



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 326 459**

② Número de solicitud: 200801077

⑤ Int. Cl.:

C07H 19/23 (2006.01)

C12P 19/28 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **08.04.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.2009**

Fecha de la concesión: **13.05.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **28.05.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.05.2010

⑰ Titular/es: **Universidad de Oviedo**
Plaza de Riego, 4 - Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES
ENTRECHEM S.L.

⑱ Inventor/es: **Pérez Salas, Aaroa;**
Sánchez Reillo, César;
F. Braña, Alfredo;
Menédez Fernández, Carmen;
Salas Fernández, José Antonio y
Morís Varas, Francisco

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Indolocarbazoles glicosilados, su procedimiento de obtención y sus usos.**

㉒ Resumen:

Indolocarbazoles glicosilados, su procedimiento de obtención y sus usos. Esta invención se refiere a derivados de rebecamicina y estaurosporina obtenidos por fermentación de cepas bacterianas recombinantes. La invención se refiere también a los procedimientos empleados para la obtención de las cepas recombinantes y la producción de derivados de rebecamicina y estaurosporina. La invención también se refiere a cepas bacterianas útiles para la producción de derivados de rebecamicina y estaurosporina. Finalmente, los derivados de rebecamicina y estaurosporina aquí descritos son de aplicación en el campo de la salud humana, en concreto para fabricar medicamentos útiles en el tratamiento de enfermedades tumorales, neurológicas e inflamatorias.

ES 2 326 459 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Indolocarbazoles glicosilados, su procedimiento de obtención y sus usos.

5 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

10 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 (REM), 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 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; 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).

25 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 DNA 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 pinol, 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 DNA topoisomerasa I, mientras que la STP es un inhibidor de proteína quinasas.

40 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.

55 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

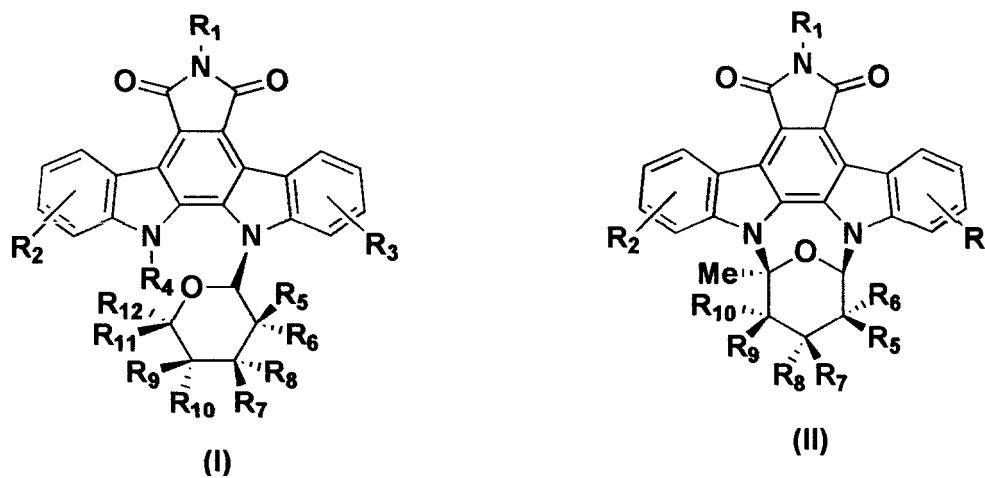
65 La presente invención proporciona nuevos compuestos derivados de Rebecamicina y Estaurosporina, pertenecientes a la familia de indolocarbazoles glicosilados. La presente invención también proporciona nuevas cepas bacterianas que producen indolocarbazoles glicosilados. Estas cepas bacterianas son obtenidas mediante la introducción de cier-

tos 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 en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 461-466; *Mol. Microbiol.* 2005, 58, 17-27. 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 neuroprotectora, actividad inhibidora de proteína quinasas, actividad inhibidora de DNA topoisomerasas, y otras.

Asimismo, la presente invención proporciona compuestos caracterizados por las siguientes fórmulas (I) y (II):



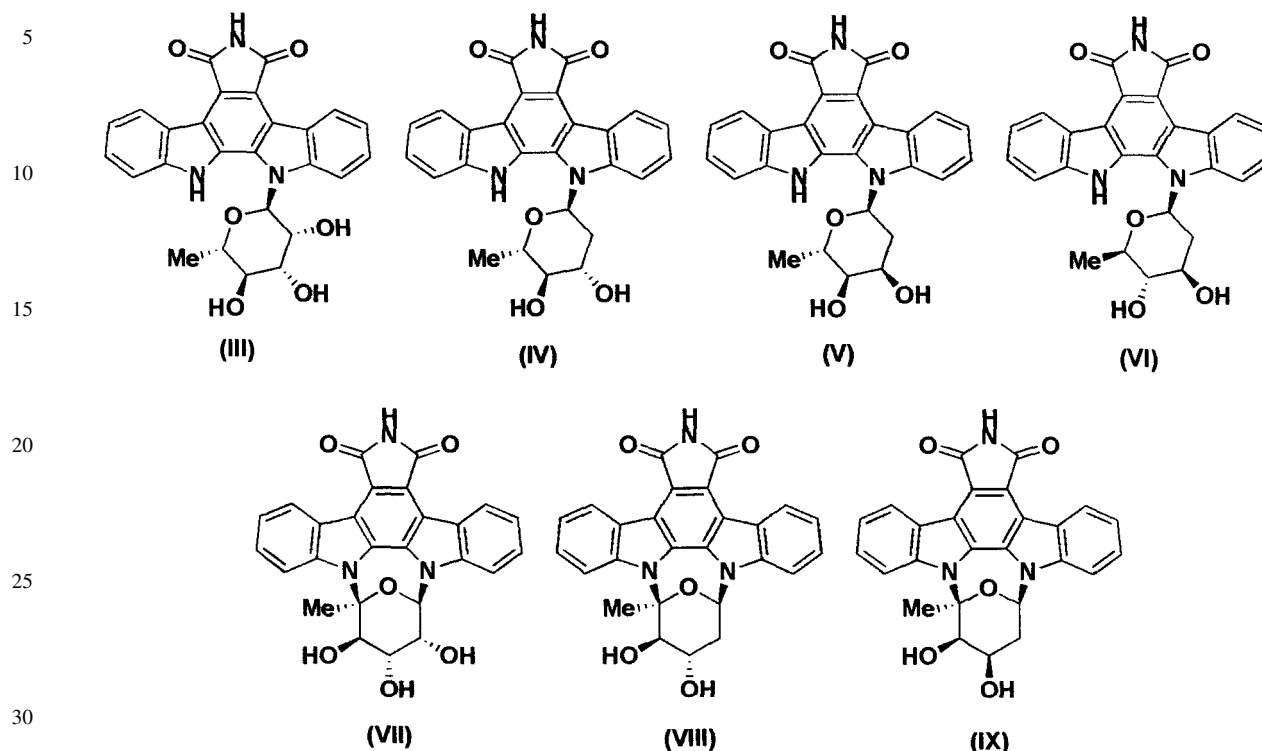
donde

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 alqueno, un grupo alquino, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo alquilarilo, un grupo éster, un grupo carbonato, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo uretano, un grupo sililo, un grupo sulfoxo o una combinación de ellos,

