	72,36	4,34	d	3,6
4'OH	-	5,92	d	3,2
5'	78,03	4,68	dq	7,3, 1,3
5'CH3	15,42	1,825	d	7,3

Tabla 2. Datos de espectros de RMN de N13-1'-ß-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (IV)] en acetona-*d*6. (1H a 600 MHz, 13C a 150 MHz).

Posición	δ^{13}C (ppm)	δ^{1}H (ppm)	Multipl.	*J* (H, H) (Hz)
1	110,22	7,783	d	8,4
2	128,27	7,644	t	7,6
3	121,85	7,425	td	7,3, 0,8
4	126,59	9,367	d	8
4a	122,63	-		
4b	118,59	-		
4c	120,29	-		
5	NO	-		
6	-	9,879	s	
7	NO	-		
7a	120,29	-		
7b	116,28	-		
7c	122,17	-		
8	126,21	9,234	d	8,1
9	121,38	7,35	td	7,4, 1,1
10	127,86	7,54	td	7,1, 1,2
11	112,38	7,674	d	8,4
12	-	11,935	s	
11a	141,41	-		
12a	130,16	-		
12b	129,22	-		
13a	140,9	-		
1'	74,61	6,926	dd	11,6, 3,4
2'a	34,54	2,979	ddd	14,9, 11,9, 3,3
2'e	34,54	1,98	ddd	14,3, 3,1, 2,7
3'	69,97	4,461	m	
3'OH	-	4,86	m	
4'	70,3	4,072	m	
4'OH	-	5,83	m	
5'	78,43	4,73	q	7,5
5'CH3	15,63	1,844	d	7,2

Tabla 3. Datos de espectros de RMN de N13-1'-ß-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (V)] en acetona-*d*6. (1H a 600 MHz, 13C a 150 MHz).

Posición	δ^{13}C (ppm)	δ^{1}H (ppm)	Multipl.	*J* (H, H) (Hz)
1	110,02	7,921	d	8,7
2	127,44	7,601	td	7,4, 1,38
3	121,27	7,407	td	7,5, 0 8
4	125,89	9,364	d	7,9
4a	122,25	-		
4b	118,68	-		
4c	122,42	-		
5	NO	-		
6	-	9,862	s	
7	NO	-		
7a	122,42	-		
7b	118,05	-		
7c	122,18	-		
8	125,38	9,231	d	8
9	120,5	7,338	td	7,5, 0 8
10	127,25	7,535	dt	7,4, 1,1
11	112,13	7,743	d	7,8
11a	141,85	-		
12	-	12,185	s	
12a	130,16	-		
12b	128,97	-		
13	-			
13a	140,95	-		
1'	76,95	6,793	dd	11,7, 3,5
2'a	36,11	2,704	dd	12,5, 11,9
2'e	36,11	2,196	ddd	12,9, 5,0, 3,5
3'	65,3	4,62	ddd	11,5, 5,3, 2,0
3'OH	-	NO		
4'	71,61	4,154	t	2
4'OH	-	NO		
5'	76,55	4,739	dq	1,7, 7,2
5'CH3	14,85	1,67	d	7,2

Tabla 4. Datos de espectros de RMN de N13-1'-ß-D-olivosilarciriaflavina [fórmula (VI)] en acetona-*d*6. (1H a 600 MHz, 13C a 150 MHz).

Posición	δ^{13}C (ppm)	δ^{1}H (ppm)	Multipl.	*J* (H, H) (Hz)
1	111,2	7,985	d	8,6
2	127,6	7,629	td	7,6, 1,0
3	121,78	7,432	td	7,3, 0,8
4	125,9	9,324	d	7,8
4a	122,95	-		
4b	119,57	-		
4c	NO	-		
5	NO	-		
6	-	9,957	s	
7	NO	-		
7a	NO	-		
7b	NO	-		
7c	122,91	-		
8	125,6	9,222	d	8
9	121,15	7,406	td	7,6, 0,8
10	127,79	7,601	td	7,6, 1,2
11	112,07	7,809	d	8,2
12		10,927	s	
11a	141,09	-		
12a	NO	-		
12b	NO	-		
13a	141,39	-		
1'	82,88	6,685	dd	11,2, 2,7
2'a	29,82	2,245	ddd	13,2, 11,2, 5,2
2'e	29,82	2,186	ddd	13,2, 5,2, 2,8
3'	72,03	4,102	m	
3'OH	-	NO	m	
4'	78,02	3,676	dd	9,5, 9,1
4'OH	-	NO	m	
5'	76,92	4,11	dd	9,5, 6,1
5'CH3	18,39	1,719	d	6,1

Tabla 5. Datos de espectros de RMN de N12-5'(S)-N13-1'-(R)-L-ramnosilarciriaflavina [fórmula (VII)] en acetona-*d*6. (1H a 600 MHz, 13C a 150 MHz).

Posición	δ^{13}C (ppm)	δ^{1}H (ppm)	Multipl.	*J* (H, H) (Hz)
1	109,68	8,25	d	8,3
2	127,87	7,659	td	7,1, 1,1
3	120,95	7,46	td	6,8, 0,8
4	126,06	9,26	d	7,9
4a	122,87	-		
4b	NO	-		
4c	NO	-		
5	NO	-		
6	-	9,906	s	
7	NO	-		
7a	NO	-		
7b	NO	-		
7c	124,26	-		
8	126,06	9,38	d	8,3
9	120,86	7,36	td	7,8, 0,8
10	126,11	7,518	td	6,8 1,5
11	117,49	8,21	d	8,6
11a	142,82	-		
12a	NO	-		
12b	129,69	-		
13a	139,08	-		
1'	88,27	6,726	d	1,8
2'	72,75	4,47	s	
2'OH	-	5,299	m	
3'	65,91	3,872	dd	11,1, 2,6
3'OH	-	4,118	m	
4'	74,42	4,661	dd	11,1, 3,7
4'OH	-	4,956	m	
5'	97,62	-		
5'CH3	29,77	2,463	s	

Tabla 6. Datos de espectros de RMN de N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (VIII)] en acetona-*d*6. (^{1}H a 600 MHz, ^{13}C a 150 MHz).

