

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 363 074**

21 Número de solicitud: 200931186

51 Int. Cl.:

C07D 317/70 (2006.01)

A61K 31/36 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **17.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
20.07.2011

71 Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III
c/ Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Universitat de Valencia (Estudi General) y
CIBER de Enfermedades Respiratorias**

72 Inventor/es: **García Esteban, María Teresa;
González de la Campa, Adela y
Blázquez Ferrer, María Amparo**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

54 Título: **Uso de seconeolitsina y N-metil-seconeolitsina para la fabricación de medicamentos.**

57 Resumen:

Uso de seconeolitsina y N-metil-seconeolitsina para la fabricación de medicamentos.

Uso de los alcaloides fenantrénicos seconeolitsina y N-metil-seconeolitsina para la fabricación de medicamentos. Más concretamente, se describe el uso de los citados compuestos para fabricar antibióticos, especialmente para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias Gram-positivas, preferiblemente *Streptococcus pneumoniae* o *Staphylococcus aureus*. Tiene especial relevancia su aplicación para elaborar medicamentos para el tratamiento de la neumonía.

ES 2 363 074 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de seconeolitsina y N-metil-seconeolitsina para la fabricación de medicamentos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de seconeolitsina y N-metil-seconeolitsina para la fabricación de medicamentos. Más concretamente, la invención se refiere al uso de los citados compuestos para fabricar medicamentos para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias, fundamentalmente por Gram-positivas, preferiblemente para el tratamiento de la neumonía. Estos compuestos podrían también ser utilizados para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias Gram-negativas.

Antecedentes de la invención

15 La resistencia a antimicrobianos es un serio problema clínico y de salud pública en todo el mundo desde hace años, tanto en el ámbito nosocomial como en el comunitario. La solución de este problema en el futuro es uno de los grandes retos que debe afrontar la medicina moderna. En este sentido, una de las estrategias más importantes es la búsqueda de nuevos antibióticos como alternativa terapéutica a los conocidos hasta la fecha.

20 A pesar de la existencia de vacunas y del desarrollo de antibiototerapia, *Streptococcus pneumoniae* continua siendo una importante causa de mortalidad y morbilidad, el agente etiológico más común de neumonía adquirida en la comunidad y causa frecuente de reagudizaciones de bronquitis crónicas, meningitis, otitis medias y sinusitis. *S. pneumoniae* es un diplococo Gram-positivo, de cadenas cortas, comúnmente llamado neumococo; del cual se conocen hasta la fecha 91 serotipos basados en el polisacárido capsular. Esta bacteria se ha constituido en la principal causa de neumonía extra-hospitalaria a nivel mundial, la segunda de meningitis, y de más del 50% de las otitis medias y sinusitis a cualquier edad. Se estima que provoca entre 1 y 2 millones de muertes en menores de 5 años en países en desarrollo. Junto con la tuberculosis, constituye una de las principales causas de muerte por infección.

30 Provoca alta morbi-mortalidad en adultos mayores por su deficiencia inmunitaria; con mayor incidencia en enfermos pulmonares, cardíacos, diabéticos y alcohólicos. La mortalidad asciende al 20-30% en pacientes de alto riesgo y mayores de 65 años. Las enfermedades que provoca son focales (otitis, sinusitis) o invasivas (denominadas técnicamente neumonía, meningitis, sepsis, artritis, osteomielitis, endocarditis, peritonitis, pericarditis, celulitis y abscesos cerebrales). En los países donde se ha comenzado a vacunar contra *Haemophilus influenzae* b en forma rutinaria, el neumococo se está transformando en la primera causa de meningitis.

35 La neumonía, es una enfermedad infecciosa que consiste en la infección de los espacios alveolares de los pulmones y que provoca su inflamación. Puede ser una enfermedad grave si no se detecta a tiempo, llegando a ser mortal, especialmente entre personas de edad avanzada y entre pacientes inmunodeprimidos. Aunque multitud de microorganismos pueden causar neumonía, en la práctica sólo unos pocos son los responsables de la mayoría de los casos. Una de las causas más común de neumonías es la infección por *S. pneumoniae*.

45 Las neumonías de origen bacteriano pueden tratarse con antibióticos, dependiendo la elección de tratamiento antibiótico de la naturaleza de la neumonía, los microorganismos más comunes que causan neumonía en el área geográfica local, y el estado inmune subyacente y la salud del individuo. El tratamiento de la neumonía debe estar basado en el microorganismo causal y su sensibilidad a los antibióticos conocidos. Sin embargo, la causa específica para la neumonía se identifica en sólo el 50% de los casos, incluso después de una amplia evaluación. En el Reino Unido, amoxicilina y claritromicina o eritromicina son los antibióticos seleccionados para la mayoría de los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad. En América del Norte, donde las formas "atípicas" de neumonía adquiridas en la comunidad son cada vez más comunes, la azitromicina, claritromicina, y las fluoroquinolonas han desplazado a la amoxicilina como tratamiento de primera línea. La resistencia de *S. pneumoniae* a antibióticos β -lactámicos y macrólidos se ha extendido en todo el mundo en las dos últimas décadas. Actualmente, fluoroquinolonas como levofloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino son los antibióticos recomendados para el tratamiento de estas infecciones. A pesar de que la resistencia a fluoroquinolonas en *S. pneumoniae* es actualmente baja, inferior al 3%, es más que probable que el incremento de resistencias a estos antibióticos sea sólo cuestión de tiempo.

55 *Staphylococcus aureus* es un coco Gram-positivo que normalmente vive en la piel o en las fosas nasales de portadores sanos (2 a 3% de la población mundial).

60 La mayoría de las infecciones por *S. aureus* se presentan en personas inmunodeprimidas, generalmente pacientes hospitalizados de larga duración. Estos estafilococos causantes de infecciones intrahospitalarias pueden penetrar en la piel a través de una herida o a través de un catéter o un tubo de respiración. Por tanto, la infección puede ser menor y local (abceso cutáneo) o puede ser más grave y extendida (septicemia, endocarditis, síndrome tóxico). Los HA-SA (*S. aureus* intrahospitalarios) son la principal causa de neumonía nosocomial e infecciones en heridas quirúrgicas y la segunda causa de bacteriemias nosocomiales. Durante los últimos años, se han incrementado las infecciones de *S. aureus* en personas no consideradas de alto riesgo. Estas infecciones extrahospitalarias (o adquiridas en comunidad), se dan en personas sanas que no tienen antecedentes de hospitalización en el último año. Muchas de estas infecciones han ocurrido entre atletas que comparten equipos o elementos personales (como toallas o máquinas de afeitar) y niños en guarderías.

El tratamiento de las infecciones estafilocócicas ha evolucionado desde el inicio de la era antibiótica como consecuencia de la emergencia de la resistencia y el desarrollo de nuevos antibacterianos. La penicilina empezó a utilizarse ampliamente a partir de 1944, y tan solo 2 años después, la resistencia en *S. aureus* mediada por la producción de beta-lactamasas alcanzaba 6% de los aislamientos; en 1948 este valor superaba 50%. Durante los años 50 se diseminaron las cepas resistentes a la penicilina, así como a otros antibióticos cuyo uso se había ido introduciendo, como eritromicina, cloranfenicol, estreptomina y tetraciclina. El problema se solucionó temporalmente a comienzos de la década del 60 con el desarrollo de las primeras cefalosporinas (cefalotina y cefaloridina), estables frente a la betalactamasa estafilocócica, reemplazadas luego por las 6-ácil-penicilinas (metecilina y oxacilina). Desafortunadamente, en 1961, el mismo año en que la metecilina alcanzó el mercado, se aisló la primera cepa de *S. aureus* resistente (MRSA, por *methicillin-resistant S. aureus*), productora de una proteína de unión a penicilina adicional, PBP-2A, con muy baja afinidad por los beta-lactámicos. Después de una diseminación inicial durante los años 60, MRSA declinó casi hasta cero en los años 70, para reaparecer a mediados de la década de los 80. Desde entonces es un problema creciente en los hospitales, donde alcanza hasta 50% de los aislamientos, y ha empezado a extenderse a la comunidad. Los glicopéptidos han sido el pilar del tratamiento de las infecciones por MRSA desde la introducción de estos antibióticos en 1958; sin embargo, el aislamiento de enterococos resistentes (VRE) y de estafilococos coagulasa-negativos con susceptibilidad disminuida a finales de la década de 1980, hizo temer la aparición de resistencia en *S. aureus*. Casi una década después, en 1997, se describió en Japón la primera cepa con resistencia intermedia a vancomicina y el primer aislamiento resistente se registró en Estados Unidos a mediados de 2002.