R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} son, cada uno e independientemente, hidrógeno, hidroxilo (-OH) o un grupo -OR₁₃, donde R₁₃ es un grupo protector según la definición anterior,

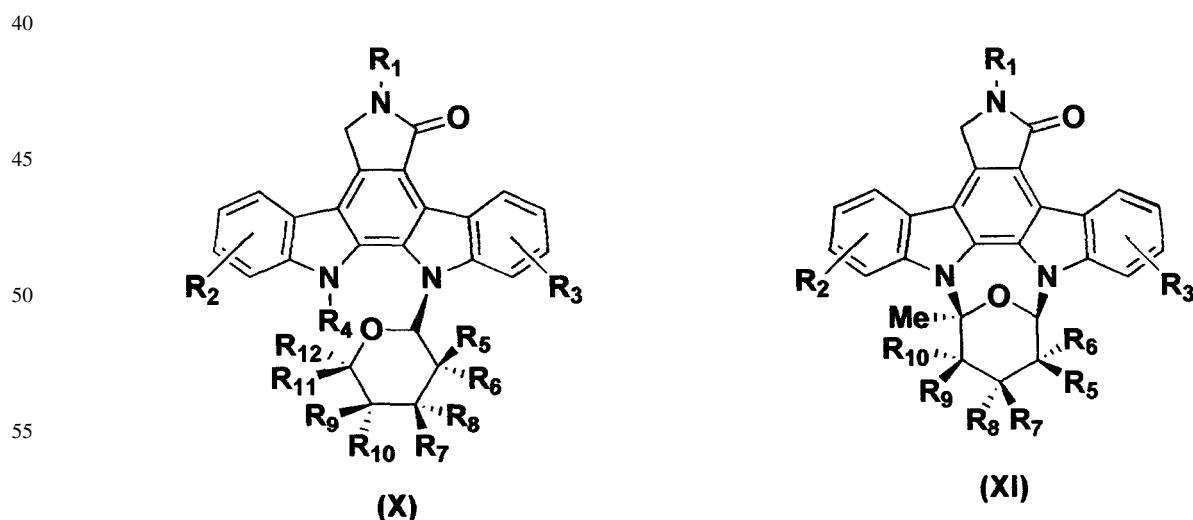
R_{11} y R_{12} son cada uno e independientemente hidrógeno, metilo (-CH₃), un grupo hidroximetilo (-CH₂OH) o un grupo -CH₂OR₁₄, donde R₁₄ es un grupo protector según la definición anterior.

En particular, la presente invención proporciona, entre otros, los compuestos con las fórmulas (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX):



35 El compuesto de fórmula (III) es nuevo pues anteriormente se describió un indolocarbazol glicosilado similar pero cuya estereoquímica no está definida en el enlace glicosídico, que en el caso de esta invención es de configuración 13 (Tetrahedron Lett. 2004, 45, 1095-1098).

40 Asimismo, la presente invención proporciona nuevos usos para los compuestos caracterizados por las fórmulas (X) y (XI):



60 donde

65 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 alcoialquilo, un grupo alquenoilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo alquilarilo, un grupo éster, un grupo carbonato, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo uretano, un grupo sililo, un grupo sulfoxo o una combinación de ellos,

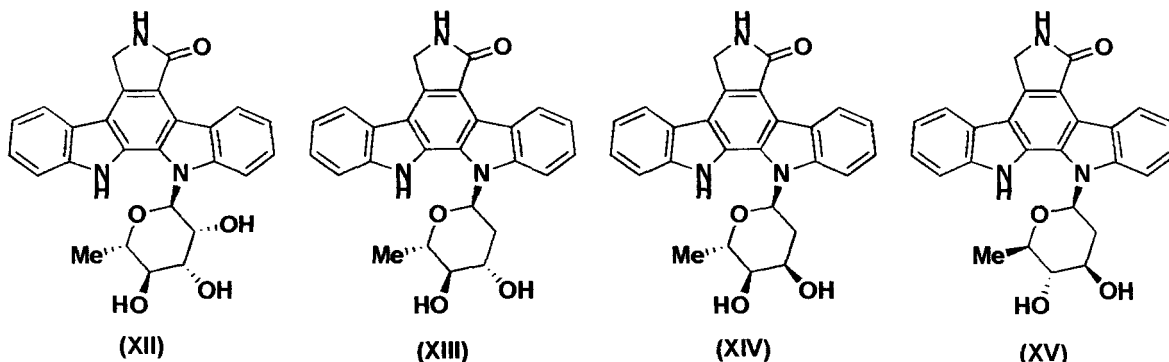
ES 2 326 459 B1

R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son, cada uno e independientemente, hidrógeno, hidroxilo (-OH) o un grupo -OR₁₃, donde R₁₃ es un grupo protector según la definición anterior,

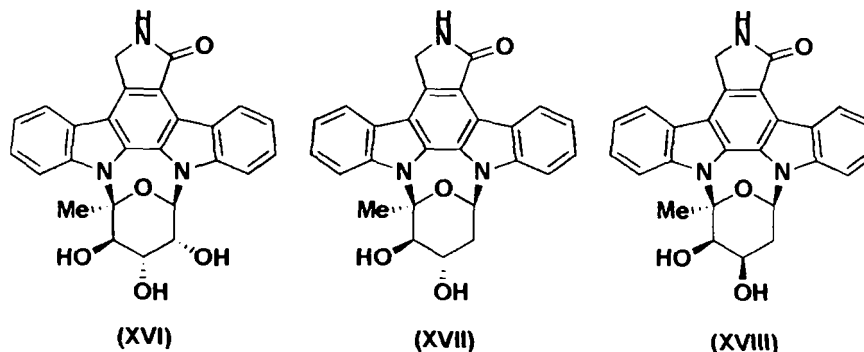
R₁₁ y R₁₂ son cada uno e independientemente hidrógeno, metilo (-CH₃), un grupo hidroximetilo (-CH₂OH) o un grupo -CH₂OR₁₄, donde R₁₄ es un grupo protector según la definición anterior.

En particular, la presente invención proporciona nuevos usos para, entre otros, los compuestos con las fórmulas (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII):

10



25



40

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).

45

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

50

De esta forma, son objeto de la presente invención 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.

55

Es también objeto de la presente invención 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.

60

Es también objeto de la presente invención 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.

65

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 cánceroso (maligno) o no cánceroso (benigno). Una célula tumoral cáncerosa puede invadir los tejidos normales a su alrededor y los vasos sanguíneos/linfáticos y formar metastasis en tejidos alejados del tumor original. Por el contrario, una célula tumoral no cáncerosa puede crecer y comprimir los tejidos normales adyacentes pero no

ES 2 326 459 B1

puede invadir tejidos normales y vasos sanguíneos/linfáticos, y tampoco puede formar metástasis en tejidos alejados del tumor original.

5 Es también objeto de la presente invención 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.

10 Es también objeto de la presente invención 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.

15 Es también objeto de la presente invención 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 para el tratamiento del cáncer.

20 Es también objeto de la presente invención 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.

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

30 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.

35 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.

40 Es también objeto de la presente invención 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 para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

45 Es también objeto de la presente invención 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.

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

55 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, Ft13, FGFR1, HGK, Ikkb, Jak2, KDR, SYK, y otras.

