

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 248**

51 Int. Cl.:

C07D 491/052 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2017** **PCT/EP2017/059521**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2017** **WO17182632**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2017** **E 17722393 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.12.2021** **EP 3445766**

54 Título: **Nuevo compuesto antimicrobiano**

30 Prioridad:

22.04.2016 NO 20160680

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

05.05.2022

73 Titular/es:

SINTEF TTO AS (100.0%)
Postboks 4764 Sluppen
7465 Trondheim, NO

72 Inventor/es:

SLETTA, HÅVARD;
FLØGSTAD DEGNES, KRISTIN;
ELLINGSEN, TROND ERLING;
NORDBORG, ANNA;
KLINKENBERG, GEIR y
HAKVÅG, SIGRID

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 909 248 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo compuesto antimicrobiano

5 Introducción

La invención proporciona un nuevo compuesto, un método para producirlo y usos como un agente antimicrobiano.

Antecedentes

10 Los productos naturales siguen siendo la fuente más prolífica de nuevos antimicrobianos, y la diversidad química de los compuestos naturales aún no tiene comparación con los enfoques de la química combinatoria (Newman y Cragg, 2012). Si bien este último se aplicó con éxito para la optimización principal, básicamente no logró generar farmacóforos realmente nuevos, especialmente en el campo de los antimicrobianos. Esto se debe principalmente a limitaciones en la variedad estructural de compuestos representados en bibliotecas combinatorias. La mayoría de los antibióticos en uso clínico en la actualidad se han desarrollado a partir de compuestos aislados de bacterias y hongos, siendo los miembros de las actinobacterias la fuente dominante (Peláez F, 2006). Los antibióticos derivados de actinobacterias que son importantes en medicina incluyen aminoglucósidos, antraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, tetraciclinas, etc. Tradicionalmente, la mayoría de estos antimicrobianos se han aislado de actinomicetos del género *Streptomyces* derivados del suelo.

El documento DE 102006002427 A1 se refiere a los derivados de lisolipina de *Streptomyces tendae* y su uso en composiciones farmacéuticas, mientras que WO 2007/095696 se refiere a policétidos xantonas de la clase de las kibdelonas y su uso como agentes antibacterianos y anticancerígenos.

25 Sin embargo, las estrategias de aislamiento en los últimos años se han dirigido a ambientes no explotados como las fuentes marinas. Los esfuerzos de bioprospección centrados en el aislamiento y detección de actinobacterias de los hábitats oceánicos han añadido nueva biodiversidad al orden Actinomycetales y han revelado una gama de nuevos productos naturales de valor farmacológico potencial (Mincer 2001). La existencia de especies de actinobacterias marinas que son fisiológica y filogenéticamente distintas de sus parientes terrestres ahora es ampliamente aceptada, y se han descrito nuevos grupos taxonómicos de actinomicetos marinos para al menos seis familias diferentes dentro del orden Actinomycetales (Fenical et al 2006).

35 Además de ser filogenéticamente distintos de sus parientes terrestres, se ha demostrado que los aislamientos marinos poseen adaptaciones fisiológicas específicas (por ejemplo, a alta salinidad/osmolaridad y presión) a su entorno marítimo. La inmensa diversidad de este hábitat junto con su subexplotación es la razón fundamental para atraer a los investigadores hacia él para descubrir nuevos productores de metabolitos. Hay una ocurrencia de distintos géneros raros en el ecosistema marino, y se descubrió que muchos producen metabolitos secundarios nuevos y químicamente diversos (Riedlinger 2004), (Zotchev, 2012), (Manivasagan et al., 2014).

40 La mayoría de los estreptomicetos y otros actinomicetos filamentosos poseen numerosos grupos de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Bentley et al 2002), y los estudios de secuencias genómicas han revelado que gran parte de sus genomas se dedican a la biosíntesis de metabolitos secundarios. Se han identificado varios grupos de genes que codifican metabolitos secundarios conocidos o previstos en el genoma de diferentes cepas de *Streptomyces* (Brautaset et al 2003) y el actinomiceto marino *Salinispora* (Bode et al, 2002). Muchos productos naturales importantes desde el punto de vista médico, incluidos antibacterianos y antifúngicos, se sintetizan mediante estas líneas de ensamblaje multimodulares, y la extracción de genomas para grupos de genes de metabolitos secundarios se ha convertido en una herramienta común para evaluar la capacidad genética de las bacterias para producir nuevos compuestos bioactivos (Fischbach y Walsh, 2006)).

50 Sin embargo, incluso para productores de antibióticos modelo bien estudiados como *Streptomyces coelicolor* A3(2), las discrepancias entre el número de metabolitos conocidos por un lado y el número de rutas identificadas a partir de datos genómicos por otro lado son tremendas (Bentley et al 2002). Estas discrepancias solo pueden explicarse por el hecho de que la mayoría de los grupos de genes para metabolitos secundarios se silencian en condiciones de cultivo de laboratorio estándar y que una expresión o regulación positiva de estas rutas solo se desencadena en respuesta a ciertas señales ambientales. Se ha demostrado que, al cultivar bacterias en una variedad de condiciones, es posible obtener productos de muchas de estas rutas biosintéticas "huérfanas" (Bode, 2002).

60 En Engelhardt et al (2010), veintisiete actinomicetos derivados de esponjas y sedimentos marinos se clasificaron a nivel de género utilizando taxonomía molecular. Como se ha descrito, se utilizó detección por PCR de genes implicados en la síntesis de antibióticos poliquétidos y péptidos no ribosómicos para analizar el potencial de los actinomicetos para producir metabolitos secundarios bioactivos.