Posición	δ^{13}C (ppm)	δ^{1}H (ppm)	Multipl.	*J* (H, H) (Hz)
1	109,55	7,711	d	8,3
2	127,44	7,641	td	7,7, 1,1
3	121,27	7,447	td	7,4, 0,8
4	125,9	9,265	d	8,3
4a	123,07	-		
4b	117,96	-		
4c	NO	-		
5	NO	-		
6	-	9,894	s	
7	NO	-		
7a	NO	-		
7b	117,96	-		
7c	124,45	-		
8	125,2	8,894	d	7,9
9	120,76	7,354	t	7,1
10	126,58	7,509	dt	8,0, 1,5
11	116,7	8,222	d	8,7
11a	142,53	-		
12a	NO	-		
12b	129,68	-		
13a	138,6	-		
1'	83,36	6,958	dd	4,9, 1,5
2'a	38,95	2,587	ddd	13,8, 11,7, 5,0
2'e	38,95	2,647	ddd	13,8, 4,2, 1,5
3'	63,22	3,85	ddd	11,5, 9,8, 4,2
3'OH	NO	3,812	s	
4'	81,03	4,108	t	9,8
4'OH	-	4,103	s	
5'	97,32	-		
5'CH3	29,38	2,463	s	

Tabla 7. Datos de espectros de RMN de N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (IX)] en acetona-*d*6. (^{1}H a 600 MHz, ^{13}C a 150 MHz).

Posición	δ^{13}C (ppm)	δ^{1}H (ppm)	Multipl.	*J* (H, H) (Hz)
1	109,31	7,65	d	8,3
2	127,07	7,6	td	7,0, 1,3
3	120,93	7,402	td	7,3, 1,1
4	125,85	9,24	d	8
4a	123,16	-		
4b	116,15	-		
4c	NO	-		
5	NO	-		
6	-	9,783	s	
7	NO	-		
7a	NO	-		
7b	117,55	-		
7c	124,57	-		
8	125,31	9,36	d	8,2
9	120,53	7,32	dt	7,6, 0 8
10	126,35	7,48	dt	7,9, 1,6
11	116,34	8,18	d	8,7
11a	142,39	-		
12a	NO	-		
12b	131,21	-		
13a	139,12	-		
1'	80,37	6,82	dd	5,6, 1,4
2'a	34,85	2,8	ddd	15, 3,0, 5,6
2'e	34,85	2,7	ddd	15,0, 3,4, 1,4
3'	65,14	4,275	ddd	3,0, 3,0, 3,0
3'OH	-	NO		
4'	74,44	4305	d	3
4'OH	-	NO		
5'		-		
5'CH3	30,37	2,404	s	

Tabla 8. Ensayo de la actividad antitumoral de indolocarbazoles frente a líneas celulares tumorales. Se incluyen también los datos obtenidos con STP y RBM como referencia. Los valores numéricos hacen referencia a la GI_{50} (μM), o concentración a la que el compuesto ensayado inhibe el 50% del crecimiento celular en comparación con células no tratadas. N^{13}-1'-ß-L-rhamnosilarciriaflavina [fórmula (III)], N^{13}-1'-ß-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (IV)], N^{13}-1'-ß-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (V)], N^{13}-1'-ß-D-olivosilarciriaflavina [fórmula (VI)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-ramnosilarciriaflavina [fórmula (VII)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (VIII)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (IX)], N^{13}-1'-ß-L-rhamnosil-k252c [fórmula (XII)], N^{13}-1'-ß-L-olivosil-k252c [fórmula (XIII)], N^{13}-1'-ß-L-digitoxosil-k252c [fórmula (XIV)], N^{13}-1'-ß-D-olivosil-k252c [fórmula (XV)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-ramnosil-k252c [fórmula (XVI)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-olivosil-k252c [fórmula (XVII)] y N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-digitoxosil-k252c [fórmula (XVIII)].

Línea celular (tipo de cáncer)	compuestos								
	STP	RBM	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
MDA-MB-231 (mama)	0,013	-	4,40	14,1	4,19	2,43	1,35	7,50	8,16
A549 (pulmón)	0,008	0,76	4,18	8,79	4,41	2,21	2,04	5,73	5,51
HT29 (colon)	0,076	1,55	2,42	8,79	6,39	2,16	2,45	11,2	8,16

Línea celular (tipo de cáncer)	compuestos								
	STP	RBM	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
MDA-MB-231 (mama)	0,013	-	1,97	1,43	2,49	3,17	0,59	1,05	1,84
A549 (pulmón)	0,008	0,76	2,84	1,56	3,40	4,98	0,61	1,02	1,96
HT29 (colon)	0,076	1,55	2,10	1,52	3,40	3,85	0,87	1,21	1,52

Tabla 9a. Ensayo de la actividad kinasa de indolocarbazoles de los compuestos N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-ramnosilarciriaflavina [fórmula (VII)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (VIII)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (IX)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-ramnosil-k252c [fórmula (XVI)], N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-olivosil-k252c [fórmula (XVII)] y N^{12}-5'(*S*)-N^{13}-1'-(*R*)-L-digitoxosil-k252c [fórmula (XVIII)]. Los valores numéricos hacen referencia a la IC_{50} (nM), o concentración a la que el compuesto ensayado inhibe el 50% de la actividad kinasa en comparación con ensayos control. Las kinasas ensayadas son AurA, AurB, Chk1, Dyrk1a, Ftl3, FGFR1, HGK, Ikkb, Jak2, KDR y SYK.