Por todo ello, la búsqueda de nuevos antimicrobianos, a ser posible frente a dianas diferentes, se hace imprescindible para prevenir el problema de la multiresistencia de las especies de microorganismos anteriormente citadas.

Las DNA topoisomerasas son enzimas requeridas para la regulación del nivel de superenrollamiento del DNA y facilitan el acceso de las maquinarias enzimáticas al DNA durante los procesos de replicación, transcripción, recombinación o reparación. Las topoisomerasas de tipo I actúan sobre DNA de cadena sencilla y las de tipo II, sobre DNA de doble cadena. Las DNA topoisomerasas de tipo II bacterianas (DNA girasa y DNA topoisomerasa IV) son las dianas intracelulares de las fluoroquinolonas. Ambas son enzimas esenciales que controlan la topología del DNA. Además de estas dos enzimas, una tercera, la DNA topoisomerasa I (Topo I), actúa en el control del superenrollamiento, tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas. La Topo I, actúa relajando el DNA al eliminar vueltas de superenrollamiento negativo mediante la rotura transitoria de una de las cadenas de DNA. Compuestos capaces de inhibir esta enzima esencial podrían ser nuevos antibióticos de importancia vital en la antibioticoterapia del futuro dado que al dirigirse a una diana diferente evitarían el problema creciente de la resistencia cruzada.

Algunos autores ya han descrito el efecto inhibitorio de algunos alcaloides sobre la DNA-topoisomerasa I de *E. coli* y *Yersinia pestis* (bacterias Gram-negativas). El artículo "Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds" de Yuk-Ching T. *et al.*¹, describe la topoisomerasa bacteriana I como diana potencial para el descubrimiento de nuevos compuestos antibacterianos y demuestra que la acumulación del complejo de escisión de DNA formado por la topoisomerasa I tiene propiedades bactericidas.

Por otra parte, el artículo "Compounds with antibacterial activity that enhance DNA cleavage by bacterial DNA topoisomerase I" de Cheng B. *et al.*², describe un ensayo para seleccionar pequeñas moléculas que inducen la respuesta de estrés en *E. coli* recombinante, que sobreexpresa la topoisomerasa I de *Yersinia pestis*. Los compuestos seleccionados se ensayaron a continuación para inhibición del crecimiento y actividad topoisomerasa I.

Sin embargo, a diferencia de la presente invención, los compuestos aislados no presentaban actividad antibacteriana potente, según se menciona en el propio artículo, (véase ref. 2, pág. 644, último párrafo).

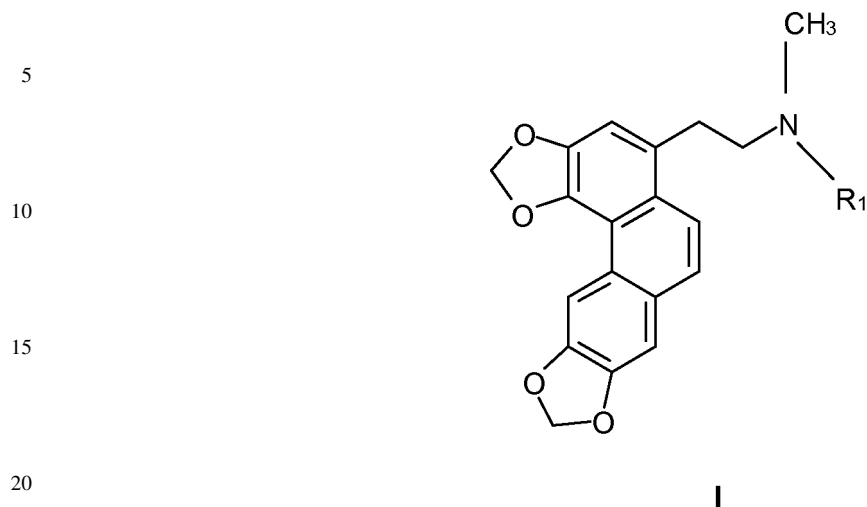
Por tanto, existe la necesidad de identificar nuevos antibióticos cuya diana sea la topoisomerasa I, que presenten una actividad antibacteriana potente, a fin de evitar el problema de la resistencia cruzada existente con los antibióticos empleados habitualmente.

Breve descripción de la invención

La presente invención describe el uso de dos alcaloides de estructura fenantrénica obtenidos a partir de boldina, seconeolitsina y N-metil-seconeolitsina, cuyo procedimiento de síntesis y aislamiento se describe en detalle en el Ejemplo 1 de la invención, para la fabricación de medicamentos, concretamente de antibióticos.

La utilización de determinados compuestos como antibióticos requiere, no sólo su efectividad contra una determinada diana, en este caso la Topo I, sino también una actividad antibacteriana potente, reflejada en su CMI (concentración mínima inhibitoria), que debe ser lo más reducida posible. Los compuestos de la presente invención presentaban intervalos de CMI de 8-16 μM , frente a los utilizados por Cheng *et al.*, que presentan valores de 40 a 100 μM . (véase ref. 2 pág. 644, tabla 1).

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención, se refiere al uso de compuestos de fórmula I:



25 donde $R_1 = H$ ó CH_3 (seconeolitsina o N-metil-seconeolitsina) para la fabricación de medicamentos. Más concretamente, la invención se refiere al uso de los citados compuestos para fabricar medicamentos para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias Gram-positivas. Entre las enfermedades producidas por bacterias Gram-positivas, se encuentran preferentemente las originadas por las especies *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*.

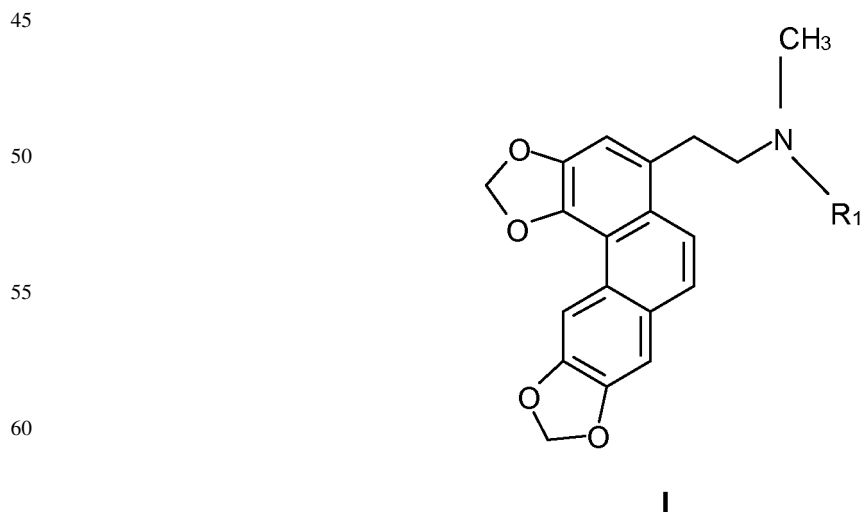
30 Los compuestos descritos podrían ser así mismo potencialmente útiles para fabricar medicamentos para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias Gram-negativas.

A continuación se describen las realizaciones de la presente invención, solamente a modo de ejemplos y sin pretender limitar en modo alguno el alcance de la misma.