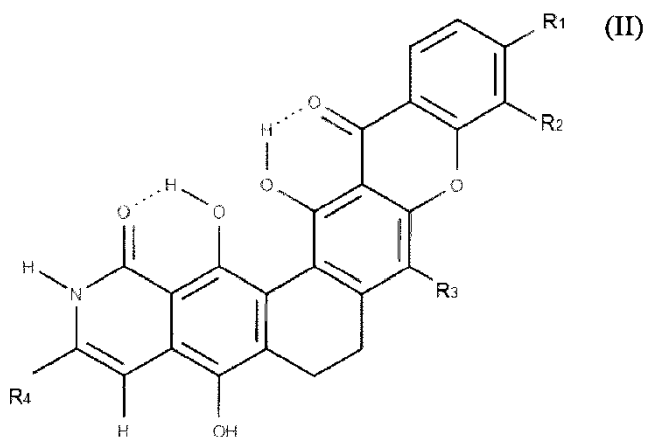
65 La mayoría de los antibióticos de uso clínico en la actualidad fueron descubiertos hace más de 5 décadas. En los últimos 10 años, solo se han aprobado dos nuevos agentes antibacterianos con nuevos mecanismos de acción (la oxazolidinona linezolidina sintética y el lipopéptido daptomicina a base de productos naturales). La pérdida de eficacia

de los fármacos existentes debido a la aparición de patógenos multirresistentes amenaza con dejar atrás el desarrollo de nuevos antimicrobianos. La mayoría de los fármacos antiinfecciosos se derivan o se inspiran en productos naturales. De acuerdo con lo anterior, es más probable que los nuevos antibióticos provengan de la investigación basada en productos naturales, ya que ni la investigación basada en objetivos derivados de la genómica ni la química combinatoria han proporcionado hasta ahora fármacos que realmente hayan ingresado al mercado.

Por lo tanto, la minería de la diversidad microbiana representa la fuente más prometedora para obtener nuevos y diversos antimicrobianos para enfrentar los desafíos con la multirresistencia emergente.

Resumen de la invención

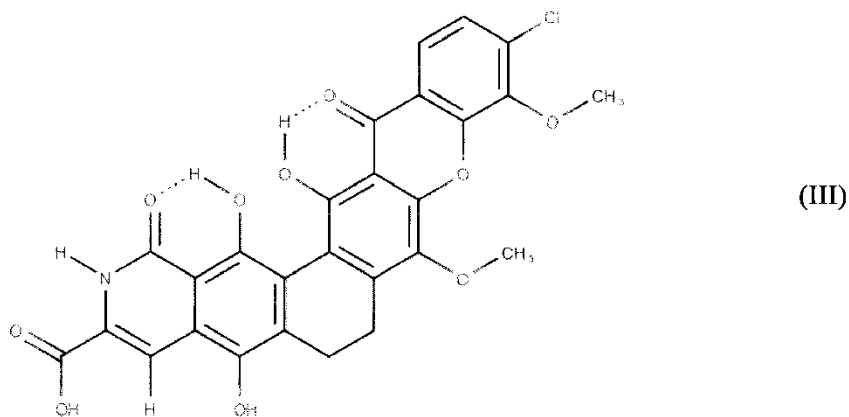
La invención proporciona un nuevo compuesto, que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula II



y sus sales y solvatos,

en el que R₁ es un átomo de halógeno, seleccionado de cloro, bromo y yodo, R₂ y R₃ es —O—CH₃, R₄ es —COOH, —C(O)OR₅ y —C(O)NR₅R₆ y R₅ y R₆ son independientemente un hidrógeno, un grupo alquilo C₁–C₄-, un grupo alqueno C₂–C₄, un grupo alquino C₂–C₄ y un grupo fenilo.

En una realización de la invención, el compuesto tiene la estructura de acuerdo con la fórmula III



y sales y solvatos de los mismos.

También se proporciona un método para producir el compuesto que comprende las siguientes etapas:

a) cultivar una bacteria seleccionada del grupo que consta de:

i) un aislado bacteriano depositado en virtud del Tratado de Budapest con Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania (en lo sucesivo denominado DSMZ) el 7 de abril, 2016 bajo el número de depósito DSM 32287; y

ii) una bacteria que está estrechamente relacionada con el aislado bacteriano en i), como una cepa con características genotípicas y/o fenotípicas similares a las de la bacteria aislada;

en un medio de cultivo adecuado que comprende agua de mar;

b) extraer el compuesto de acuerdo con la invención del cultivo.

En una realización del método para producir el compuesto, la bacteria es una bacteria que comprende en su genoma un ARNr 16S que por transcripción inversa y síntesis de la segunda cadena proporciona una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia representada en SEQ ID NO: 1.

Además, se especifica que la etapa b) del método puede comprender la centrifugación de las bacterias cultivadas para obtener un sedimento celular, del que se extrae el compuesto, y la etapa de extraer el compuesto del sedimento celular usando dimetilsulfóxido (DMSO).

En una realización el medio de cultivo es PM6, opcionalmente con agua de mar artificial.

También se proporciona el uso de una bacteria aislada para producir el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la bacteria se selecciona del grupo que consiste en:

a) un aislado bacteriano depositado bajo el Tratado de Budapest con DSMZ el 7 de abril, 2016 bajo el número de depósito DSM 32287; y

b) una bacteria que está estrechamente relacionada con el aislado bacteriano de a) tal como una bacteria con características genotípicas y/o fenotípicas similares a la bacteria aislada.

Se proporciona además el uso de bacterias aisladas en el que se especifica que la bacteria estrechamente relacionada comprende en su genoma un ARNr 16S que por transcripción inversa y síntesis de la segunda cadena proporciona una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia representada en SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, y el compuesto para uso en terapia, tal como un agente antimicrobiano, más específicamente un agente antibacteriano.

Otra realización de la invención es un método para tratar una infección bacteriana en un sujeto que comprende administrar el compuesto de la invención o la composición farmacéutica a dicho sujeto.