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

A los efectos de la presente invención y su descripción, el término “derivado” de la rebecamicina o estaurosporina debe interpretarse como un compuesto cubierto por cualesquiera de las fórmulas (I), (II), (X) o (XI). Del mismo modo, el término “prodroga” debe interpretarse a los efectos de la presente invención 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 (arcyriaflavina 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): N¹²-5'(S)-N¹³-1'-(R)-L-ramnosilarcyriaflavina [fórmula (VII)]; (III): N¹³-1'-β-L-rhamnosilarcyriaflavina [fórmula (III)]; (VIII): N¹²-5'(S)-N¹³-1'-(R)-L-olivosilarcyriaflavina [fórmula (VIII)]; (IV): N¹³-1'-β-L-olivosilarcyriaflavina [fórmula (IV)]; (VI): N¹³-1'-β-D-olivosilarcyriaflavina [fórmula (VI)]; (V): N¹³-1'-β-L-digitoxosilarcyriaflavina [fórmula (V)]; (IX): N¹²-5'(S)-N¹³-1'-(R)-L-digitoxosilarcyriaflavina [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 invención, se exponen los siguientes ejemplos, descritos en detalle, que deben entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

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 indolcarbazol (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'-TATCTAGAGT CAGTTCAGTACGGCGGGC-3'). Este fragmento de DNA fue clonado como un fragmento *SpeI XbaI* en los mismos sitios de LITMUS 28 (New England BioLabs), generándose el plásmido pLGTfstaN. Seguidamente, el plásmido pKC16GNT fue obtenido mediante la donación en tándem, en el sitio *XbaI* 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 *HindIII BamHI* 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 indolcarbazólicos 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 primeramente 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 1 µm (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 lineal hasta alcanzar el 88% en el minuto 30, finalmente se bombeó 100% acetonitrilo durante 5 minutos, con un flujo de 0,25 ml/min. El análisis de masas se realizó mediante ionización por electrospray (ESI) en modo positivo, con un voltaje de capilar de 3 KV y voltajes de cono de 20, 60 y 100 V. 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 0,1 M pH 7 a cada una de ellas. Los extractos, previamente disueltos en un pequeño volumen

ES 2 326 459 B1

de DMSO y acetona (50:50) se cromatografiaron en un cartucho de compresión radial μ Bondapak 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'- β -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'- β -L-olivosilarciriaflavina [fórmula (IV)]. A partir de *S. albus* 16GNT(pLNR): 0,8 mg de N^{13} -1'- β -D-olivosilarciriaflavina [fórmula (VI)]. A partir de *S. albus* 16GNT(pLNBIV): 1,6 mg de N^{13} -1'- β -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 ion m/z de 454 y otro con ion 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 ion 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 μ g de producto puro en 200 μ l 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 5 mm 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 el ratio de producto a la suma de picos (P/(P+S)). Este valor se 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 quinasas, en μ M: obtenidas de Carna Biosciences: MAPKAPK2 (4,6), AurA (3,6), AurB (5), PKC ζ (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), GSK3 β (7,3), Erk2 (62,1), PKAC α (1,7), AKT2 (186,1), INSR (871,8), p38a (396,5), AKT1(48), MSK1 (21,2),

ES 2 326 459 B1

PKC β 2 (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), PKG α (16), PAK2 (1,9), IGF1R (320), FGFR1 (171), MARK1 (33), CAMK2 δ (22,4), c-TAK1 (66), DYRK1a (18,1), CaMK4 (3,9), FLT3 (350), c-Raf (6,2), P70S6K (95).

5 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 transfirió 1 μ L de cada concentración, en duplicado, a una microplaca de 384 pocillos. Se añade a cada pocillo 12 μ L, 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 10 mM MgCl $_2$ como cofactor, excepto para INSR y IRAK4 en que se usa 10 mM MnCl $_2$ en lugar del MgCl $_2$. Para las quinasas CAMK2 δ y CAMK4 se añade además 1 mM CaCl $_2$ y 6,7 μ g/mL de calmodulina. Para la quinasa KDR, se añade 0,05% del detergente CHAPSO. Para la quinasa c-Raf se añade 10 mM MnCl $_2$. Para PKC β 2 se añaden 0,02 μ g/mL de PS/PMA. Para PKG α se añade 10 μ M de cGMP (guanosina monofosfato cíclico).
10 El compuesto y el enzima se dejan 15 minutos preincubando, y a continuación se añaden a cada pocillo 12 μ L de tampón péptido/ATP conteniendo 100 mM HEPES, pH 7.5, 1.5 μ M péptido marcado con fluoresceína (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 1-1,5 h a temperatura ambiente para obtener una conversión adecuada (15-40%) del péptido al producto fosforilado. Las reacciones fueron terminadas mediante la adición de 45 μ L de tampón conteniendo 0 mM 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 Xfit.

15 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 100 nM y 10 nM. Aquéllas parejas que proveían >70% de inhibición a 10 nM se consideraron para medir su IC50.

20 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 100 nM y 10 nM. Por ejemplo, la actividad de la quinasa Dyrkla 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 10 nM.

Ejemplo 5

25 *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.

30 Se inoculan placas de "microtiter" de 96 pocillos, con células (5x10 3 células por pocillo) en alícuotas de 195 μ l 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 μ l, en un rango de concentraciones de 10 a 10 $^{-8}$ μ g/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 μ l de ácido tricloroacético frío al 50% (p/v) y se incuban durante 60 min. a 4°C. Las placas se lavan con agua desionizada y se secan. Se añaden 100 μ l de solución de SRB (0.4% p/v en ácido acético al 1%) a cada pocillo, y se incuban 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.

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

60

65

ES 2 326 459 B1

TABLA 1

Datos de espectros de RMN de N13-1'-β-L-rhamnosilarciriaflavina [fórmula (III)] en acetona-d₆.
(1H a 600 MHz, 13C a 150 MHz)

Posición	δ ¹³ C (ppm)	δ 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	8,38,4
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'CH ₃	15,42	1,825	d	7,3

ES 2 326 459 B1

TABLA 2

Datos de espectros de RMN de $N13-1'-\beta-L$ -olivosilarciriaflavina [fórmula (IV)] en acetona- d_6 .
($1H$ a 600 MHz, $13C$ a 150 MHz)

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	δ^1H (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

ES 2 326 459 B1

TABLA 3

Datos de espectros de RMN de $N13-1'-\beta-L$ -digitoxosilarciriaflavina [fórmula (V)] en acetona- d_6 .
($1H$ a 600 MHz, $13C$ a 150 MHz)

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	δ^1H (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

ES 2 326 459 B1

TABLA 4

Datos de espectros de RMN de $N13-1'-\beta$ -D-olivosilarciriaflavina [fórmula (VI)] en acetona- d_6 .
($1H$ a 600 MHz, $13C$ a 150 MHz)

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	δ^1H (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

ES 2 326 459 B1

TABLA 5

Datos de espectros de RMN de N12-5'(S)-N13-1'-(R)-L-ramnosilarciriaflavina [fórmula (VII)] en acetona-d₆.
(1H a 600 MHz, 13C a 150 MHz)

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (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	

ES 2 326 459 B1

TABLA 6

Datos de espectros de RMN de $N^{12}-5'(S)-N^{13}-1'-(R)-L$ -olivosilarciriaflavina [fórmula (VIH)] en acetona- d_6 .
(1H a 600 MHz, ^{13}C a 150 MHz)