35 Descripción detallada de la invención

En la búsqueda de nuevas sustancias activas es interesante destacar la existencia de alcaloides fenantrénicos, pequeño grupo de bases secundarias y terciarias ópticamente inactivas, que derivan biogenéticamente de aporfina. Entre ellos se encuentran seconeolitsina y N-metil-seconeolitsina, sintetizados a partir del alcaloide aporfínico boldina.

40 Sorprendentemente, se ha demostrado la actividad de dichos compuestos a nivel de la DNA topoisomerasa I, ligada a una potente actividad antibacteriana de los mismos, reflejada en su reducida CMI, consecuentemente, una realización adicional de la presente invención se refiere al uso de compuestos de fórmula I:



65 donde $R_1 = H$ ó CH_3 ,
para la fabricación de un medicamento.

ES 2 363 074 A1

Una realización preferida de la invención es aquella en la que $R_1 = H$ y el compuesto es seconeolitsina. Otra realización alternativa es el caso en el que $R_1 = CH_3$ y el compuesto es N-metil-seconeolitsina.

5 Se han demostrado las buenas propiedades antibacterianas para ambos compuestos, por lo que se prefiere especialmente aquel uso en el que el medicamento fabricado es un antibiótico.

10 La efectividad de ambos compuestos se ha comprobado frente a bacterias Gram-positivas, por lo que se consideran realizaciones preferidas los usos de seconeolitsina o N-metil-seconeolitsina, respectivamente, para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias Gram-positivas.

15 Entre las bacterias Gram-positivas que causan infecciones más graves y extendidas se encuentra *Streptococcus pneumoniae*, sin embargo, uno de los elementos determinantes de las patologías originadas por dicho microorganismo es la creciente resistencia del germen: la resistencia a la penicilina se hizo evidente en 1967, cuando se aisló por primera vez un neumococo de estas características (Nueva Guinea); y ya en 1977 se produjo un brote en Sudáfrica, con cepas resistentes a múltiples fármacos. Hoy, los fracasos terapéuticos avalan esta alarmante situación y su demostración se hace evidente en el laboratorio: hay neumococos resistentes a algunos antibióticos β -lactámicos, excepto cefalosporinas de 3ª generación, aunque se han detectado cepas resistentes a cefotaxima y ceftriaxona.

20 De acuerdo con los hechos descritos, revisten especial interés las realizaciones de la invención referidas al uso de seconeolitsina o N-metil-seconeolitsina para fabricar medicamentos para el tratamiento de neumonía, bronquitis crónica, meningitis, otitis medias o sinusitis, respectivamente.

25 Así mismo, se consideran realizaciones preferidas de la invención los métodos de tratamiento de enfermedades bacterianas, que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de, al menos un compuesto de fórmula I, o una combinación de los mismos. Dicho compuesto o compuestos podrían ser preparados junto con cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable, formando composiciones para su administración bajo cualquier forma farmacéutica habitual apropiada (p.ej.: jarabe, comprimidos, ampollas, etc.)

30 En cuanto a las vías de administración, al igual que otros antibióticos que contienen N en su estructura (tetraciclinas, ciprofloxacino, moxifloxacino³, los compuestos serán hidrosolubles al estado de sal ("clorhidrato"), y por tanto solubles en fluidos corporales, pudiéndose administrar por vía oral o parenteral, siendo preferible la vía oral para su administración a nivel ambulatorio (p.ej., sinusitis, otitis media) y la parenteral a nivel hospitalario (p.ej., neumonía, meningitis).

35 Otro caso de especial relevancia, debido a lo habitual de las infecciones producidas es aquél en el que la bacteria Gram-positiva es *Staphylococcus aureus*. Su alto grado de tolerancia frente a los antibióticos conocidos, especialmente en el caso de las cepas resistentes a meticilina, lo hace un candidato ideal para el tratamiento con antibióticos dirigidos a dianas diferentes.

40 Se prefieren por tanto las realizaciones relativas al uso de seconeolitsina o N-metil-seconeolitsina para la elaboración de medicamentos para el tratamiento de infecciones nosocomiales, infecciones por herida quirúrgica, osteomielitis, artritis séptica, infección cutánea, endocarditis o meningitis, producidas por *S. aureus*.

45 También reviste especial importancia el uso de los compuestos descritos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias Gram-negativas. Una de las características únicas de las bacterias Gram-negativas es la estructura de la membrana externa. La parte exterior de la membrana comprende un complejo de lipopolisacáridos cuya parte lipídica actúa como una endotoxina y es responsable de la capacidad patógena del microorganismo. Esta membrana externa protege así mismo a las bacterias de varios antibióticos, colorantes y detergentes que normalmente dañarían la membrana interna o la pared celular de peptidoglicano, constituyendo una barrera frente a la penetración de los antibióticos. Por ello, si los antibióticos se dirigiesen a bacterias Gram-negativas, podría ser necesario, en caso de impermeabilidad debida a la membrana externa, la utilización de medios adicionales que facilitasen su penetración en la célula, como por ejemplo, nanopartículas. Por tanto, los compuestos de la invención podrían utilizarse adicionalmente para elaborar medicamentos para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias Gram-negativas, incorporándose a una nanopartícula en caso necesario.

Descripción de las figuras

60 Figura 1. Purificación de TopA de *S. pneumoniae*

Se cultivaron en caldo líquido recombinantes de *E. coli* M15 conteniendo el plásmido pQE-SPNtopA bajo el control de un promotor inducible por isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG). La inducción de los recombinantes con IPTG dio lugar a la superproducción de TopA unida a colas de histidina (6His-TopA). Se cargaron muestras de 10 μ l en geles de SDS-Acrilamida y las proteínas se tiñeron con azul de Comassie. Marcador de peso molecular (PM); extracto crudo tras 0 min (EC) y 30 min (EC30) de inducción; lisado del EC30 (L); lisado tras pasar por columna (E0); eluidos con imidazol 10-100 mM (E10 - E100). Como se puede observar en la figura, tras elución con imidazol 100 mM se obtiene una fracción de 84,6 kDa correspondiente a la proteína TopA purificada.

Figura 2. Relajación de DNA superenrollado negativamente, covalentemente cerrado (CCC)

Para ensayar la relajación del plásmido pBR322 en forma CCC, se incubaron 500 ng del plásmido pBR322 CCC (1.77 nM) en presencia de diferentes cantidades de 6His-TopA durante 1 hora a 37°C en tampón de reacción (Tris HCl 20 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, 50 µg de BSA/ml). La reacción se paró con EDTA 50 mM, SDS al 1% y 100 µg/ml de proteinasa K, se precipitó el DNA y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (al 1,2%), tiñendo con bromuro de etidio (A) después de hacerlo correr o incluyéndolo en el gel (B). PM, patrón de peso molecular; OC, círculo abierto; RC, círculo relajado covalentemente cerrado. La actividad enzimática convirtió la forma CCC del plásmido en topoisómeros con diferentes niveles de superenrollamiento que se observaron como bandas con movilidad intermedia entre la forma CCC y la forma OC (círculos abiertos) ó RC (círculos relajados) cuando el gel se corrió en ausencia de bromuro de etidio (panel A). Las formas RC migraron como una banda sencilla cuando el gel se corrió en presencia de concentraciones saturantes de bromuro de etidio (panel B). Se definió una unidad de actividad TopA como la cantidad de enzima capaz de relajar 50% de la forma CCC de pBR322 en 1 h a 37°C, que correspondió a 42 ng (5 nM) de la enzima purificada.

Figura 3. Inhibición de la actividad de relajación de TopA por seconeolitsina (A) y N-metil-seconeolitsina (B)

Se utilizaron 500 ng de pBR322 superenrollado y 1 unidad de enzima en ausencia o presencia de seconeolitsina 0-100 µM, o N-metil-seconeolitsina 0,50 µM. PM, patrón de peso molecular. Como se puede observar, con valores inferiores a 50 µM se reduce la actividad enzimática al 50% (la banda correspondiente a topA se va haciendo progresivamente más tenue al aumentar la concentración de antibiótico).