De acuerdo con otra realización más, la infección bacteriana está provocada por una bacteria multirresistente, tal como una bacteria multirresistente Gram-positiva y/o Gram-negativa.

Otro aspecto más de la invención es un método no médico para matar o inhibir el crecimiento de una bacteria que comprende la etapa de poner el compuesto de la invención o la composición farmacéutica en contacto con la bacteria que se va a matar o inhibir.

La invención también incluye el uso no médico del compuesto como agente antibacteriano.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la isotopía de LC-DAD (espectro superior) y los espectros de MS en ESI (centro) y los espectros de MS de ESI- (inferior) de la fracción activa del extracto MP127-ig17 fraccionado en HPLC.

La Figura 2 muestra la estructura de MBL-AB01 con datos clave de RMN y MS que respaldan la estructura.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un nuevo agente antimicrobiano. Los inventores han analizado aislados de actinomicetos derivados de sedimentos marinos, identificando así nuevas bacterias capaces de producir metabolitos secundarios antimicrobianos.

Mediante el uso de cultivos en micropocillos, matraces de agitación y fermentadores, los inventores pudieron identificar las condiciones de cultivo para la producción de compuestos antibacterianos y antifúngicos. El enfoque condujo a la identificación de un nuevo compuesto antimicrobiano, MBL-AB01.

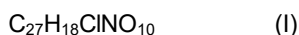
De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona un nuevo compuesto antimicrobiano, como MBL-AB01.

Los compuestos como MBL-AB01 pertenecen a un grupo de compuestos producidos por microorganismos a menudo denominados metabolitos secundarios.

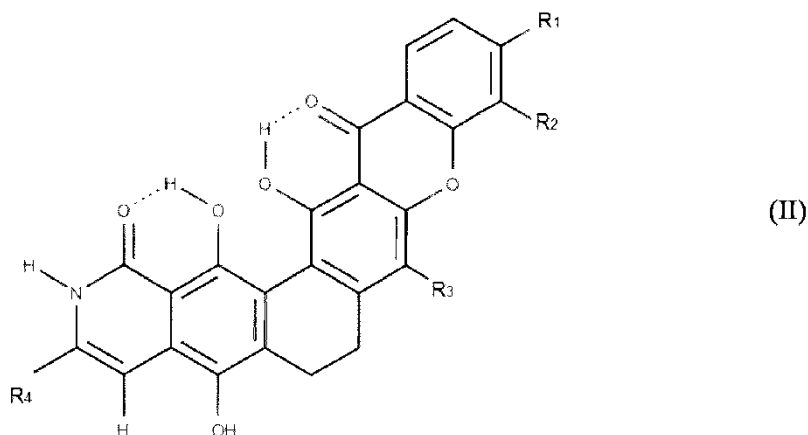
Por "metabolitos secundarios", nos referimos a compuestos que los microorganismos pueden sintetizar. No son esenciales para los procesos metabólicos básicos, como el crecimiento y la reproducción. Los metabolitos secundarios pueden tener otras características útiles, como actividad anticancerígena y/o antimicrobiana, como actividad antifúngica y antibacteriana (Behal, 2000; Bennett y Bentley, 1989)

La elucidación de la estructura del compuesto MBL-AB01 ha revelado que el compuesto es un compuesto nuevo que pertenece a la clase de compuestos Xanthon. La fórmula molecular es como se muestra en la fórmula I:

Fórmulas moleculares:



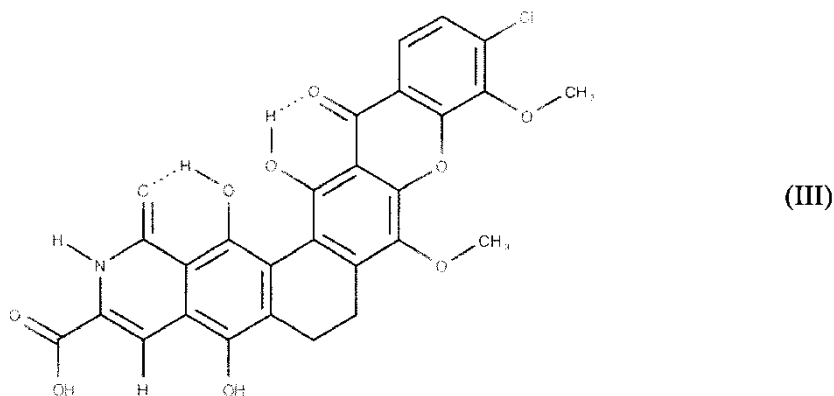
En la fórmula II se muestra una estructura molecular general del presente compuesto:



R_1 puede ser un átomo de halógeno, seleccionado de cloro, bromo y yodo, R_2 y R_3 puede ser $-\text{O}-\text{CH}_3$. R_4 puede ser $-\text{COOH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}_5$ y $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_5\text{R}_6$ y R_5 y R_6 son independientemente un hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_4 , un grupo alquenoilo C_2-C_4 , un grupo alquinilo C_2-C_4 y un grupo fenilo.

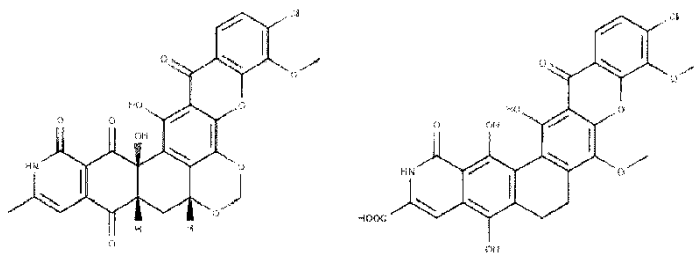
El compuesto de acuerdo con la invención es un compuesto de xantón con la estructura general de la fórmula II.