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	δ^1H (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	

ES 2 326 459 B1

TABLA 7

Datos de espectros de RMN de $N^{12}-5'(S)-N^{13}-1'-(R)-L$ -digitoxosilarciriaflavina [fórmula (IX)] en acetona- d_6 .
(1H a 600 MHz, ^{13}C a 150 MHz)

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	δ^1H (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	

ES 2 326 459 B1

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'- β -L-rhamnosilarciriaflavina [fórmula (III)], N^{13} -1'- β -L-olivosilarciriaflavina [fórmula (IV)], N^{13} -1'- β -L-digitoxosilarciriaflavina [fórmula (V)], N^{13} -1'- β -D-olivosilarciriaflavina [fórmula (VI)], N^{12} -5'(S)- N^{13} -1'-(R)-L-rhamnosilarciriaflavina [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'- β -L-rhamnosil-k252c [fórmula (XII)], N^{13} -1'- β -L-olivosil-k252c [fórmula (XIII)], N^{13} -1'- β -L-digitoxosil-k252c [fórmula (XIV)], N^{13} -1'- β -D-olivosil-k252c [fórmula (XV)], N^{12} -5'(S)- N^{13} -1'-(R)-L-rhamnosil-k252c [fórmula (XVI)], N^{12} -5'(S)- N^{13} -1'-(R)-L-olivosil-k252c [fórmula (XVII)] y N^{13} -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

ES 2 326 459 B1

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 IC50 (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

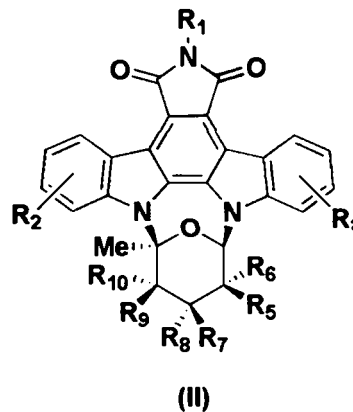
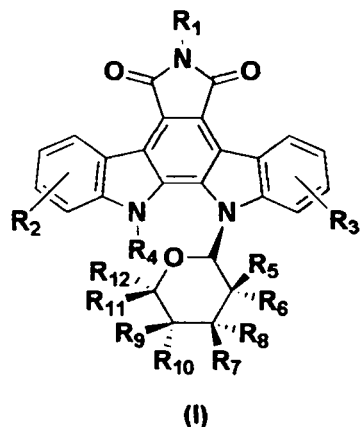
	VII	VIII	IX	XVI	XVII	XVIII
AurA	>10	>10	6.7	-	5.0	>10
AurB	-	-	4.5	-	6.8	-
Chk1	1.0	4.9	-	2.4	-	>10
Dyrk1a	4.0	-	>10	-	-	>100
Ftl3	0.57	0.56	0.43	0.59	0.54	-
FGFR1	8.9	-	>10	-	>10	>100
HGK	0.78	-	>10	-	-	>10
Ikkb	0.17	<0.03	>10	-	-	>100
Jak2	0.50	0.74	1.2	0.43	0.57	0.53
KDR	3.7	0.55	>10	-	-	>10
SYK	1.0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

Tabla 9b. Ensayo de la actividad kinasa de indolocarbazoles de los compuestos N^{13} -1'- β -L-rhamnosilcariaciaflavina [fórmula (III)], N^{13} -1'- β -L-olivosilcariaciaflavina [fórmula (IV)], N^{13} -1'- β -L-digitoxosilcariaciaflavina [fórmula (V)], N^{13} -1'- β -D-olivosilcariaciaflavina [fórmula (VI)], N^{13} -1'- β -L-rhamnosil-k252c [fórmula (XII)], N^{13} -1'- β -L-olivosil-k252c [fórmula (XIII)], N^{13} -1'- β -L-digitoxosil-k252c [fórmula (XIV)], N^{13} -1'- β -D-olivosil-k252c [fórmula (XV)]. Los valores numéricos hacen referencia a la actividad kinasa remanente (en %) tras el tratamiento con el compuesto ensayado a las concentraciones de 10nM y 100nM. Las kinasas ensayadas son AmpKa1, AurA, CamK2a, Chk1, Dyrk1a, Erk2, FGFR1, FGFR3, Ftl3, GSK3 β , HGK, Ikkb, Jak2, KDR, MST2, p38a, PDK1, RSK1, SGK1 y SGK1.

Kinase	III		IV		V		VI		XII		XIII		XIV		XV	
	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 con cualquiera de las fórmulas (I) o (H)



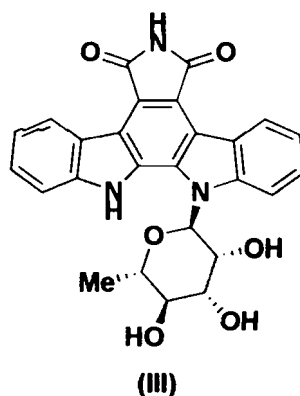
donde

R¹, R₂, R₃ y R₄ son, cada uno e independientemente, hidrógeno o un grupo protector, el cual 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 sulfoxo o una combinación de ellos,

R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son, cada uno e independientemente, hidrógeno, hidroxilo o un grupo -OR₁₃, donde R₁₃ es un grupo protector según la definición anterior,

R₁₁ y R₁₂ son, cada uno e independientemente, hidrógeno, metilo (-CH₃) o un grupo hidroximetilo (-CH₂OH).

2. El compuesto de la reivindicación 1, con la fórmula (III):

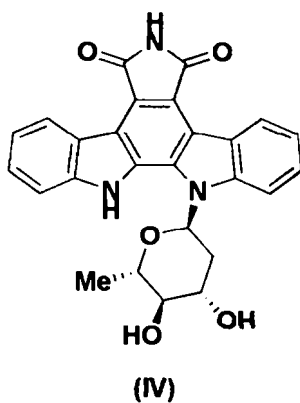


3. El compuesto de la reivindicación 1, con la fórmula (IV):

5

10

15



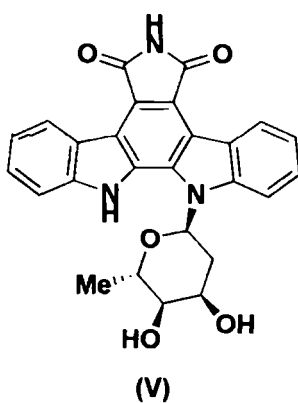
20

4. El compuesto de la reivindicación 1, con la fórmula (V):

25

30

35



40

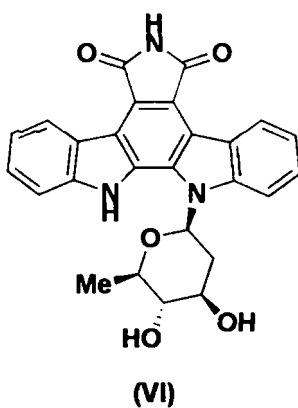
5. El compuesto de la reivindicación 1, con la fórmula (VI):