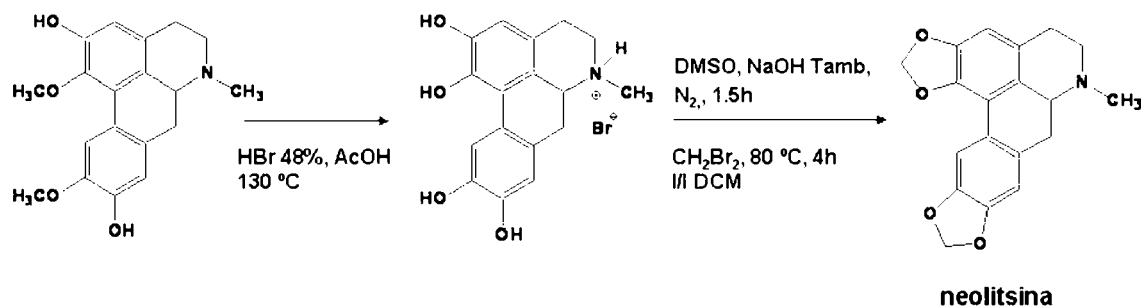
Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis y aislamiento de los alcaloides

De un total de 22 alcaloides sintetizados a partir del alcaloide natural boldina, se han ensayado 19 alcaloides, 8 aporfínicos y 11 fenantrénicos con el fin de analizar la actividad enzimática de la DNA topoisomerasa I de *S. pneumoniae* en presencia de los mismos. La síntesis, aislamiento y determinación estructural de los dos alcaloides más activos se detalla a continuación.

Para la semisíntesis de ambos alcaloides fenantrénicos se seleccionó como producto de partida el compuesto comercial boldina (Sigma). En primer lugar se procede a la semisíntesis del alcaloide bromuro de 1,2,9,10-tetrahidroxi-N-metil-aporfina, para ello, se parte de 425 mg, (1,298 mmol), de boldina y se somete a una O-desmetilación por tratamiento con HBr al 48% y ácido acético glaciado en agitación y a reflujo a 130°C. Tras 4 horas en estas condiciones, el bromuro de 1,2,9,10-tetrahidroxi-N-metil-aporfina, se obtiene por precipitación en el crudo de reacción (482.8 mg, 1.269 mmol, Rto 97.8%). A continuación 850 mg de dicho compuesto (2.234 mmol) se disuelven en dimetil-sulfóxido (DMSO) (15 ml) con NaOH en exceso (700 mg), manteniéndose con agitación y en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente durante 1½ horas. Transcurrido este tiempo, se añade dibromometano (0,32 ml, 4,56 mmol), calentándose la mezcla a 80°C durante 4 horas. Seguidamente, se deja enfriar y se realizan extracciones 1/1 (líquido/líquido) con diclorometano (DCM), realizando un lavado con H₂O para eliminar restos de DMSO. Mediante purificación por cromatografía en columna utilizando como fase móvil acetato de etilo, se obtiene el producto neolitsina (279 mg, 0.77 mmol, Rto 34,47%) que cristaliza en DCM en forma de agujas de color amarillo pálido.

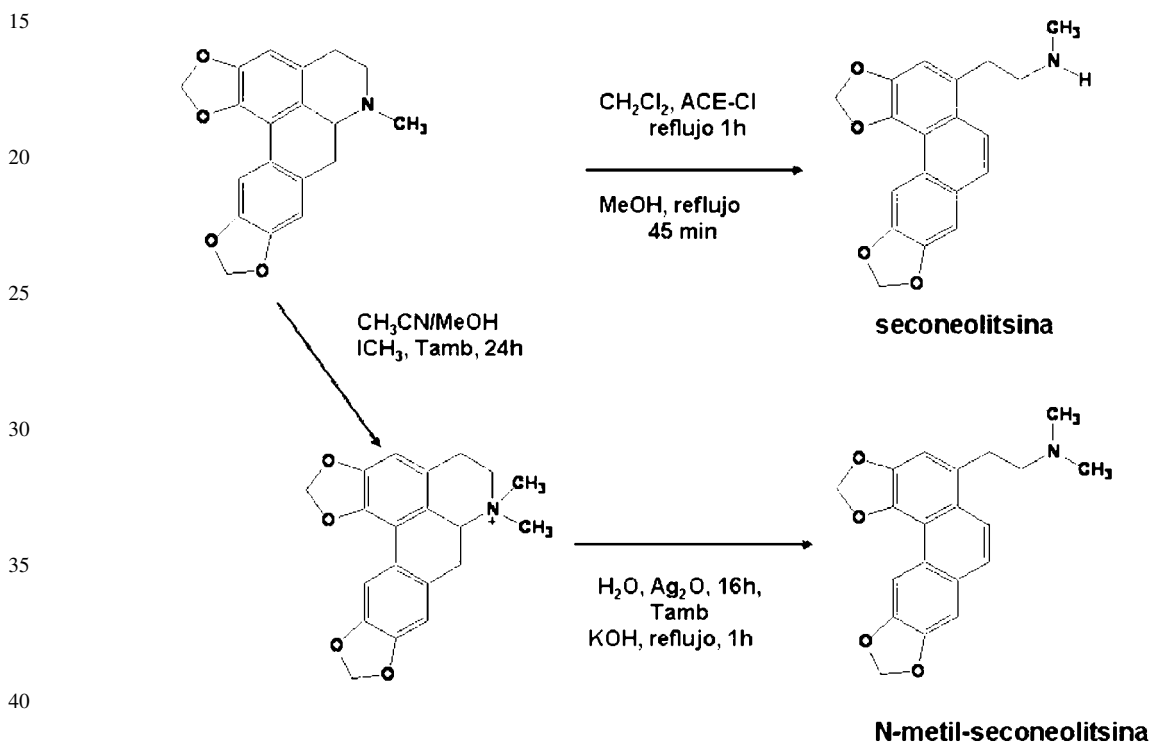


Para la síntesis de seconeolitsina se disuelven 133 mg de neolitsina (0,412 mmol) en dicloroetano y se mantiene 15 min a 0°C. A continuación se añade 1 equivalente de α-cloroetil-cloroformato (ACE-Cl), calentándose a reflujo durante 1 hora. El crudo de reacción se concentra a vacío y se disuelve en MeOH, calentándose nuevamente durante 45 min a reflujo. Transcurrido este tiempo se concentra a sequedad y se determina mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) el compuesto formado. En este caso se observa la formación de la forma protonada de seconeolitsina por lo que se procede a su basificación a pH 10-11 hasta la obtención del compuesto al estado de base.

ES 2 363 074 A1

Se extrae con DCM y se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase móvil DCM/MeOH 9:1 (80 mg, 0,248 mmol, Rto 60%).

Para la obtención de N-metil-seconeolitsina, previamente se sintetiza el alcaloide aporfínico yoduro de N-metil-neolitsina por metilación de neolitsina (100 mg, 0,275 mmol) con CH_3I en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (7,5:5,0) a temperatura ambiente y con agitación durante 16 horas. El yoduro de N-metil-neolitsina se obtiene tras su cristalización con MeOH/DCM (125,55 mg, 0,27 mmol, Rto 98%). La síntesis de N-metil-seconeolitsina se llevó a cabo mediante reacción de eliminación de Hofmann. El yoduro de N-metil-neolitsina (136 mg, 0,29 mmol) se disuelve en agua y se añade Ag_2O en cantidad equimolecular (75 mg, 0,31 mmol). Tras 16 horas en agitación a temperatura ambiente y atmósfera de N_2 se filtra con celita para eliminar el AgI y el exceso de Ag_2O . Se disuelve KOH en H_2O (1,9 g en 3 ml) y se añade al filtrado. Se calienta la mezcla a reflujo durante 1 h hasta que por cromatografía en capa fina se ve que la reacción ha finalizado. Por último se realizan extracciones l/l con DCM y se obtiene el compuesto por cristalización con MeOH/DCM en forma de cristales amorfos grisáceos (32 mg, 0,085 mmol, Rto 29,3%).