En una realización, la invención tiene la estructura que se muestra en la fórmula III, y sus solvatos y sales



Un antiguo compuesto conocido, la xantolipina, tiene la misma fórmula molecular que la representada en la fórmula I. Sin embargo, una comparación de la estructura reveló diferencias significativas entre las moléculas de xantolipina y la MBL-AB01 de la invención.

Las diferencias se resumen a continuación:



	xantolipina	MBL-AB01
No. de hidrógenos lábiles	3	5
LogP pronosticado	2.6	4.8
Centros quirales	3	0
PKA más bajo previsto	9.0	2.9

La invención es un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula III, y derivados, solvatos y/o hidratos del mismo. Tal como lo proporciona la invención, los derivados son compuestos con una estructura de acuerdo con la fórmula II, donde R_1 es un átomo de halógeno, seleccionado de cloro, bromo y yodo, R_2 y R_3 es $-O-CH_3$. R_4 es $-COOH$, $-C(O)OR_5$ y $-C(O)NR_5R_6$ y R_5 y R_6 son independientemente un hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_4 , un grupo alquenilo C_2-C_4 , un grupo alquinilo C_2-C_4 y un grupo fenilo.

El término "solvato" se refiere a un compuesto sólido que tiene una o más moléculas de disolvente asociadas con su estructura sólida. Los solvatos se pueden formar cuando un compuesto sólido se cristaliza a partir de un disolvente, en el que una o más moléculas de disolvente se convierten en parte integral de la matriz cristalina sólida. Los compuestos de las fórmulas aquí descritas pueden ser solvatos. Otro tipo de solvato es un hidrato. Un "hidrato" también se refiere a un compuesto sólido que tiene una o más moléculas de agua íntimamente asociadas con su estructura sólida o cristalina a nivel molecular. Un hidrato es un tipo específico de solvato. Los hidratos se pueden formar cuando un compuesto se solidifica o cristaliza en agua, donde una o más moléculas de agua se convierten en parte integral de la matriz cristalina sólida. Los compuestos de las fórmulas aquí descritas pueden ser hidratos.

El nuevo compuesto antibacteriano de acuerdo con la invención es producido por bacterias actinomicetos, como una cepa del género *Actinalloteichus*. En una realización particular, el compuesto antibacteriano de la invención se produce mediante el cultivo del aislado bacteriano derivado de sedimentos marinos MP127-igl7 o cepas estrechamente relacionadas.

Por "cepas estrechamente relacionadas", se entiende cualquier cepa que comparte características genotípicas y/o fenotípicas similares a la cepa aislada. En particular, esta frase abarca formas ligeramente modificadas de la cepa que retienen sustancialmente las mismas actividades funcionales. Así, por ejemplo, algunas adiciones, deleciones o alteraciones de aminoácidos o nucleótidos tienen muy poco efecto; en su caso, sobre la capacidad funcional para producir un compuesto de acuerdo con la invención. Una definición del término "cepas estrechamente relacionadas" se proporciona en Peak et al, que se puede usar en este documento.

Además, la invención proporciona un método para producir un agente antimicrobiano, como MBL-AB01, que comprende la etapa de cultivar bacterias actinomicetos, como una cepa del género *Actinalloteichus*. En una realización particular, el compuesto es producido por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en i) un aislado bacteriano depositado bajo el Tratado de Budapest con DSMZ de fecha 7 de abril de 2016 bajo el número de depósito DSM 32287; y ii) una bacteria que está estrechamente relacionada con el aislado bacteriano de i) tal como una bacteria con características genotípicas y/o fenotípicas similares a la bacteria aislada.

La bacteria productora del compuesto, tal como se describe en el presente documento, puede ser una bacteria que comprende en su genoma un ARNr 16S que, mediante transcripción inversa y síntesis de la segunda cadena, proporciona una secuencia que es al menos un 80 % idéntica, tal como al menos un 82 %, un 83 %, 85 %, 86 %, 87 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98.5 %, 98.7 %, 98.8 % o 98.9 % o 99 % idéntico, a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1.

El experto en la materia esperará que se introduzcan alteraciones considerables en una secuencia definida en SEQ ID NO: 1 y sus subsecuencias sin alterar significativamente su estructura general, función y propiedades.

Por "características fenotípicas", se entiende la capacidad de producir el metabolito secundario de acuerdo con la invención, es decir, el compuesto con una estructura molecular de acuerdo con cualquiera de las fórmulas II y/o III.

Por “características genotípicas”, nos referimos a rasgos característicos de moléculas genéticas tales como ácidos nucleicos y aminoácidos, tales como la molécula de ARNr 16S, por ejemplo, conocida como identidad de secuencia. Como se hace referencia en el presente documento, las “cepas con características genotípicas similares” incluyen bacterias que comprenden un ARNr 16S que, mediante transcripción inversa y síntesis de la segunda cadena, proporciona una secuencia que es al menos un 80 % idéntica, como al menos un 82 %, 83 %, 85 %, 86 %, 87 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98.5 %, 98.7 %, 98.8 % o 98.9 % o 99 % idéntico, al secuencia establecida en SEQ ID NO: 1.

La expresión “aislado bacteriano” se usa a menudo para definir un cultivo de una cepa bacteriana. El aislado puede purificarse y aislarse por diferentes medios conocidos por el experto en la materia. Un “aislado bacteriano” o “cepa bacteriana”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo genotípico y fenotípico único, rastreable hasta una colonia, típicamente derivable de la transferencia de una muestra purificada a un medio adecuado. Las expresiones aislado, cepa y bacteria se usan indistintamente.

De acuerdo con el método de la invención, las bacterias se cultivan en un cultivo microbiológico con un medio de cultivo adecuado, conocido por el experto en la materia. En una realización, el medio de cultivo comprende agua de mar.