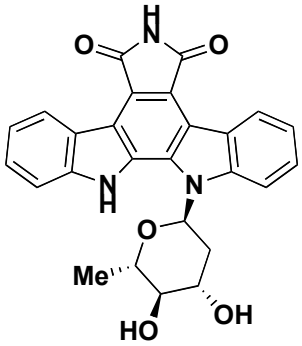
	VII	VIII	IX	XVI	XVII	XVIII
AurA	>10	>10	6.7	-	5.0	>10
AurB	-	-	4.5	-	6.8	-
Chk1	1.0	4.9	-	2.4	-	>10
Dyrk1a	4.0	-	>10	-	-	>100
Ftl3	0.57	0.56	0.43	0.59	0.54	-
FGFR1	8.9	-	>10	-	>10	>100
HGK	0.78	-	>10	-	-	>10
Ikkb	0.17	<0.03	>10	-	-	>100
Jak2	0.50	0.74	1.2	0.43	0.57	0.53
KDR	3.7	0.55	>10	-	-	>10
SYK	1.0	1.1	2.3	-	-	>10

Tabla 9b. ensayo de la actividad kinasa de indolocarbazoles de los compuestos N13- 1' -β-L-ramnosilarciriaflavina [fórmula (III)], N13- 1'-β-L-olivosilarciriaflavina [fórmula (IV)], N13- 1'-β-L- digitoxosilarciriaflavina [fórmula (V)], N13- 1'-β-D-olivosilarciriaflavina [fórmula (VI)], N13- 1'-β-L-ramnosil-k252c [fórmula (XII)], N13- 1' -β-L-olivosil-k252c [formula (XIII)], N13- 1'-β-L-digitoxosil-k252c [formula (XIV)], N13- 1'-β-D-olivosil-k252c [formula (XV)]. Los valores numéricos hacen referencia a la actividad kinasa remanente (en %) tras el tratamiento con el compuesto ensayado a las concentraciones de 10 nM y 100 nM. Las kinasas ensayadas son AmpKa1, AurA, CamK2a, Chk1, Dyrk1a, Erk2, FGFR1, FGFR3, Ftl3, GSK3β, HGK, Ikkb, Jak2, KDR, MST2, p38a, PDK1, RSK1 y SGK1.

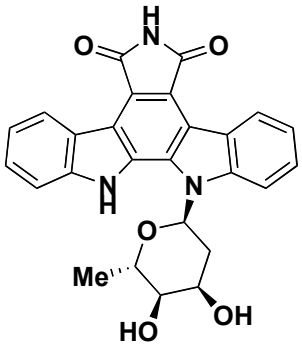
	III		IV		V		VI		XII		XIII		XIV		XV	
Kinase	**100nM**	**10nM**	**100nM**	**10nM**	**100nM**	**10nM**	**100nM**	**10nM**	**100nM**	**10nM**	**100nM**	**10nM**	**100nM**	**10nM**	**100nM**	**10nM**
AmpKa1	11	1	21	3	28	8	33	5	7	1	10	-3	1	2	9	-3
AurA	5	0	19	4	22	4	13	3	3	2	24	2	5	1	20	3
CamK2a	3	-5	29	36	58	15	46	4	2	-6	27	-6	26	-7	29	-6
Chk1	15	-3	35	5	81	45	50	2	8	2	27	1	46	6	20	4
Dyrk1a	103	87	75	32	87	49	94	62	115	101	89	42	73	15	50	14
Erk2	-4	-6	-3	-2	0	-4	30	-1	-1	-3	3	-4	0	-4	-2	-4
FGFR1	4	3	21	3	34	7	25	1	5	1	7	-1	5	1	7	-2
FGFR3	-4	-10	3	-6	-1	-6	-11	-8	-1	-2	-6	-4	-11	-6	-13	-20
FLT3	25	-10	81	20	95	63	98	51	35	-7	89	34	79	20	106	76
GSK3b	72	21	69	21	81	42	69	18	8	3	9	2	7	1	0	0
HGK	89	30	62	9	90	54	83	35	91	44	76	16	78	20	89	36
Ikkb	32	-10	60	9	76	37	50	7	12	-5	33	-5	24	27	16	-5
JAK2	33	-3	74	19	65	23	88	42	39	7	79	14	25	-4	89	37
KDR	21	-7	68	21	63	28	40	2	6	-1	48	7	16	1	18	-4
MST2	10	2	15	2	54	16	65	13	19	4	33	4	34	7	78	12
p38a	-1	0	-2	-2	-2	1	-1	-1	0	-1	-3	-2	-2	-1	-3	-1
PDK1	46	-6	71	7	97	61	76	21	15	-10	81	9	94	30	81	3
RSK1	20	2	77	14	77	38	74	31	7	-4	56	7	22	-1	31	-1
SGK1	13	8	17	9	37	17	27	12	6	7	15	8	14	6	12	9
SYK	-8	2	35	11	24	13	31	5	10	8	30	12	11	-1	29	7

REIVINDICACIONES

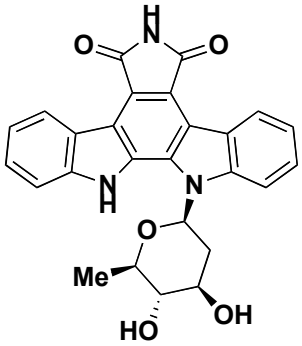
1. Un compuesto seleccionado de entre el grupo:



(IV)

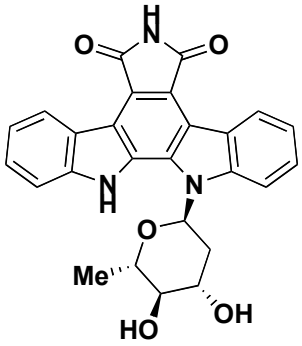


(V)

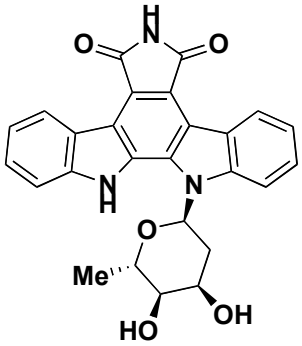


(VI)

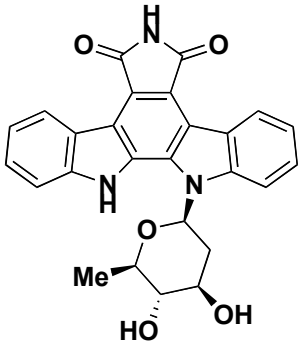
2. Un método para producir derivados de rebecamicina o estaurosporina seleccionados de entre el grupo:



(IV)



(V)



(VI)

que comprende:

a) incubar una cepa bacteriana derivada de *Streptomyces albus* para producir una composición que incluye un derivado de rebecamicina o de estaurosporina; y

b) aislar un derivado de rebecamicina o estaurosporina a partir de la composición producida en el paso (a),

caracterizado porque dicha cepa tiene ácidos nucleicos adicionales que codifican enzimas activos para la biosíntesis de indolocarbazoles glicosilados, no estando estos enzimas presentes en *Streptomyces albus*

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la cepa bacteriana se selecciona entre *Streptomyces albus* 16GNT (pLNBIV), *Streptomyces albus* 16GNT (pLN2) o *Streptomyces albus* 16GNT (pLNR).

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque dicha cepa se selecciona entre:

(i) *Streptomyces albus* 16GNT (pLNBIV), y donde dichos ácidos nucleicos son los plásmidos pKC16GNT y pLNBIV que codifican enzimas activos para la biosíntesis del compuesto de fórmula (IV) y de sus intermediarios biosintéticos,

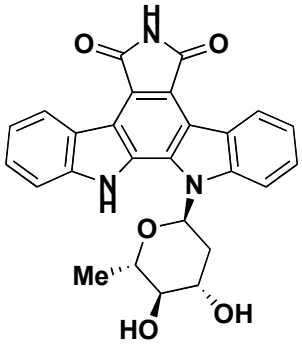
(ii) *Streptomyces albus* 16GNT (pLN2), y donde dichos ácidos nucleicos son los plásmidos pKC16GNT y pLN2 que codifican enzimas activos para la biosíntesis del compuesto de fórmula (V) y de sus intermediarios biosintéticos,

(iii) *Streptomyces albus* 16GNT (pLNR), y donde dichos ácidos nucleicos son los plásmidos pKC16GNT y pLNR que codifican enzimas activos para la biosíntesis del compuesto de fórmula (VI) y de sus intermediarios biosintéticos.

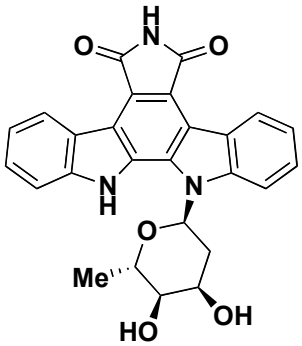
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la cepa bacteriana se obtiene mediante un método que comprende la introducción de un ácido nucleico en *Streptomyces albus* o en una cepa derivada de *Streptomyces albus*.

6. El método de la reivindicación 5, donde la introducción de un ácido nucleico comprende la introducción de plásmidos seleccionados de plásmidos pKC16GNT y pLNBIV, plásmidos pKC16GNT y pLN2, o plásmidos pKC16GNT y pLNR, en *Streptomyces albus*.

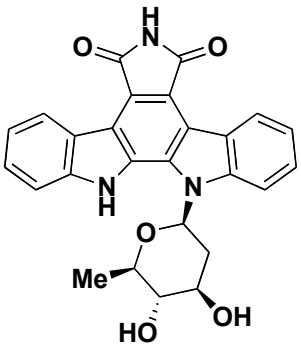
7. Una preparación farmacéutica que comprende, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto seleccionado de entre el grupo,



(IV)



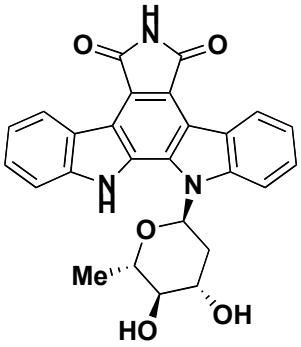
(V)



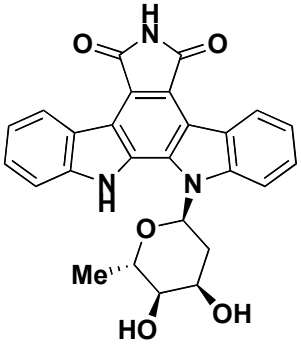
(VI)

o una sal farmacéuticamente efectiva, o solvato del mismo, junto con uno o más excipientes y diluyentes.