1.1 Determinación estructural de los alcaloides

La determinación estructural de seconeolitsina y N-metil-seconeolitsina se ha llevado a cabo fundamentalmente mediante el empleo de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C monodimensional y de doble dimensión (homonuclear COSY y heteronuclear HMQC). La determinación de la masa molecular se ha realizado por espectrometría de masas de ionización química. Así mismo también se han realizado espectros de ultravioleta y la determinación de constantes físicas como el punto de fusión, de gran importancia en la determinación de pureza.

Seconeolitsina: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}\text{O}_4$; pto de fusión 111-113°C; UV (MeOH): λ_{max} (log ϵ) = 262 (0,40), 289 (0,12), 325 (0,07); RMN- ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 2,32 (3H, s, N- CH_3), 2,76 (2H, m, $\text{CH}_{2\alpha}$), 3,14 (2H, m, $\text{CH}_{2\beta}$), 6,16 (2H, s, OCH_2O -6,7), 6,24 (2H, s, OCH_2O -3,4), 7,22 (1H, s, H-2), 7,40 (1H, s, H-8), 7,56 (1H, d, $J=9,3$ Hz, H-9), 7,81 (1H, d, $J=9,3$ Hz, H-10), 8,39 (1H, s, H-5); RMN- ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm): 32,88 ($\text{CH}_{2\beta}$), 35,75 (N CH_3), 52,73 ($\text{CH}_{2\alpha}$), 100,93 (OCH_2O , C-3,4), 101,48 (OCH_2O , C-6,7), 104,37 (C-5), 105,19 (C-8), 110,29 (C-2), 116,28 (C-4a), 121,31 (C-10), 123,44 (C-5a), 124,32 (C-9), 125,01 (C-10a), 128,15 (C-8a), 131,33 (C-1), 140,64 (C-4), 144,03 (C-3), 147,03* (C-7) 147,10* (C-6); EMIE-AR $m/z=323,1165$, EMIE m/z (int. rel.) = 323 (10), 280 (100), 279 (32), 221 (2), 163 (14).

N-metil-seconeolitsina: $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}\text{O}_4$; pto de fusión 132-134°C; UV (MeOH): λ_{max} (log ϵ) = 262 (0,40), 289 (0,12), 325 (0,07); RMN- ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 2,22 (6H, s, N-(CH_3) $_2$), 2,49 (2H, m, $\text{CH}_{2\alpha}$), 3,12 (2H, m, $\text{CH}_{2\beta}$), 6,17 (2H, s, OCH_2O -6,7), 6,25 (2H, s, OCH_2O -3,4), 7,25 (1H, s, H-2), 7,41 (1H, s, H-8), 7,57 (1H, d, $J=9,3$ Hz, H-9), 7,75 (1H, d, $J=9,3$ Hz, H-10), 8,39 (1H, s, H-5); RMN- ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm): 30,79 ($\text{CH}_{2\beta}$), 45,10 (N(CH_3) $_2$), 60,51 ($\text{CH}_{2\alpha}$), 100,94 (OCH_2O , C-3,4), 101,48 (OCH_2O , C-6,7), 104,39 (C-5), 105,19 (C-8), 110,29 (C-2), 116,28 (C-4a), 121,15 (C-10), 123,47 (C-5a), 124,40 (C-9), 124,90 (C-10a), 128,12 (C-8a), 131,50 (C-1), 140,60 (C-4), 144,05 (C-3), 146,80 (C-6) 146,80 (C-7); EMIE-AR $m/z=337,1317$, EMIE m/z (int. rel.) = 337 (100), 279 (63), 221 (5), 191 (5), 163 (58).

ES 2 363 074 A1

Ejemplo 2

Purificación de la topoisomerasa I de *S. pneumoniae*

5 1.1. Clonación del gen *topA*

La secuencia del gen *topA* de *S. pneumoniae* R6 se obtuvo de la secuencia publicada del genoma⁴. El plásmido para clonarlo fue pQE-1 y el sistema de expresión *E. coli* M15 (pREP4)/pQE-1 (QIAGEN). Se amplificó el gen *spr1141* por PCR a partir de DNA cromosómico de *S. pneumoniae* R6 usando como cebadores:

10 TOPAUP2 (5'-GTGGCTACGGCAACAAAAAGAA-3') y

TOPADOWN (5'-cgcgcgcatgcTTATTTAATCTTTTCTTCCTC-3')

15 (1 μ M de cada uno). El extremo 5' de TOPADOWN incluía la diana para la enzima de restricción *PaeI*. El cebador en sentido directo TOPAUP2 incluyó el codón de iniciación GTG, mientras que el inverso TOPADOWN incluyó la secuencia complementaria al codón de parada TAA (subrayado). La amplificación se realizó con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos y un ciclo inicial de amplificación (30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C y 2.5 minutos de extensión con la polimerasa Pfu a 72°C). Posteriormente se realizaron 30 ciclos de amplificación

20 (2 minutos a 94°C, 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C y 2.5 minutos a 72°C) y finalmente 7 minutos más de extensión a 72°C y enfriamiento a 10°C. El producto de PCR fue limpiado (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN), digerido con *PaeI* y clonado en el plásmido pQE-1 (previamente digerido con *PaeI* + *PvuII*) para transformar *E. coli* M15. Se seleccionaron 7 transformantes que llevaban insertos del tamaño adecuado. Se secuenciaron 820 pb con los oligonucleótidos:

25 pQE-seq3 (5'-AGCTAGCTTGGATTCTCACC-3') y

pQE-seq5 (5'-GAGGCCCTTTCGTCTTCA-3')

30 y se confirmó que la fusión de TopA a la cola de 6 His se había realizado en fase. El plásmido resultante, que lleva clonado el gen *topA* de *S. pneumoniae* unido a 6 residuos His en su extremo N-terminal se denominó pQE-SPNtopA.

1.2. Hiperexpresión de 6His-TopA

35 El sistema de expresión permite la superproducción de proteínas unidas a colas de His bajo el control de un promotor del fago T5 regulable por IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido). Se hizo crecer un cultivo de *E. coli* M15 (pREP4)/ pQE- SPNtopA a 37°C en LB (caldo de cultivo líquido) con ampicilina (250 μ g/ml) y kanamicina (25 μ g/ml) hasta DO₆₀₀ = 0,6. Se añadió IPTG (1 mM) y se incubó 30 minutos a 37°C, se recogieron las células por centrifugación, se lisaron durante 30 minutos a 4°C en tampón A (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 10

40 mM) y lisozima (1 mg/ml) y se disgregaron mediante ultrasonidos. Tras centrifugar durante 20 minutos a 10.000 g a 4°C se purificó la Topol-6His mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA según se detalla a continuación:

1.3. Cromatografía de afinidad Ni-NTA

45 El extracto que contenía 6His-TopA se cargó en una columna de Ni-NTA (QIAGEN) 2 ml de resina al 50% en tampón A). La columna se lavó con 10 ml del tampón A y posteriormente se eluyeron las proteínas adheridas a la matriz aplicando consecutivamente 10 ml de tampón A con diferentes concentraciones de imidazol (60, 100, y 200 mM). Se recogieron fracciones de 2 ml que se analizaron por electroforesis en geles de SDS-Acrilamida, observándose tras tinción con azul de Comassie una proteína de tamaño similar a TopA que eluyó a 100 mM de imidazol y que

50 presentaba una pureza del 90%. La fracción que contenía la proteína se dializó frente al tampón B (Tris HCl 20 mM, pH 8, KCl 50 mM, DTT 1 mM, glicerol al 50%). (Véase Figura 1). El rendimiento de la purificación fue de 0,8 mg de proteína por litro de cultivo. La concentración fue de 80 μ g/ml y la actividad específica 2,4 x 10⁴ unidades/mg. La proteína purificada se conservó a -20°C. En estas condiciones la proteína permanece activa por un periodo de al menos

55 7 meses.