Un “cultivo microbiológico”, o cultivo microbiano, es un método para multiplicar organismos microbianos permitiéndoles reproducirse en medios de cultivo predeterminados bajo condiciones de laboratorio controladas. El término “cultivo” se usa más generalmente de manera informal para referirse al “crecimiento selectivo” de un microorganismo específico como una bacteria en el laboratorio.

El compuesto de acuerdo con la invención se puede obtener a partir de un cultivo bacteriano como se describe en este documento.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona un método para producir el compuesto de fórmula III y derivados, solvatos y/o hidratos del mismo, cultivando bacterias como se describe en este documento en un cultivo con un medio de cultivo adecuado.

En una realización, el medio de cultivo es un medio de crecimiento comercialmente disponible que se usa comúnmente para cultivar bacterias, como el caldo Trypton Soya (Oxoid). En otra realización, el medio de cultivo es un medio de cultivo estándar como el medio Luria-Bertani (LB). Otra realización más es un medio complejo diseñado para la producción de metabolitos secundarios por actinomicetos como PM6 descrito en Engelhardt et al., 2010. En otra realización más, el medio de cultivo se complementa con agua de mar artificial. En una realización, se produce un cultivo de inóculo con la cepa bacteriana productora del compuesto en matraces llenos de medio de caldo tripton soja con agua de mar.

El cultivo que comprende las bacterias cultivadas puede ser opcionalmente un cultivo de producción. Los cultivos de producción pueden inocularse a partir de cultivos de semillas. Los cultivos de producción pueden producirse en matraces llenos de un medio de cultivo adecuado, como medio PM6 con agua de mar artificial.

Por “medio de cultivo adecuado”, se entiende cualquier medio conocido por el experto en la materia adecuado para hacer crecer la bacteria en cuestión. Como se usa en este documento, las expresiones “medio de cultivo” o “medio de fermentación” o “cultivo de células” se refieren a una solución nutritiva utilizada para el cultivo y se referirán a todo tipo de medios que se utilizan en el contexto del cultivo de los aislados. Normalmente, un medio de cultivo comprende una fuente de carbono como azúcares, almidón, harina o extracto de levadura, una fuente de nitrógeno como harina que contiene proteínas y aminoácidos o sulfato de amonio y minerales como sales inorgánicas.

Los medios de cultivo pueden definirse químicamente como MR6 (Illing et al., 1989), medios complejos como PM4, PM5 y PM6 descritos en Engelhardt et al., 2010 o medios de cultivo estándar como ISP2. Otros ejemplos típicos de medios de cultivo para la producción de compuestos antibióticos son R2YE (Thompson et al., 1980), R5 (Illing et al., 1989) y AMP (Wendt-Pienkowski et al., 2005).

El método de la invención comprende además la etapa de aislar el compuesto antibacteriano del cultivo. El aislamiento del compuesto de las bacterias cultivadas se puede realizar por medios bien conocidos por los expertos.

Un método para obtener el compuesto es extrayéndolo del cultivo de producción y/o del sedimento celular que se recoge por centrifugación del cultivo de producción. Esto se puede hacer recolectando la materia seca que se recolecta por centrifugación del cultivo. Opcionalmente, la materia seca se puede lavar con metanol para extraer compuestos que no están relacionados con el compuesto activo.

El compuesto puede extraerse mediante un disolvente adecuado conocido por el experto en la materia.

En una realización particular, la materia seca del cultivo de producción puede recogerse por centrifugación y opcionalmente fraccionarse o lisarse por medios familiares para el experto en la materia, por ejemplo, liofilizando el sedimento celular.

Además, el compuesto se puede extraer con un disolvente adecuado, como DMSO o DMSO con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %. El compuesto también se puede extraer con otros disolventes orgánicos, como alcoholes y alcanos. La materia no disuelta se elimina opcionalmente por filtración. En una realización, el compuesto se separa adicionalmente por cromatografía, tal como HPLC. En una realización, la separación se realiza mediante HPLC en condiciones básicas.

Para evitar opcionalmente la degradación del compuesto, el pH de las fracciones se puede ajustar, por ejemplo, añadiendo un tampón, como un tampón de acetato de amonio con pH = 4, a cada uno de los viales colectores de fracciones antes del fraccionamiento. El compuesto activo de las fracciones se une además a una columna de fase sólida, acondicionada con un alcohol, como metanol, opcionalmente acidificado con tampón de acetato de amonio a pH=4. Una vez que el compuesto se une a la columna, las impurezas se eliminan de la columna con alcohol acidificado, como metanol.

El compuesto se eluye adicionalmente de la columna con un alcohol, tal como metanol, opcionalmente también se agrega tampón de acetato de amonio pH ajustado a pH = 8.0. Además, el método de aislamiento del compuesto puede comprender la etapa de eliminar el alcohol u otros disolventes mediante centrifugación al vacío, antes de añadir agua al compuesto y liofilizarlo.

Un método para identificar el compuesto de la invención es mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tal como HPLC-MS o HPLC-UV y espectroscopia de masas (MS) de alta resolución.

En Engelhardt et al (2010), se describe un proceso de aislamiento de bacterias actinomicetos marinos. El estudio proporcionó la taxonomía molecular y los análisis filogenéticos de 27 bacterias actinomicetos diferentes. En la tabla 1, se describe un aislado denominado TSI127-17 derivado de esponja. Los análisis de secuencia del gen 16S ARNr revelaron que TSI127-ig17 tenía un 98.97 % de similitud genética con el *Actinalloteichus hymeniacionis* HPA177 con GenAccession No. DQ144222. En Engelhart et al. (2010), se utilizó la detección mediante PCR de genes PKS/NRPS para investigar el potencial de estos aislados de actinomicetos para sintetizar metabolitos secundarios derivados de policétidos y péptidos no ribosómicos, lo que indica el potencial de estos aislados de actinomicetos para sintetizar metabolitos secundarios.