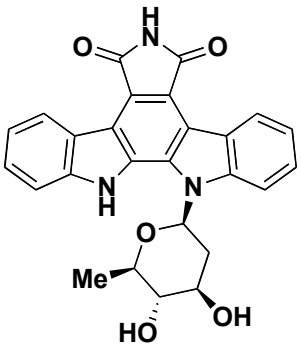
8. Un compuesto seleccionado de entre el grupo,



(IV)



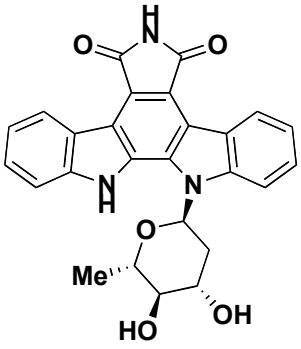
(V)



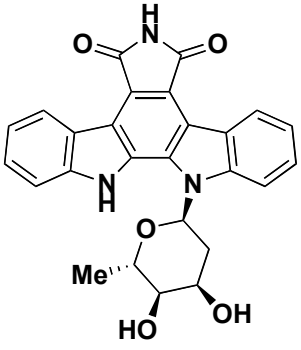
(VI)

o una sal farmacéuticamente efectiva, o solvato del mismo, para uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

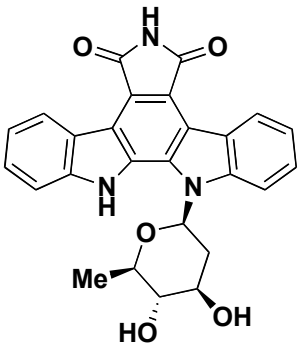
9. Un compuesto seleccionado de entre el grupo,



(IV)



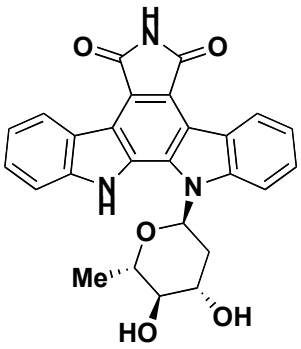
(V)



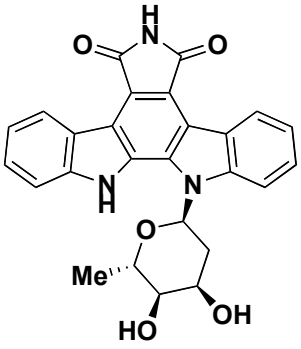
(VI)

o una sal farmacéuticamente efectiva, o solvato del mismo, para uso en el tratamiento de una enfermedad neurológica en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

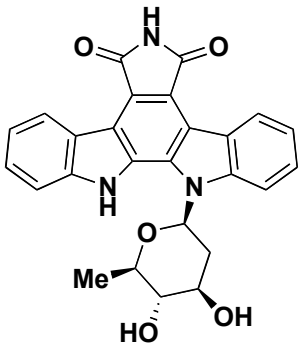
10. Un compuesto seleccionado de entre el grupo,



(IV)



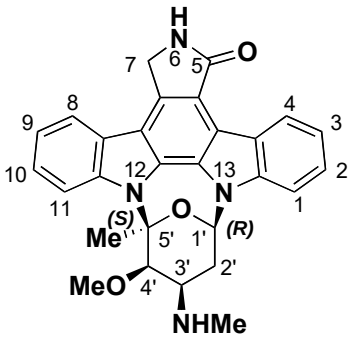
(V)



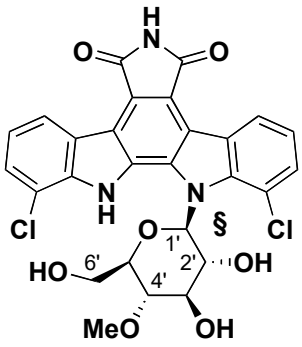
(VI)

o una sal farmacéuticamente efectiva, o solvato del mismo, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