Ejemplo 3

Caracterización de la actividad de TopA: relajación de DNA con superenrollamiento negativo

60 Las reacciones de relajación se realizaron en un volumen final de 100 μ l con 0,5 μ g de DNA superenrollado del plásmido pBR322, en tampón Tris HCl 20 mM, pH 8, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM y 50 μ g BSA/ml. Tras 1 hora de incubación a 37°C con la enzima 6His-TopA, la reacción se paró por incubación durante 2 min a 37°C en presencia de EDTA 50 mM y durante 30 minutos a 37°C en presencia de SDS al 1% y 100 μ g/ml de proteinasa K. Las muestras se precipitaron con etanol y se volvieron a suspender en agua. La cuantificación del DNA relajado obtenido

65 como consecuencia de la actividad de TopA se realizó mediante densitometría de los geles utilizando el programa Quantity One (BIORAD). La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de relajar 50% del DNA superenrollado. Dicha unidad correspondió a 42 ng de la enzima. (Véase Figura 2).

Ejemplo 4

Inhibición de la actividad de TopA por alcaloides

5 La inhibición de la actividad enzimática se logró por incubación previa de TopA con el alcaloide durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción tras la adición del sustrato (0.5 µg de pBR322) en las condiciones de reacción establecidas en el apartado anterior. Se determinaron los valores de IC₅₀ (expresados como media de tres experimentos independientes) correspondientes a la concentración de producto necesaria para reducir la actividad enzimática en un 50%. Todos los alcaloides estudiados dieron lugar a valores de IC₅₀ mayores a 50 µM con excepción de la seconeolitsina y la N-metil-seconeolitsina cuyos valores de IC₅₀ fueron de 17 ± 0,5 µM. (Véase Figura 3).

Ejemplo 5

Inhibición del crecimiento bacteriano

15 Para comprobar la actividad antibacteriana de los 19 alcaloides sintetizados frente a *S. pneumoniae*, se llevaron a cabo ensayos de sensibilidad por el método de microdilución en caldo siguiendo el protocolo descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards⁵. Se incluyeron 15 cepas de *S. pneumoniae*: cuatro como cepas control (*S. pneumoniae* ATCC 6303, *S. pneumoniae* R6 y *S. mitis* NCTC 12261¹) dos sensibles a ciprofloxacino y 10 resistentes a ciprofloxacino y otros antibióticos (Tabla 1). Los aislados clínicos de la tabla 1 se han descrito previamente⁶. La CMI (concentración mínima inhibitoria) fue la menor concentración de alcaloide capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria tras 20 horas de crecimiento a 37°C en medio AGCH. Entre los 19 alcaloides analizados, la seconeolitsina y la N-metil-seconeolitsina fueron los que mejor actividad antibacteriana mostraron, con rangos de CMI de 8-16 µM.

TABLA 1

Características de las cepas utilizadas

	Aislado	Origen	Serotipo	Patrón de Resistencia	PFGE
Sensibles	R6		No	S	
	ATCC 6303		3	S	
	NCTC 12261 ¹			S	
	CipS-6.8	Sangre	4	PE	
	CipS-6.9	Lavado broncoalveolar	35C	S	
CipR	CipR-6.20	Esputo	14	PTCECISxTCip	Spain ^{9V} -3
	CipR-6.16	Sangre	14	PSxTCip	Spain ^{9V} -3
	CipR-6.8	Sangre	9V	PSxTCip	Spain ^{9V} -3
	CipR-6.34	Sangre	8	TECICip	Sweden ^{15A} -25
	CipR-6.42	Sangre	14	PTECICip	Sweden ^{15A} -25
	CipR-6.45	Sangre	8	TECICip	Sweden ^{15A} -25
	CipR-6.72	Sangre	15A	PTECICip	Sweden ^{15A} -25
	CipR-6.68	Esputo	11	Cip	1101
	CipR-6.5	Sangre	33	ECICip	3312
	CipR-6.15	Sangre	16	SxTCip	1612

65 PFGE, electroforesis en campo pulsante patrones *Sma*I. S, sensible a todos los antibióticos utilizados; P, resistente a penicilina (MICs de 0,12 a 4 µg/ml); T, resistente a tetraciclina (MICs ≥4 µg/ml); C, resistente a cloramfenicol (MICs ≥8 µg/ml); E, resistente a eritromicina (MICs ≥0,5 µg/ml); Cl, resistente a clindamicina (MIC ≥1 µg/ml); SxT, resistente a cotrimoxazol (MIC ≥4/76 µg/ml); Cip: resistente a ciprofloxacino (MICs ≥4 µg/mL).

ES 2 363 074 A1

TABLA 2

Inhibición del crecimiento bacteriano por 19 alcaloides

5 Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 19 alcaloides frente a 15 cepas de *S. pneumoniae* con distinta sensibilidad a varios antibióticos. Esos 19 productos incluyeron la seconeolitsina (número 17) y la N-metil-seconeolitsina (número 16).

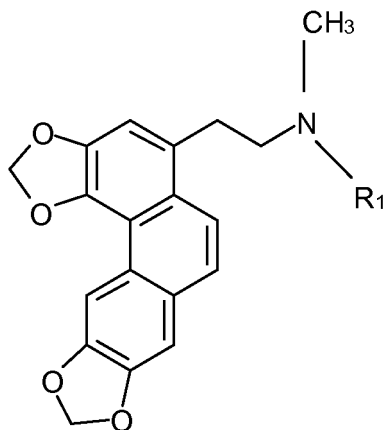
Cepas	CMI (μM)																			
	B	N	S	3	4	6	7	10	11	12	13	14	16	17	19	20	21	22	23	
<i>S. pneumoniae</i>																				
R6	1000	500	500	500	>250	250	250	1000	125	125	500	125	16	16	1000	500	1000	1000	62	
ATCC 6303	1000	500	1000	1000	>250	>250	250	1000	125	125	500	125	16	16	1000	1000	1000	1000	125	
CipS-6.8	1000	500	500	500	>250	>250	125	1000	125	125	500	125	16	16	1000	1000	1000	1000	62	
CipS-6.9	1000	1000	1000	1000	>250	>250	250	1000	125	125	500	125	16	16	1000	1000	1000	1000	125	
CipR-6.20	1000	250	1000	500	>250	>250	250	1000	125	125	500	62	8	16	1000	1000	1000	1000	125	
CipR-6.16	1000	500	1000	1000	>250	>250	500	1000	125	125	500	125	16	16	1000	1000	1000	1000	62	
CipR-6.8	1000	500	500	500	>250	>250	250	1000	62	125	500	62	8	8	1000	1000	1000	1000	125	
CipR-6.42	1000	500	1000	1000	>250	>250	250	1000	125	125	500	62	8	8	1000	1000	1000	1000	125	
CipR-6.45	1000	1000	500	500	>250	>250	250	1000	125	125	500	62	8	16	1000	500	1000	1000	125	
CipR-6.68	1000	500	500	500	>250	>250	250	1000	125	125	500	62	8	8	1000	1000	1000	1000	125	
CipR-6.5	1000	500	500	500	>250	>250	250	1000	125	125	500	62	16	16	1000	1000	1000	1000	62	
CipR-6.15	1000	500	1000	1000	>250	>250	250	1000	125	125	500	62	16	8	1000	1000	1000	1000	62	
<i>S. mitis</i>																				
NCTC 12261 ^T	1000	1000	1000	1000	>250	>250	250	1000	125	125	500	125	16	16	1000	1000	1000	1000	125	

40 Referencias bibliográficas

1. Yuk-Ching T. Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37:731-737.
2. Cheng B., Liu I F, Tse-Dinh Y C. Compounds with antibacterial activity that enhance DNA cleavage by bacterial DNA topoisomerase I. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59:640-5.
3. ES 2.105.970, Laboratorios SALVAT, S.A.
4. Hoskins J, Alborn W E, Arnold J, Blaszcak L C, Burgett S, DeHoff B S, et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* 2001; 183:5709-17.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational supplement. NCCLS document M100-S14. Wayne (PA): The Committee; 2004.
6. De la Campa A G, Ardanuy C, Balsalobre L, Pérez-Trallero E, Marimón J M, Fenoll A, Liñares, J. Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:905-911.