En este documento, se proporciona la bacteria depositada (DSM 32287) que comprende en su genoma una molécula de ARNr 16S que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1.

Un aspecto de la invención es el uso de nuevos aislados bacterianos de bacterias actinomicetos para producir un compuesto antimicrobiano como MBL-AB01.

Por lo tanto, la invención es el uso de una bacteria en los géneros *Actinalloteichus* para producir metabolitos secundarios, como el compuesto antimicrobiano MBL-AB01. La bacteria a utilizar puede ser la cepa productora del compuesto antimicrobiano *Actinalloteichus hymeniacionis*.

En una realización particular, la bacteria según este aspecto de la invención es el aislado bacteriano (DSM 32287) denominado MP127-ig17, o cepas estrechamente relacionadas, como se define en este documento. En otra realización particular, la invención es el uso de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en i) un aislado bacteriano depositado bajo el Tratado de Budapest con DSMZ en fecha 7 de abril de 2016 bajo el número de depósito DSM 32287; y ii) una bacteria que está estrechamente relacionada con el aislado bacteriano de i) como una bacteria con características genotípicas y/o fenotípicas similares a la bacteria aislada para producir metabolitos secundarios, como compuestos que tienen una estructura de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I y/o II y/o III, y derivados, solvatos y/o hidratos de los mismos con las mismas propiedades funcionales que MBL-AB01.

La bacteria productora del compuesto, tal como se describe en el presente documento, puede ser una bacteria que comprende en su genoma un ARNr 16S que, mediante transcripción inversa y síntesis de la segunda cadena, proporciona una secuencia que es al menos un 80 % idéntica, tal como al menos un 82 %, un 83 %, 85 %, 86 %, 87 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98.5 %, 98.7 %, 98.8 % o 98.9 % o 99 % idéntico, a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1. Se han caracterizado las características estructurales y biológicas del nuevo compuesto antimicrobiano, MBL-AB01. Se ha demostrado que el compuesto de la invención es un poderoso agente antibacteriano que inhibe el crecimiento de una variedad de cepas bacterianas, incluidas las bacterias resistentes a múltiples fármacos.

La actividad antibacteriana ha sido determinada por estudios in vitro, tal como se describe en el ejemplo 5.

También se ha demostrado in vitro que MBL-AB01 es menos citotóxico que compuestos comparables como Xantolipina, como se describe en el Ejemplo 6. Por lo tanto, MBL-AB01 es un candidato muy atractivo como agente antimicrobiano, útil en diferentes composiciones farmacéuticas.

5 De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona el uso del compuesto de la invención en aplicaciones médicas, como en terapia. La invención incluye un compuesto de fórmula I y/o II y/o III, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, para uso en terapia, en particular para el tratamiento de infecciones bacterianas.

10 Los términos “tratar”, “trata” y “tratamiento” incluyen (i) prevenir que ocurra una enfermedad, afección patológica o médica (por ejemplo, profilaxis); (ii) inhibir la enfermedad, afección patológica o médica o detener su desarrollo; (iii) aliviar la enfermedad, afección patológica o médica; y/o (iv) la disminución de los síntomas asociados con la enfermedad, patología o afección médica. Por lo tanto, los términos “tratar”, “trata” y “tratamiento” pueden extenderse a la profilaxis y pueden incluir prevenir, prevenir, disminuir, detener o revertir la progresión o gravedad de la afección o los síntomas que se tratan. Como tal, el término “tratamiento” puede incluir administración médica, terapéutica y/o profiláctica, según corresponda.

15 Los términos “inhibir”, “inhibe” e “inhibición” se refieren a ralentizar, detener o invertir el crecimiento o la progresión de una enfermedad, infección, afección o grupo de células. La inhibición puede ser superior a aproximadamente el 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, por ejemplo, en comparación con el crecimiento o progresión que se produce en ausencia del tratamiento o contacto.

20 Los compuestos de la invención y sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables pueden usarse solos, pero generalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica en la que el compuesto/sal/solvato (ingrediente activo) está asociado con excipientes farmacéuticamente aceptables, diluyentes o portadores. Tales composiciones farmacéuticas son proporcionadas por la invención.

25 Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticas terapéuticas, por ejemplo, combinando los compuestos con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos se pueden añadir a un vehículo en forma de sal o solvato. Por ejemplo, en los casos en los que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas estables y no tóxicas, puede ser apropiada la administración de los compuestos como sales. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, a-cetoglutarato y 0-glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, incluyendo sales de clorhidrato, haluro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato (Berge et al 1997).

30 Por lo tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula II y/o III, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables. Tal composición es útil en el tratamiento de diferentes infecciones microbianas.

35 La presente invención se relaciona además con composiciones que comprenden las cepas, caldo de cultivo, medios de cultivo, inóculo, extractos, sedimento celular o compuestos de fórmula II y/o III y sus sales de la invención, así como a su uso para la protección contra infecciones por microorganismos nocivos, y a métodos correspondientes que comprenden el tratamiento de animales, incluidos los seres humanos, contra infecciones microbianas con una cantidad eficaz de las composiciones, cepas, caldo de cultivo, medios de cultivo, inóculo, extractos, sedimento celular o compuestos de fórmula II y/o III y sus sales o solvatos de la invención.

40 Como se usa aquí, “composición” en referencia a un producto (cepa microbiana, agente, compuesto o formulación) de la presente invención se refiere a una combinación de ingredientes, en el que “formular” es el proceso de usar una fórmula, como una receta, para una combinación de ingredientes, a añadir para formar la formulación. Dicha composición también puede denominarse formulación. Las cepas, el caldo de cultivo, los medios de cultivo, el inóculo, los extractos, el sedimento celular o los compuestos de fórmula II y/o III y las composiciones de la invención, respectivamente, son adecuados como agentes antimicrobianos o antibióticos.