45

50

55

60



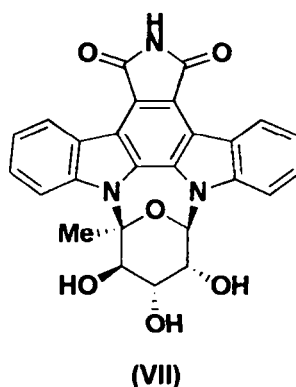
65

6. El compuesto de la reivindicación 1, con la fórmula (VII):

5

10

15



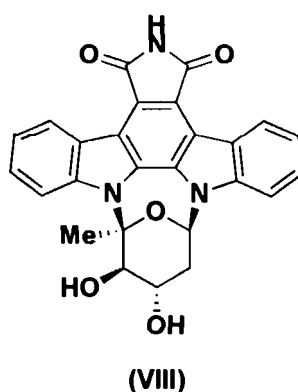
20

7. El compuesto de la reivindicación 1, con la fórmula (VIII):

25

30

35



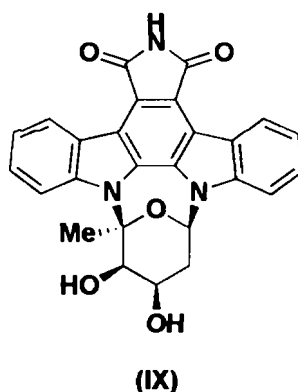
40

8. El compuesto de la reivindicación 1, con la fórmula (IX):

45

50

55



60

9. Cepas bacterianas derivadas de *Streptomyces albus*, **caracterizadas** porque cada una de dichas cepas poseen ácidos nucleicos adicionales que codifican enzimas activos para la biosíntesis de indolocarbazoles glicosilados, no estando estos enzimas presentes en *Streptomyces albus*.

10. Una cepa bacteriana según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicha cepa es *Streptomyces albus* 16GNT (pRHAM).

65

11. Una cepa bacteriana de la reivindicación 9, **caracterizada** porque dichos ácidos nucleicos son los plásmidos pKC16GNT y pRHAM, los cuales codifican enzimas activos para la biosíntesis de los compuestos de fórmula (IH) y fórmula (VII) y de sus intermediarios biosintéticos.

ES 2 326 459 B1

12. Una cepa bacteriana según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicha cepa es *Streptomyces albus* 16GNT (pLNBIV).

5 13. Una cepa bacteriana de la reivindicación 9, **caracterizada** porque dichos ácidos nucleicos son los plásmidos pKC16GNT y pLNBIV, los cuales codifican enzimas activos para la biosíntesis de los compuestos de fórmula (IV) y fórmula (VIII) y de sus intermediarios biosintéticos.

10 14. Una cepa bacteriana según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicha cepa es *Streptomyces albus* 16GNT (pLN2).

15 15. Una cepa bacteriana de la reivindicación 9, **caracterizada** porque dichos ácidos nucleicos son los plásmidos pKC16GNT y pLN2, los cuales codifican enzimas activos para la biosíntesis de los compuestos de fórmula (V) y fórmula (IX) y de sus intermediarios biosintéticos.

20 16. Una cepa bacteriana según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicha cepa es *Streptomyces albus* 16GNT (pLNR).

25 17. Una cepa bacteriana de la reivindicación 9, **caracterizada** porque dichos ácidos nucleicos son los plásmidos pKC16GNT y pLNR, los cuales codifican enzimas activos para la biosíntesis del compuesto de fórmula (VI) y de sus intermediarios biosintéticos.

30 18. Un método para obtener las cepas bacterianas de la reivindicación 9, que comprende la introducción de un ácido nucleico en *Streptomyces albus* o en una cepa derivada de *Streptomyces albus*.

35 19. El método de la reivindicación 18, donde la introducción de un ácido nucleico comprende la introducción de los plásmidos pKC16GNT y pRHAM en *Streptomyces albus*.

40 20. El método de la reivindicación 18, donde la introducción de un ácido nucleico comprende la introducción de los plásmidos pKC16GNT y pLNBIV en *Streptomyces albus*.

45 21. El método de la reivindicación 18, donde la introducción de un ácido nucleico comprende la introducción de los plásmidos pKC16GNT y pLN2 en *Streptomyces albus*.

50 22. El método de la reivindicación 18, donde la introducción de un ácido nucleico comprende la introducción de los plásmidos pKC16GNT y pLNR en *Streptomyces albus*.

55 23. Un método para producir derivados de rebecamicina o de estaurosporina según cualesquiera de las fórmulas (I) o (II), que comprende:

60 a) incubar una cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17 para producir una composición que incluye un derivado de rebecamicina o de estaurosporina; y

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

65 24. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque la cepa bacteriana es *Streptomyces albus* 16GNT (pRHAM).

70 25. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque la cepa bacteriana es *Streptomyces albus* 16GNT (pLNBIV).

75 26. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque la cepa bacteriana es *Streptomyces albus* 16GNT (pLN2).

80 27. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque la cepa bacteriana es *Streptomyces albus* 16GNT (pLNR).

85 28. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque el derivado de rebecamicina o de estaurosporina es el compuesto de fórmula (III).

90 29. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque el derivado de rebecamicina o de estaurosporina es el compuesto de fórmula (IV).

95 30. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque el derivado de rebecamicina o de estaurosporina es el compuesto de fórmula (V).

31. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque el derivado de rebecamicina o de estaurosporina es el compuesto de fórmula (VI).

ES 2 326 459 B1

32. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque el derivado de rebecamicina o de estaurosporina es el compuesto de fórmula (VII).

33. Un método según la reivindicación 23, **caracterizado** porque el derivado de rebecamicina o de estaurosporina es el compuesto de fórmula (VIII).

34. Un derivado de rebecamicina o de estaurosporina según cualesquiera de las fórmulas (I) o (II), obtenible según el método de la reivindicación 23.

35. Un derivado de rebecamicina o de estaurosporina según cualesquiera de las fórmulas (I) o (II), **caracterizado** por ser producido por una cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17.

36. Un derivado de rebecamicina o de estaurosporina según cualesquiera de las fórmulas (I) o (II), **caracterizado** por ser producido por la cepa *Streptomyces albus* 16GNT(pRHAM) de la reivindicación 10.

37. Un derivado de rebecamicina o de estaurosporina según cualesquiera de las fórmulas (I) o (II), **caracterizado** por ser producido por la cepa *Streptomyces albus* 16GNT(pLNBIV) de la reivindicación 12.

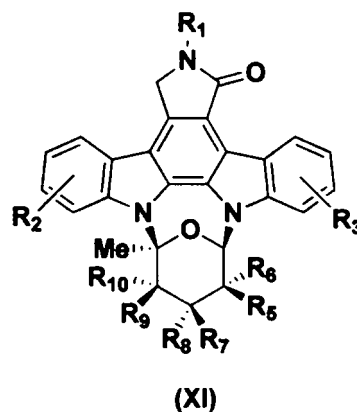
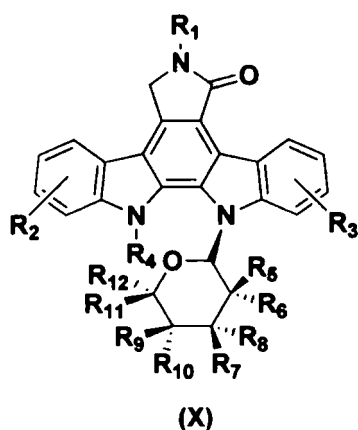
38. Un derivado de rebecamicina o de estaurosporina según cualesquiera de las fórmulas (I) o (II), **caracterizado** por ser producido por la cepa *Streptomyces albus* 16GNT(pLN2) de la reivindicación 14.