REIVINDICACIONES

1. Uso de compuestos de fórmula I:



I

donde $R_1 = H$ ó CH_3 ,

para la fabricación de un medicamento.

2. Uso, según la reivindicación 1, en el que $R_1 = H$ y el compuesto es seconeolitsina.

3. Uso, según la reivindicación 1, en el que $R_1 = CH_3$ y el compuesto es N-metil-seconeolitsina.

4. Uso, según las reivindicaciones 1-3, en el que el medicamento es un antibiótico.

5. Uso, según la reivindicación 4, en el que el antibiótico es efectivo frente a bacterias Gram-positivas.

6. Uso, según las reivindicaciones 1-5, en el que dichos medicamentos están diseñados para ser administrados por vía oral.

7. Uso, según las reivindicaciones 1-5, en el que dichos medicamentos están diseñados para ser administrados por vía parenteral.

8. Uso, según las reivindicaciones 5-7, en el que la bacteria Gram-positiva es *Streptococcus pneumoniae* y las enfermedades producidas son: neumonía, bronquitis crónica, meningitis, otitis medias o sinusitis.

9. Uso según la reivindicación 8, para el tratamiento de la neumonía.

10. Uso según la reivindicación 8, para el tratamiento de la bronquitis crónica.

11. Uso según la reivindicación 8, para el tratamiento de la meningitis.

12. Uso, según la reivindicación 8, para el tratamiento de la otitis media.

13. Uso, según la reivindicación 8, para el tratamiento de la sinusitis.

14. Uso, según las reivindicaciones 5-7, en el que la bacteria Gram-positiva es *Staphylococcus aureus* y las enfermedades producidas son: infecciones nosocomiales, infecciones por herida quirúrgica, osteomielitis, artritis séptica, infección cutánea, endocarditis o meningitis.

15. Uso, según la reivindicación 14, para el tratamiento de las infecciones nosocomiales.

16. Uso, según la reivindicación 14, para el tratamiento de las infecciones por herida quirúrgica.

17. Uso, según la reivindicación 14, para el tratamiento de la osteomielitis.

ES 2 363 074 A1

18. Uso, según la reivindicación 14, para el tratamiento de la artritis séptica.

19. Uso, según la reivindicación 14, para el tratamiento de la infección cutánea.

5 20. Uso, según la reivindicación 14, para el tratamiento de la endocarditis.

21. Uso, según la reivindicación 14, para el tratamiento de la meningitis.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

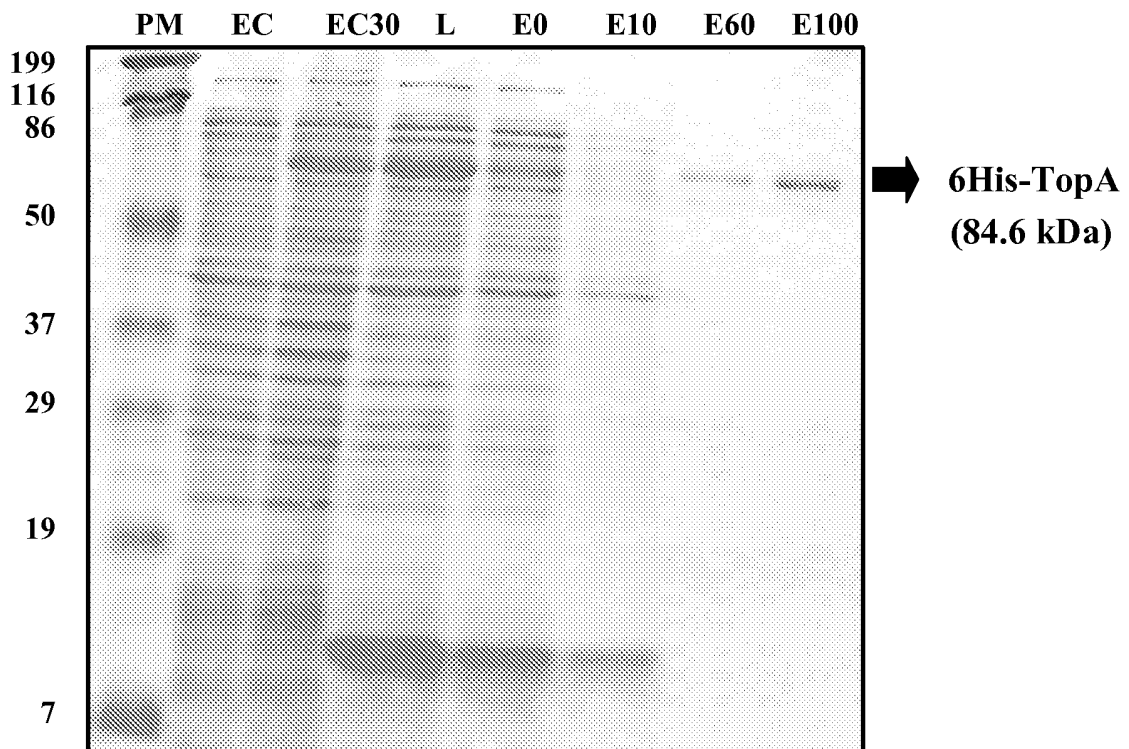
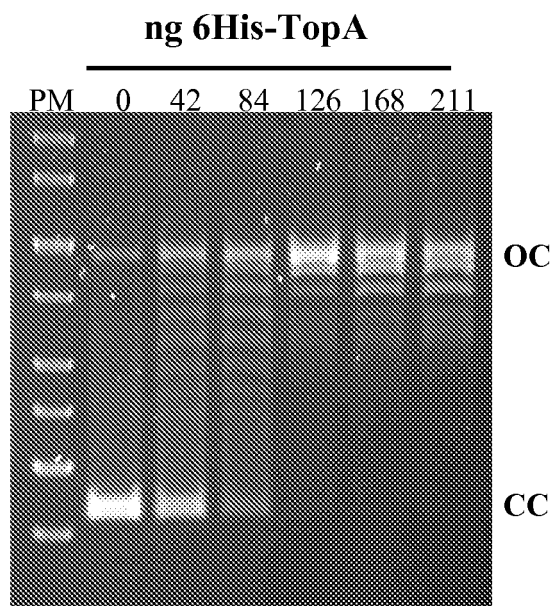