45 Se describe un kit que comprende un cultivo bacteriano aislado con número de acceso DSM 32287, las cepas, caldo de cultivo, medios de cultivo, inóculo, extractos, sedimento celular o compuestos de fórmula I y/o II y/o III y sus sales de la invención. Un kit que comprende el cultivo bacteriano aislado, las cepas, caldo de cultivo, extractos, extractos libres de células, medios de cultivo, inóculo o compuestos de fórmula I y/o II y/o III y sus sales de la invención, es útil para tratar un amplio espectro de infecciones bacterianas.

50 La invención proporciona además un proceso para la preparación de una composición farmacéutica de la invención, que comprende mezclar un compuesto de fórmula II y/o III o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables con un diluyente, excipiente farmacéuticamente aceptable o vehículo. El experto en la materia podrá identificar excipientes farmacéuticos adecuados dependiendo de la ruta de administración.

55

Se proporciona el compuesto para uso como medicamento, tal como un agente antimicrobiano, más específicamente un agente antibacteriano.

La actividad antibacteriana in vitro de la invención se determinó frente a un panel de cepas bacterianas. Como se muestra en los ejemplos, un compuesto de acuerdo con la invención es activo frente a bacterias Gram-positivas multirresistentes, incluidas *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina.

También se proporciona el uso de una bacteria, como el aislado bacteriano depositado o una cepa estrechamente relacionada, para producir el compuesto.

La invención proporciona métodos terapéuticos para tratar infecciones en un mamífero, que implican administrar a un mamífero que tiene una infección una cantidad eficaz de un compuesto o composición descritos en el presente documento. Un mamífero incluye primates, humanos, roedores, caninos, felinos, bovinos, ovinos, equinos, porcinos, caprinos, bovinos y similares. La infección puede ser una infección bacteriana, por ejemplo, una causada por una bacteria descrita en este documento. También se proporciona un método para matar o inhibir el crecimiento de una bacteria, que comprende la etapa de poner en contacto el compuesto de acuerdo con la invención con la bacteria que se va a matar. Este método puede comprender adicionalmente la etapa de poner en contacto la bacteria con una composición farmacéutica como se describe en este documento.

La capacidad de un compuesto de la invención para tratar una infección bacteriana puede determinarse utilizando ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se conocen el diseño de protocolos de tratamiento, la evaluación de la toxicidad, el análisis de datos, la cuantificación de la muerte celular y la importancia biológica del uso de pantallas antibacterianas. Además, la capacidad de un compuesto para tratar una infección bacteriana o matar o inhibir bacterias puede determinarse utilizando los ensayos que se describen en el presente documento.

Las referencias en la memoria descriptiva a “una realización”, “una realización”, etc., indican que la realización descrita puede incluir un aspecto, característica, estructura, fracción o característica particular, pero no todas las realizaciones incluyen necesariamente ese aspecto, característica o estructura, fracción o característica. Además, tales frases pueden, pero no necesariamente, referirse a la misma realización a la que se hace referencia en otras partes de la especificación. Además, cuando un aspecto, característica, estructura, fracción o característica en particular se describe en relación con una realización, está dentro del conocimiento de un experto en la técnica afectar o conectar dicho aspecto, característica, estructura, fracción o característica con otras realizaciones, ya sea que se describan explícitamente o no.

Las formas singulares “un”, “una” y “la” incluyen una referencia plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a “un compuesto” incluye una pluralidad de dichos compuestos, de modo que un compuesto X incluye una pluralidad de compuestos X. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva, como “únicamente”, “únicamente” y similares, en relación con la mención de elementos de reivindicación o el uso de una limitación “negativa”.

El término “y/o” significa cualquiera de los elementos, cualquier combinación de elementos o todos los elementos con los que se asocia este término.

El término “aproximadamente” puede referirse a una variación de $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 20\%$ o $\pm 25\%$ del valor especificado. Por ejemplo, “alrededor del 50” por ciento puede tener en algunas realizaciones una variación del 45 al 55 por ciento.

Como comprenderá el experto en la materia, todos los números, incluidos los que expresan cantidades de ingredientes, propiedades como el peso molecular, las condiciones de reacción, etc., son aproximaciones y se entiende que están opcionalmente modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Estos valores pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que buscan obtener los expertos en la técnica utilizando las enseñanzas de las descripciones del presente documento. También se entiende que tales valores contienen inherentemente la variabilidad resultante necesariamente de las desviaciones estándar encontradas en sus respectivas mediciones de prueba.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de MP127-ig17

Aislamiento y taxonomía de MP127-ig17

El aislamiento de un aislado bacteriano perteneciente a *Actinobolus hyemiacidoni* (TS127-17) se ha descrito anteriormente (Engelhardt et al., 2010).

En breve, se recolectaron muestras de esponjas de la cresta de Tautra (63°36'53"N, 10°31'22"E, Fiordo de Trondheim, Noruega) a 60 m de profundidad. El material homogeneizado se sembró en placas en diferentes medios de agar y el aislado, denominado MP127-igl7, se aisló del medio de agar IM18: 3 g/l de harina de cangrejo, 2 g/l de harina de algas marinas, 20 g/l de agar, pH 8.0, preparado con 0.5x de agua de mar natural y 1 ml/l de solución de vitamina B (5 mg/l cada uno de tiamina-HCl, riboflavina, niacina, piridoxina-HCl, inositol, Ca-pantotenato, ácido p-aminobenzoico, 2.5 mg/l de biotina). MP127-igl7 no creció en este medio en ausencia de agua de mar.

La secuenciación del 16S ADNr mostró un 98.97 % de similitud génica con *Actinoalloteichus hymeniacidonis* HPA177.