39. Un derivado de rebecamicina o de estaurosporina según cualesquiera de las fórmulas (I) o (II), **caracterizado** por ser producido por la cepa *Streptomyces albus* 16GNT(pLNR) de la reivindicación 16.

40. Una preparación farmacéutica que comprende, entre otros componentes, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la reivindicación 1, o una sal, solvato o prodroga farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más excipientes y diluyentes.

41. Una preparación farmacéutica que comprende, entre otros componentes, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la reivindicación 35, o una sal, solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, junto con uno o más excipientes y diluyentes.

42. Una preparación farmacéutica que comprende, entre otros componentes, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de cualquiera de las fórmulas (X) o (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 alcóxialquilo, un grupo alquenoilo, un grupo alquínilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo alquilarilo, un grupo éster, un grupo carbonato, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo uretano, un grupo sililo, un grupo sulfoxo o una combinación de ellos,

R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} son, cada uno e independientemente, hidrógeno, hidroxilo (-OH) o un grupo -OR₁₃, donde R₁₃ es un grupo protector según la definición anterior,

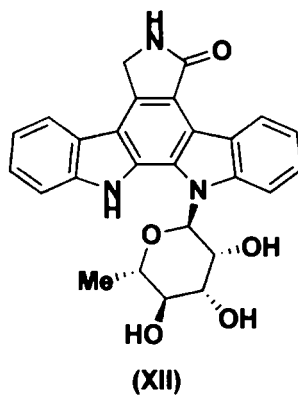
R_{11} y R_{12} son cada uno e independientemente hidrógeno, metilo (-CH₃) o un grupo hidroximetilo (-CH₂OH).

43. Una preparación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 41, donde el compuesto es de fórmula (XII)

5

10

15



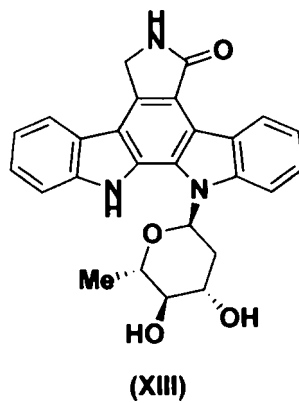
20

44. Una preparación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 41, donde el compuesto es de fórmula (XIII)

25

30

35



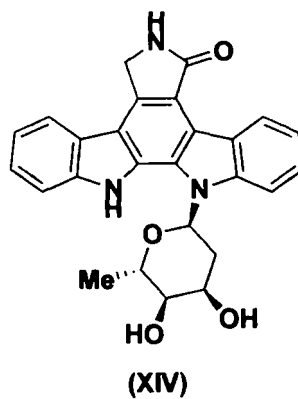
40

45. Una preparación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 41, donde el compuesto es de fórmula (XIV)

45

50

55



60

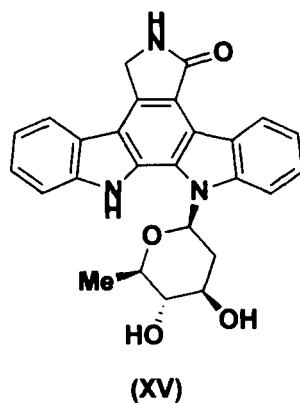
65

46. Una preparación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 41, donde el compuesto es de fórmula (XV)

5

10

15



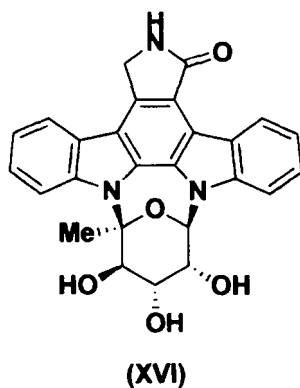
20

47. Una preparación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 41, donde el compuesto es de fórmula (XVI)

25

30

35



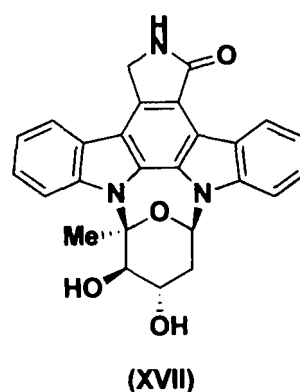
40

48. Una preparación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 41, donde el compuesto es de fórmula (XVII)

45

50

55

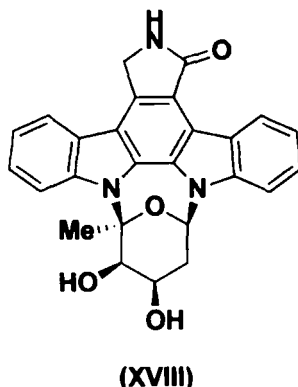


60

65

ES 2 326 459 B1

49. Una preparación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 41, donde el compuesto es de fórmula (XVIII)



20 50. Uso de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) o (XVIII) como inhibidor de actividad proteína quinasa.

25 51. Uso según la reivindicación 50, **caracterizado** porque la quinasa es elegida entre el siguiente grupo de quinastas: AurA, AurB, Chk1, Dyrk1a, Ft13, FGFR1, HGK, Ikkb, Jak2, KDR y SYK.

30 52. Una preparación farmacéutica que comprende, entre otros componentes, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto con cualesquiera de las fórmulas (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) o (XVIII), o una sal, solvato o prodroga farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más excipientes y diluyentes.

35 53. Uso de un compuesto de cualesquiera de las fórmulas (I) o (II), según la reivindicación 1, o de las fórmulas (X) o (XI) según la reivindicación 42, o una sal, solvato o prodroga farmacéuticamente aceptable del mismo, en la manufactura de un medicamento útil en el tratamiento del cáncer en un sujeto diagnosticado de dicha enfermedad.

54. Uso según la reivindicación 53, donde el sujeto es un ser humano.

40 55. Uso de un compuesto con cualquiera de las fórmulas (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI) o (XVIII), o una sal, solvato o prodroga farmacéuticamente aceptable del mismo, en la manufactura de un medicamento útil en el tratamiento del cáncer en un sujeto diagnosticado de dicha enfermedad.

56. Uso según la reivindicación 55, donde el sujeto es un ser humano.

45 57. Uso de la preparación farmacéutica de la reivindicación 40 para preparar un medicamento destinado a tratar el cáncer en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

58. Uso según la reivindicación 57, donde el sujeto es un ser humano.

50 59. Uso de la preparación farmacéutica de la reivindicación 52 para preparar un medicamento destinado a tratar el cáncer en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

60. Uso según la reivindicación 59, donde el sujeto es un ser humano.

55 61. Uso de la preparación farmacéutica de la reivindicación 40 para preparar un medicamento destinado a tratar una enfermedad neurológica en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

62. Uso según de la reivindicación 61, donde el sujeto es un ser humano.

60 63. Uso de la preparación farmacéutica de la reivindicación 52 para preparar un medicamento destinado a tratar una enfermedad neurológica en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

64. Uso según de la reivindicación 63, donde el sujeto es un ser humano.

65 65. Uso de la preparación farmacéutica de la reivindicación 40 para preparar un medicamento destinado a tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

66. Uso según de la reivindicación 65, donde el sujeto es un ser humano.

ES 2 326 459 B1

67. Uso de la preparación farmacéutica de la reivindicación 52 para preparar un medicamento destinado a tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad.