FIG. 1


H
N
6
5
O
7
8
9
10
11
12
13
4
3
2
1
N
O
N
(S)
Me
5'
1'
(R)
3'
2'
MeO
4'
NHMe

STP


H
N
O
O
N
H
N
Cl
O
1'
§
Cl
HO
6'
2'
OH
4'
MeO
OH

RBM

FIG. 2

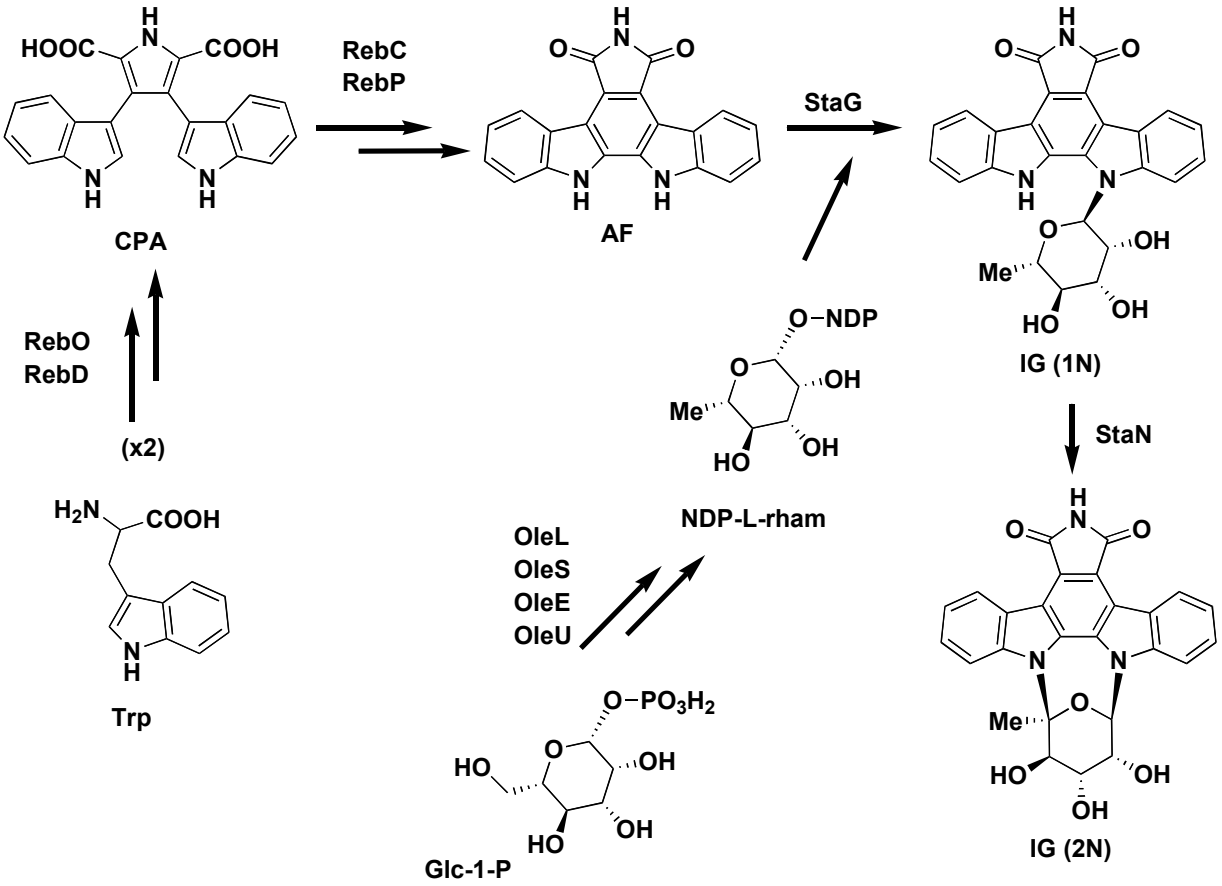

HOOC
COOH
CPA
RebC
RebP
AF
StaG
IG (1N)
RebO
RebD
(x2)
Trp
O–NDP
Me
OH
HO
NDP-L-rham
StaN
OleL
OleS
OleE
OleU
O–PO3H2
Glc-1-P
IG (2N)