FIG. 1

A



B

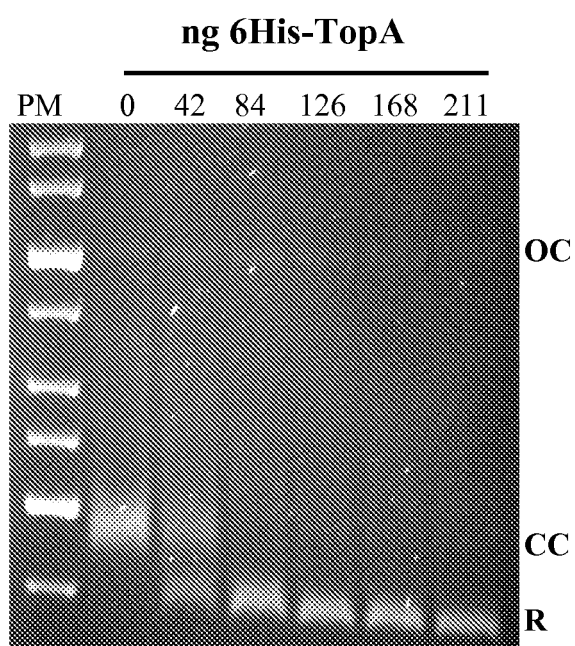


FIG. 2

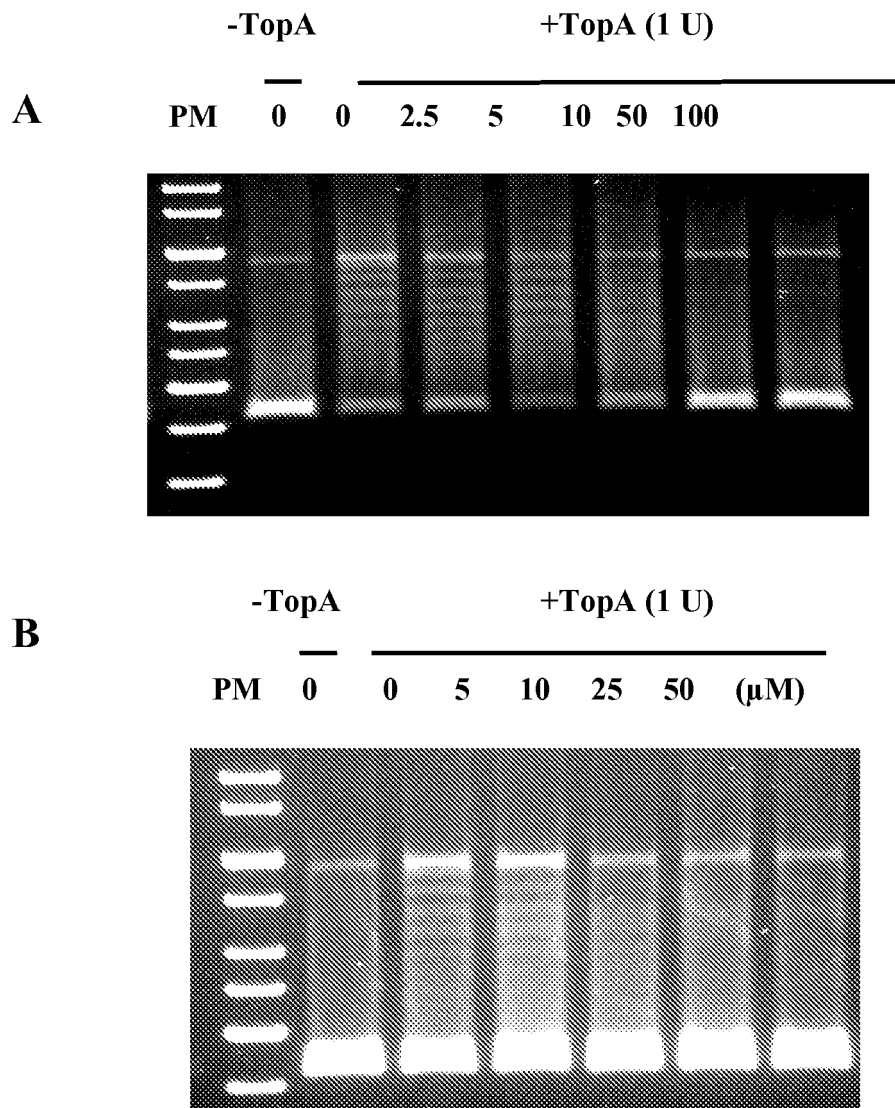


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200931186

②² Fecha de presentación de la solicitud: 17.12.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LIU, Y.-F. et al. "Screening for Anti-microbial and Anti-tumor Alkaloids". Journal of the Taiwan Pharmaceutical Association 1979, Volumen 31, Número 1, páginas 28-39. Ver página 33, compuestos N-1 y N-2; página 35, párrafo 1.	1-21
A	TSE-DINH, Y.-C. "Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds". Nucleic Acids Research 2009, Volumen 37, Número 3, páginas 731-737. [Disponible en línea el 28.11.2008]. Ver página 731, resumen; página 735, figura 2.	1-21
A	ESTELLÉS, R. et al. "Effect of boldine, secoboldine, and boldine methine on angiotensin II-induced neutrophil recruitment in vivo". Journal of Leukocyte Biology 2005, Volumen 78, páginas 696-704. Ver página 697, figura 1.	1-21
A	ESTELLÉS, R. et al. "Effect of two phenanthrene alkaloids on angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo". British Journal of Pharmacology 2003, Volumen 140, página 1057-1067. [Disponible en línea el 14.10.2003]. Ver páginas 1058, figura 1.	1-21
A	MISHRA, B.B. et al. "Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis". Fitoterapia 2009, Volumen 80, páginas 81-90. [Disponible en línea el 31.10.2008]. Ver página 85, columna 2, párrafo 3.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.02.2011

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D317/70 (01.01.2006)

A61K31/36 (01.01.2006)

A61P31/04 (01.01.2006)

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

C07D, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, REGISTRY, CAPLUS, PUBMED, MEDLINE, XPESP, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.02.2011

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LIOU, Y.-F. et al. Journal of the Taiwan Pharmaceutical Association 1979, Vol. 31, Nº 1, pp. 28-39.	1979
D02	TSE-DINH, Y.-C. Nucleic Acids Research 2009, Vol. 37, Nº 3, pp. 731-737.	28.11.2008
D03	ESTELLÉS, R. et al. Journal of Leukocyte Biology 2005, Vol. 78, pp. 696-704.	00.09.2005
D04	ESTELLÉS, R. et al. British Journal of Pharmacology 2003, Vol. 140, pp. 1057-1067.	14.10.2003
D05	MISHRA, B.B. et al. Fitoterapia 2009, Vol. 80, pp. 81-90.	31.10.2008

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

El objeto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula (**I**) con dos grupos de metilendioxicbenceno condensados, en concreto seconeolitsina y metil-seconeolitsina, para la fabricación de un medicamento efectivo frente a bacterias Gram-positivas.

El documento D01 divulga una serie de alcaloides, entre los que se encuentran los derivados de fenantreno **N-1** y **N-2**, que se diferencian de los compuestos de la invención de fórmula **I** tan sólo en que los grupos metilendioxi de éstos han sido sustituidos por grupos metoxilo (ver página 33). Estos compuestos presentan diversas actividades biológicas, incluyendo actividad antitumoral y antimicrobiana, siendo efectivos frente a *Streptococcus*, entre otras bacterias (ver página 35, párrafo 1).

El documento D02 divulga una serie de compuestos que actúan sobre la topoisomerasa bacteriana **I** y, como consecuencia de ello, presentan actividad antibacteriana (ver página 731, resumen). Entre estos compuestos se encuentra el derivado de metilendioxi fenantreno **1** (ver página 735, figura 2), que se diferencia del compuesto de la invención en que contiene un solo grupo metilendioxi.

El documento D03 divulga la actividad antiinflamatoria de boldina (**B**) y otros dos alcaloides fenantrénicos semisintéticos, secoboldina (**SB**) y metinboldina (**BM**). Estos dos últimos se diferencian de los compuestos de la invención en los grupos protectores de los hidroxilos presentes, ya que dos de dichos grupos hidroxilo se encuentran libres y los otros dos están protegidos en forma de metoxilo (ver página 697, figura 1).

El documento D04 divulga dos alcaloides derivados de fenantreno, uvariopsina y estefenantrina, que presentan el mismo esqueleto fundamental que los compuestos de la invención, pero se diferencian de éstos en que no contienen nitrógeno en la cadena lateral, y además tienen un solo grupo metilendioxi (ver página 1058, figura 1), y su efecto en las interacciones in vivo inducidas por angiotensina II entre las células del endotelio y leucocitos.

El documento D05 divulga los alcaloides derivados de fenantreno, neolitsina (**21**) y criptodorina (**22**), que presentan el mismo esqueleto fundamental que los compuestos de la invención, pero se diferencian de éstos en que el átomo de nitrógeno de la cadena lateral se encuentra unido al esqueleto de fenantreno formando un ciclo de seis eslabones condensado con dicho fenantreno y su actividad leishmanicida (ver página 85, columna 2, párrafo 3).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros divulga o contiene sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia el uso de un compuestos de fórmula (**I**), derivados de fenantreno con dos grupos metilendioxi y una cadena lateral portando un sustituyente dimetilamino, para la fabricación de un medicamento.

Por tanto, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones **1-21** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva exigidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.