68. Uso según de la reivindicación 67, donde el sujeto es un ser humano.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

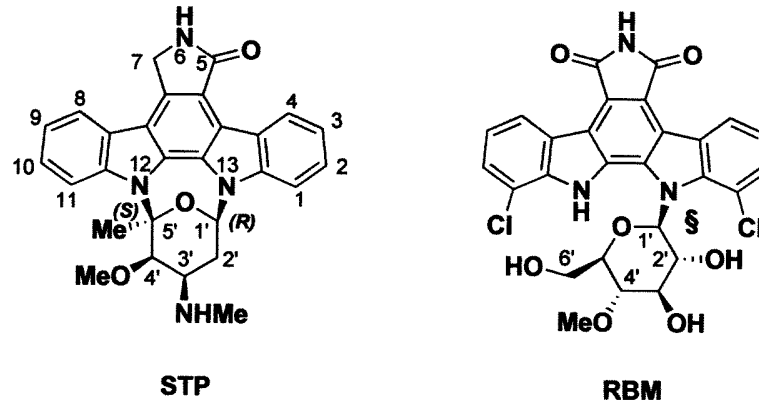


FIG. 2

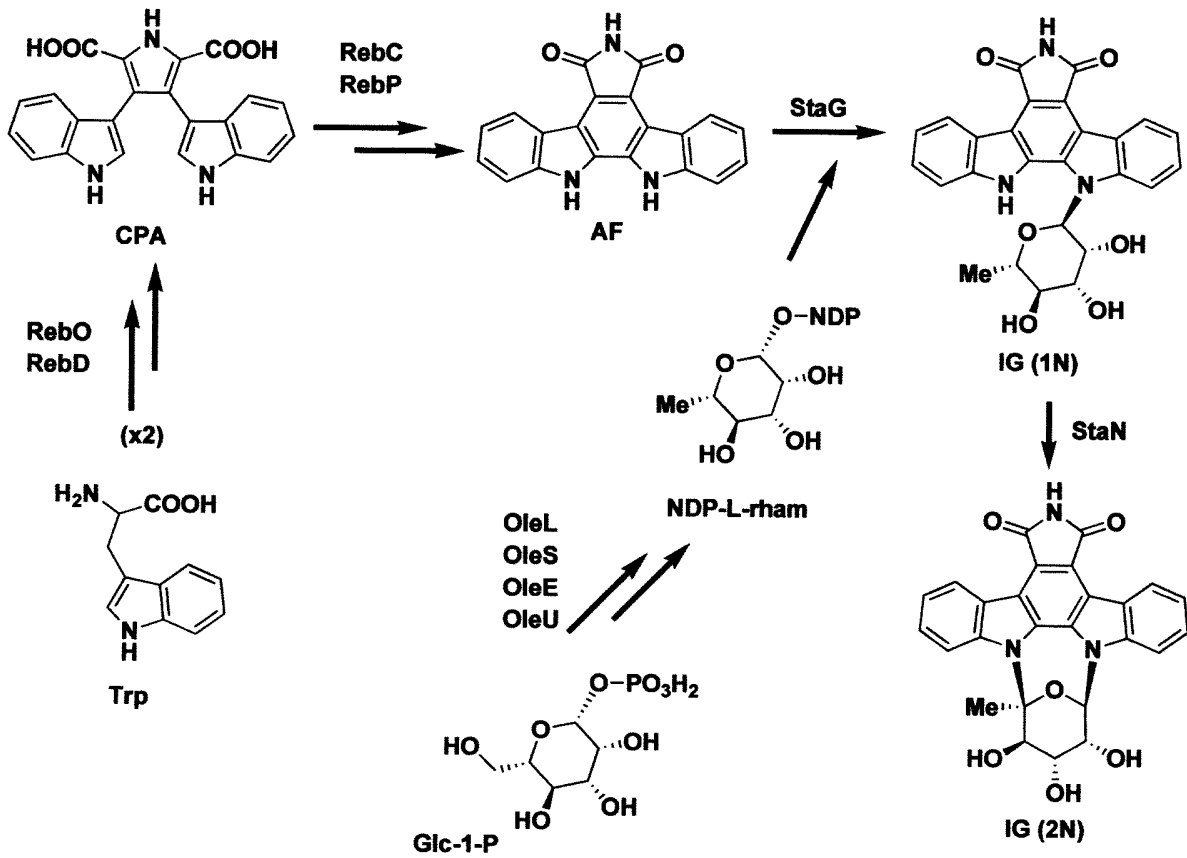


FIG. 3

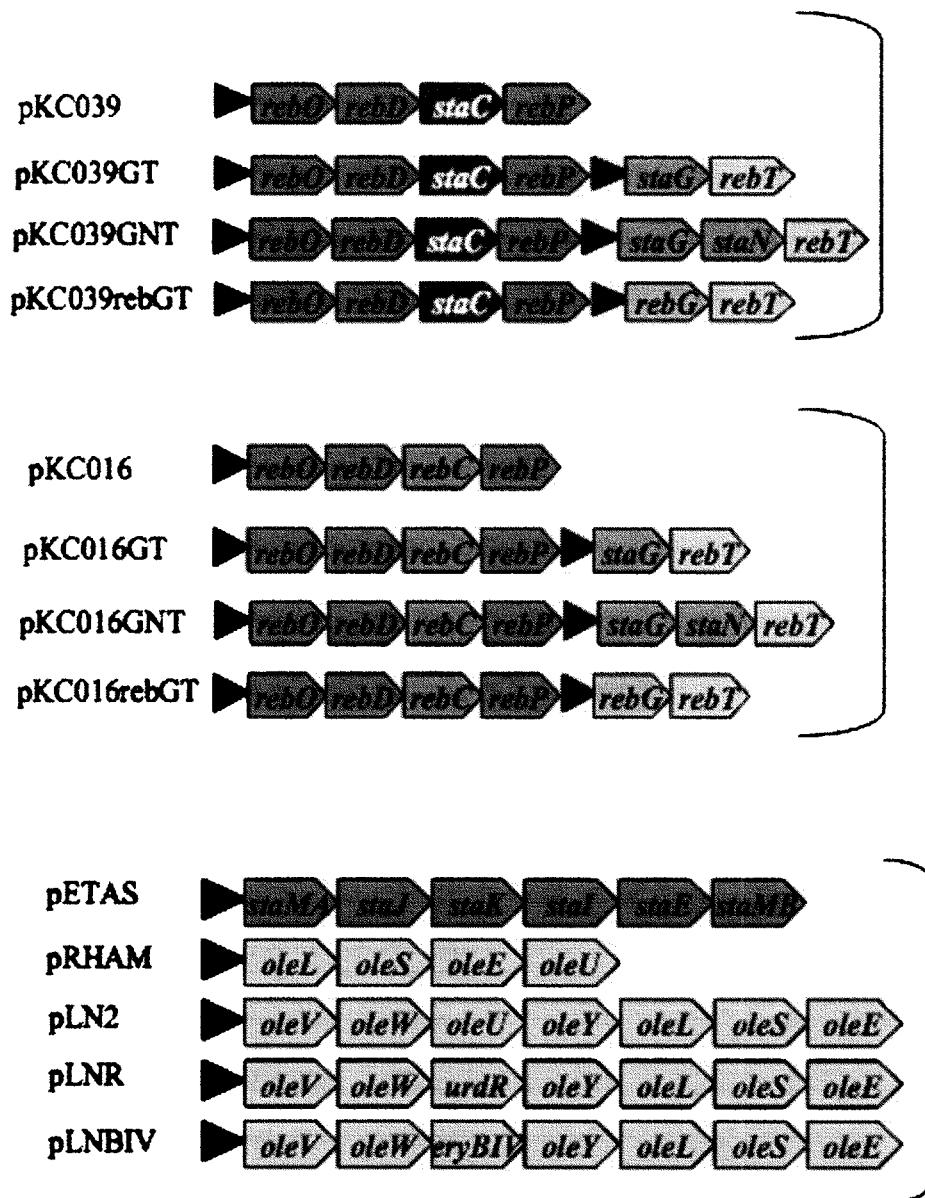


FIG. 4A

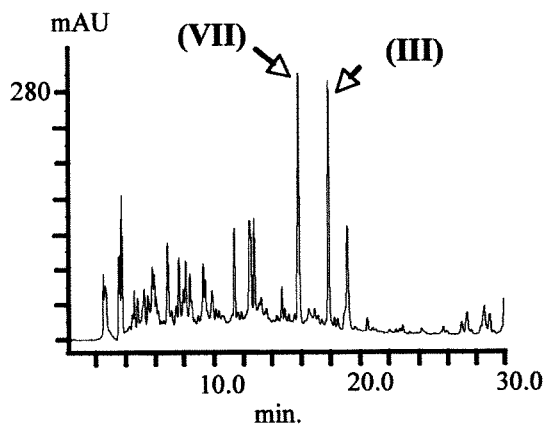


FIG. 4B

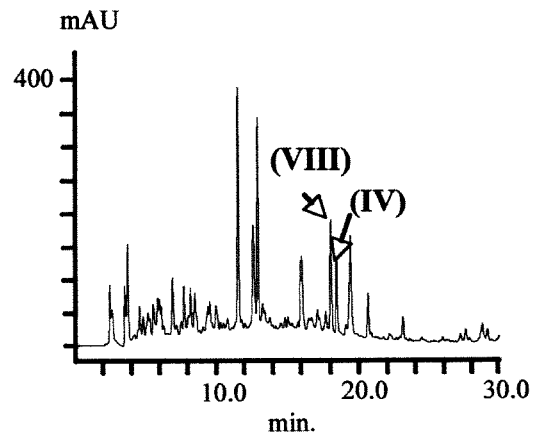


FIG. 4C

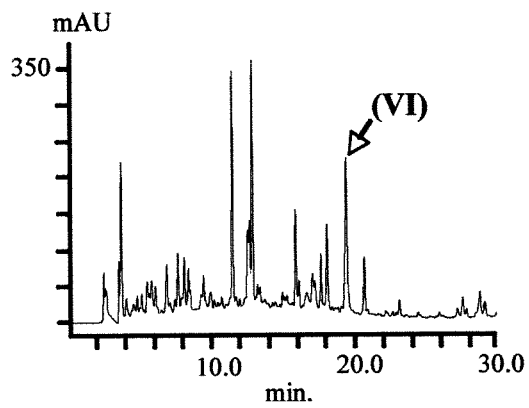


FIG. 4D

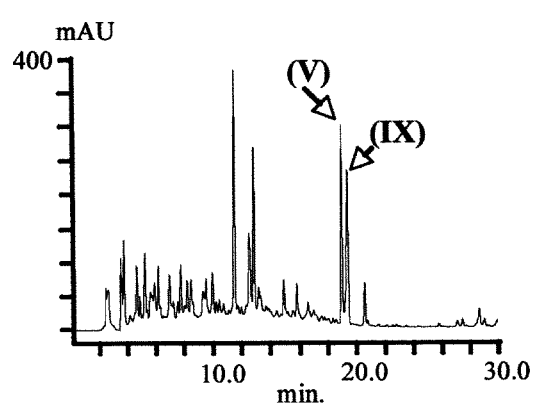
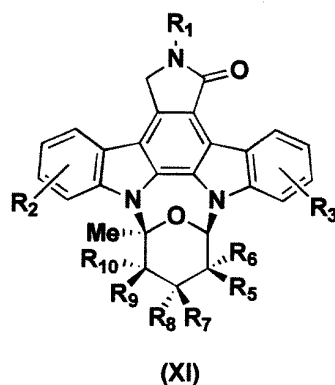
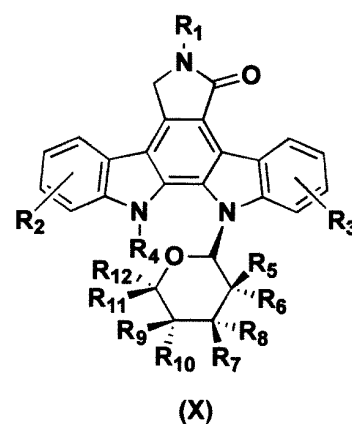
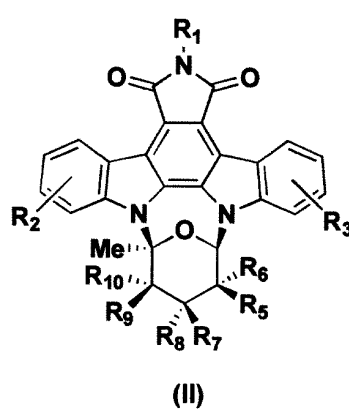
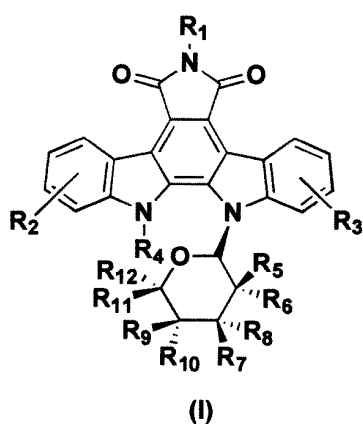


FIG. 5



Cpd	General Formula	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	-	-



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 326 459

② Nº de solicitud: 200801077

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.04.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 03033706 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 24.04.2003, reivindicaciones 21-30; figura 1.	1,23-42, 50-60
A	EP 769555 A1 (BANYU PHARMACEUTICAL) 23.04.1997, reivindicaciones 12-14; ejemplos 3-5.	1,23-39
A	C SÁNCHEZ et al, CHEMISTRY & BIOLOGY 2002, vol. 9, páginas 519-531. "The biosynthetic gene cluster for the antitumor Rebeccamycin: Characterization and generation of indolocarbazole derivatives", todo el documento.	1-68
A	WO 9109034 A1 (SCHERING CORP) 27.06.1991, reivindicaciones 1-8; resumen.	42,53-60, 65-68
A	WO 0230941 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO) 18.04.2002, reivindicaciones.	1-8,40-42
A	EP 1101770 A1 (ADIR) 23.05.2001, reivindicaciones.	1-8,40-42

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

08.06.2009

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H 19/23 (2006.01)

C12P 19/28 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)