FIG. 3

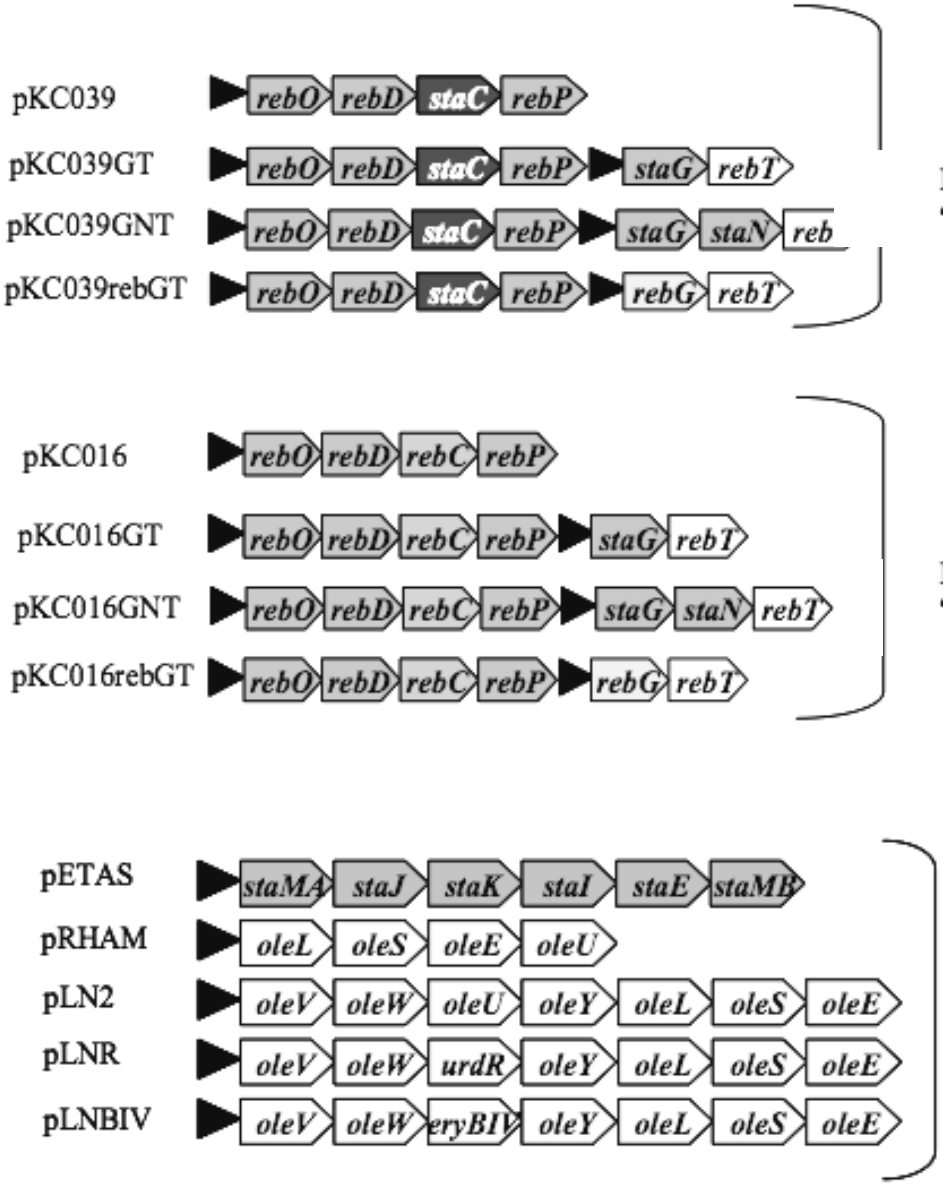

pKC039
rebO rebD staC rebP
pKC039GT
rebO rebD staC rebP staG rebT
pKC039GNT
rebO rebD staC rebP staG staN reb
pKC039rebGT
rebO rebD staC rebP rebG rebT
pKC016
rebO rebD rebC rebP
pKC016GT
rebO rebD rebC rebP staG rebT
pKC016GNT
rebO rebD rebC rebP staG staN rebT
pKC016rebGT
rebO rebD rebC rebP rebG rebT
pETAS
staMA staJ staK staI staE staMB
pRHAM
oleL oleS oleE oleU
pLN2
oleV oleW oleU oleY oleL oleS oleE
pLNR
oleV oleW urdR oleY oleL oleS oleE
pLNBIV
oleV oleW eryBIV oleY oleL oleS oleE

FIG. 4A

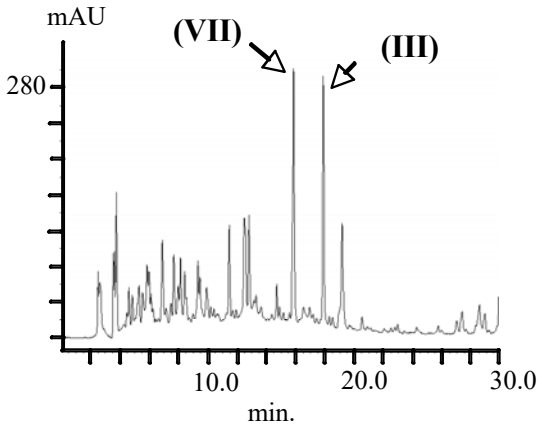


FIG. 4B

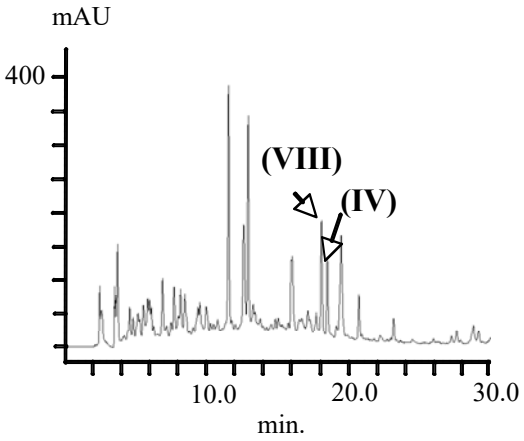


FIG. 4C

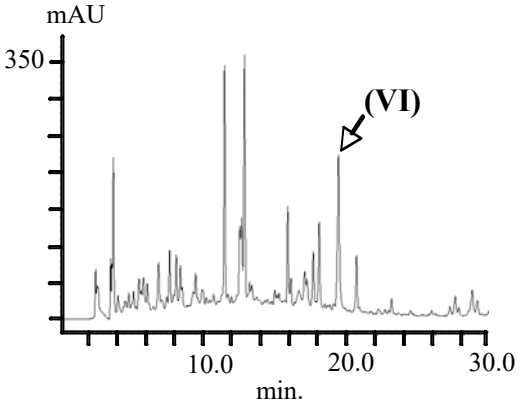


FIG. 4D

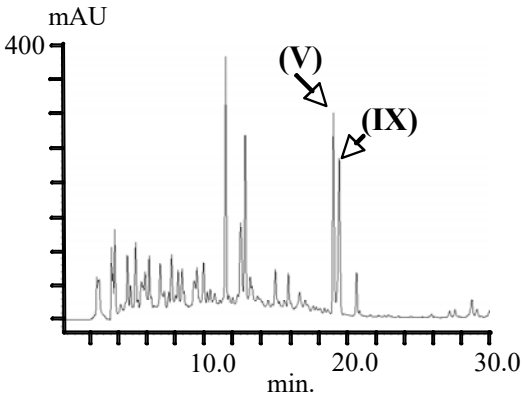
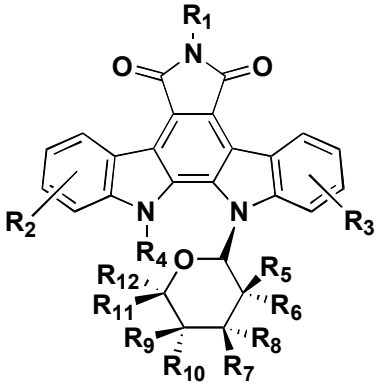
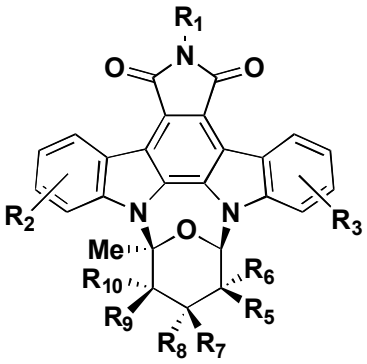


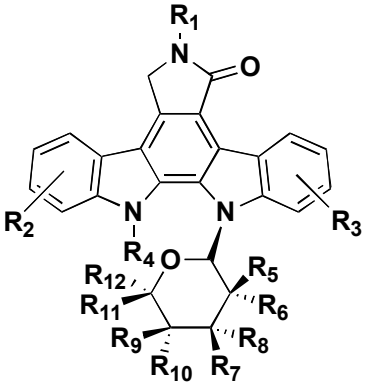
FIG. 5



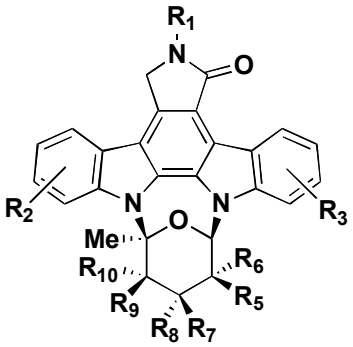
(I)



(II)



(X)



(XI)

Cpt	Fórmula General	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8	R_9	R_{10}	R_{11}	R_{12}
(III)	(I)	H	H	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	H	Me
(IV)	(I)	H	H	H	H	H	H	H	OH	OH	H	H	Me
(V)	(I)	H	H	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H	Me
(VI)	(I)	H	H	H	H	H	H	OH	H	H	OH	Me	H
(VII)	(II)	H	H	H	-	H	OH	H	OH	OH	H	-	-
(VIII)	(II)	H	H	H	-	H	H	H	OH	OH	H	-	-
(IX)	(II)	H	H	H	-	H	H	OH	H	OH	H	-	-
(XII)	(X)	H	H	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	H	Me
(XIII)	(X)	H	H	H	H	H	H	H	OH	OH	H	H	Me
(XIV)	(X)	H	H	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H	Me
(XV)	(X)	H	H	H	H	H	H	OH	H	H	OH	Me	H
(XVI)	(XI)	H	H	H	-	H	OH	H	OH	OH	H	-	-
(XVII)	(XI)	H	H	H	-	H	H	H	OH	OH	H	-	-
(XVIII)	(XI)	H	H	H	-	H	H	OH	H	OH	H	-	-

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

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

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4487925 A **[0002] [0003]**
- US 4552842 A **[0002] [0003]**
- US 4785085 A **[0002] [0003]**
- EP 0545195 A **[0002]**
- EP 0602597 A **[0002]**
- WO 9807433 A **[0002]**
- WO 9902532 A **[0002]**
- WO 9530682 A **[0002]**
- US 5475110 A **[0002]**
- US 5468872 A **[0002]**
- US 6686385 B **[0002]**
- US 6610727 B **[0002]**
- US 6855698 B **[0002]**
- ES 2255331 A1 **[0005]**
- US 3710795 A **[0032]**

Literatura no patente citada en la descripción

- Studies in Natural Product Chemistry. Elsevier, 1993, vol. 12, 365-409 **[0002]**
- *Chem. Rev.,* 2002, vol. 102, 4303–4427 **[0002]**
- *Nat. Prod. Rep.,* 2006, vol. 23, 1007-1045 **[0002] [0003]**
- *J. Antibiot.,* 1977, vol. 30, 275–282 **[0002]**
- *Tetrahedron Lett.,* 1985, vol. 26, 4011–4014 **[0002]**
- *J. Antibiot.,* 1987, vol. 40, 668–678 **[0002]**
- *Eur. J. Med. Chem.,* 2003, vol. 38, 123-140 **[0002] [0003]**
- *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents,* 2002, vol. 2, 255–266 **[0002] [0003]**
- *Anti-Cancer Drug Design,* 2000, vol. 15, 43-52 **[0002] [0003]**
- *J. Med. Chem.,* 2005, vol. 48, 2600-2611 **[0002] [0003]**
- *Tetrahedron Letters,* 2004, vol. 45, 1095–1098 **[0002]**
- *Nat. Prod. Rep.,* 2005, vol. 22, 162–195 **[0003]**
- *Trends Biotechnol.,* 2001, vol. 19, 449-456 **[0004]**
- *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.,* 2005, vol. 9, 77-85 **[0004]**
- *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.,* 2005, vol. 8, 748–756 **[0004]**
- *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.,* 2006, vol. 33, 560–568 **[0004]**
- *Curr. Opin. Microbiol.,* 2006, vol. 9, 252-260 **[0004]**
- *Chem. Biol.,* 2002, vol. 9, 519-531 **[0005]**
- *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 2003, vol. 67, 127–138 **[0005]**
- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 2005, vol. 102, 461–466 **[0005] [0037]**
- *Mol. Microbiol.,* 2005, vol. 58, 17-27 **[0005] [0040] [0045] [0048]**
- Practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation, 2000 **[0007]**
- *J. Nat. Prod.,* 2002, vol. 65, 779-782 **[0008]**
- *Chembiochem.,* 2004, vol. 5, 1181-1187 **[0008]**
- *Tetrahedron Lett.,* 2004, vol. 45, 1095–1098 **[0011]**
- *J. Antibiot.,* 1986, vol. 39, 1059–1065 **[0014]**
- *J. Antibiot.,* 1986, vol. 39, 1066–1071 **[0014]**
- *J. Antibiot.,* 1990, vol. 43, 168–173 **[0014]**
- *J. Antibiot.,* 1990, vol. 43, 163–167 **[0014]**
- *J. Antibiot.,* 1992, vol. 45, 278–279 **[0014]**
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 **[0036]**
- **KIESER et al.** Practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation, 2000 **[0036] [0038]**
- *Mol. Microbiol.,* 1998, vol. 28, 1177–1185 **[0037]**
- *J. Gene. Microbiol.,* 1980, vol. 116, 323-334 **[0038]**
- *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.,* 2000, vol. 2, 271-276 **[0038]**
- *Chem. Biol.,* 2002, vol. 9, 721-729 **[0038]**
- *J. Nat. Prod.,* 2002, vol. 65, 1685–1689 **[0038]**
- **FAIRCLOTH et al.** *Journal of Tissue and Culture Methods,* 1988, vol. 11, 201-205 **[0055]**