MP127-igl7 ha sido depositado bajo el Tratado de Budapest con DSMZ en fecha 7 de abril, 2016 bajo el número de depósito DSM 32287.

Detección de bioactividad

Los aislados de la muestra de esponja se cultivaron en diferentes medios de producción a 25 °C y los extractos se seleccionaron mediante un ensayo de difusión en agar como se describió anteriormente (Engelhardt et al., 2010). El aislado denominado MP127-igl7 se cultivó en medio PM6 (almidón soluble 10 g/l; extracto de levadura 2 g/l; glucosa 10 g/l; glicerol 10 g/l; polvo de maíz fermentado 2.5 g/l; peptona 2.0 g/l; CaCO₃ 3.0 g/l) con 25 % 2 x agua de mar artificial. Se preparó 2 x agua de mar artificial de la siguiente manera: 1.34 g/l KCl, 2.72 g/l CaCl₂ x 2H₂O, 12.58 g/l MgSO₄ x 7H₂O, 9.32 g/l MgCl₂ x 6H₂O, 0.36 g/l de bicarbonato de sodio, pH=7.8. La solución se esterilizó por filtración.

Se demostró que los extractos de MP127-igl7 fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Enterococcus faecium* CCUG37832, *Candida albicans* ATCC10231 y *Cándida albicans* CCUG39434.

Ejemplo 2: Identificación del compuesto bioactivo, MBL-AB01

El inóculo de MP127-igl7 se produjo en matraces de agitación de 500 ml llenos con 100 ml de caldo de triptón y soja (Oxoid) con 0.5 x agua de mar artificial. El cultivo se incubó a 30 °C durante 5 días. Los cultivos de producción se inocularon (3 %, vol/vol) a partir de cultivos de semillas. La producción se realizó en matraces de agitación de 500 ml llenos con 125 ml de medio PM6 con 0.5 x agua de mar artificial. El cultivo se incubó a 25 °C durante 12 días. El cultivo se liofilizó y se extrajo con DMSO.

El extracto de DMSO se fraccionó en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Agilent serie 1100 con una columna Zorbax Bonus-RP (2.1 x 50 mm, 3.5 µm) conectada a un detector de matriz de diodos (DAD) y un sistema colector de fracciones. Se usaron metanol y acetato de amonio 10 mm (pH 4) como fase móvil, y el gradiente de metanol se incrementó linealmente de 10 a 90 % durante 24 min. Se tomaron muestras de las fracciones cada minuto durante todo el proceso. Las fracciones se secaron en una centrifuga de vacío y se volvieron a disolver en DMSO.

Se analizó la actividad de las fracciones en un bioensayo basado en líquido robótico con *Micrococcus luteus* ATCC9341 y *Enterococcus faecium* CCUG37832 como organismos indicadores. Las fracciones activas se analizaron en un sistema Agilent HPLC con una columna Zorbax Bonus-RP (2.1 por 50 mm, 3.5 µm) conectada a un DAD y un aparato de tiempo de vuelo (TOF) para determinar la masa exacta del compuesto bioactivo. Se usaron acetato de amonio 10 mm (pH 7) y acetonitrilo como fases móviles, y la ionización por electropulverización se realizó en modo negativo.

Un pico de aborto UV a 395 nm en la fracción activa se correlacionó con picos en cromatogramas LCMS Q-ToF con ionización por electropulverización positiva y negativa consistente con la masa molecular de MBL-AB01. Después de obtener la estructura molecular correcta, la masa molecular se ha calculado en 551,061927. Los espectros se muestran en la figura 1.

Ejemplo 3: Caracterización del compuesto activo, MBL-AB01.

Marcaje de isótopos y determinación de la fórmula molecular

La fórmula molecular de MBL-AB01 se determinó mediante la producción en medios con compuestos etiquetados ¹³C, ¹⁵N o ¹³C y ¹⁵N. Las semillas se produjeron en un cultivo en dos etapas. Primero se inoculó MP127-igl7 en caldo de cultivo TSB suplementado con 50 % de agua de mar y se incubó durante 4 días, luego se reinoculó la semilla en medio *E. coli*-OD2 con etiquetado ¹³C, ¹⁵N o ¹³C + ¹⁵N de marchitamiento (Silantes) suplementado con agua de mar al 50 % e incubado durante 6 días. Las semillas se transfirieron a medios de producción con la siguiente composición: Medio *E. coli*-OD2 con etiquetado ¹³C, ¹⁵N o ¹³C + ¹⁵N de marchitamiento (Silantes); 537 ml/l, (NH₄)₂SO₄ sin etiquetar o etiquetado ¹⁵N; 0.34 g/l, MgSO₄ x 7H₂O; 0.17 g/l, CaCO₃; 2.1 g/l, KH₂PO₄; 0.086 g/l, glucosa sin etiquetar o etiquetada ¹³C; 10 g/l, TMS1 (Olga Sekurova Håvard Sletta 1999); 1.3 ml/l y se incubó durante 11 días. El cultivo se liofilizó, se extrajo con DMSO y se analizó como se describió anteriormente. La masa en modo negativo (M-H) de MBL-AB01 sin etiquetar, etiquetada ¹³C, etiquetada ¹⁵N y ¹³C y etiquetada ¹⁵N fue 550.05, 577.05, 551.05 y 578.14 respectivamente.

Por lo tanto, el aumento de la masa atómica debido al etiquetado ^{13}C y ^{15}N demuestra que MBL-AB01 tiene 27 carbonos y 1 nitrógeno.

Determinación de fórmula molecular y elucidación de estructura con FT-ICR

La caracterización de MBL-AB01 se realizó mediante infusión directa en un MS Bruker Solarix 12T FT ICR equipado con una fuente ESI. Los espectros de MS se registraron en modo ESI positivo y negativo. Los iones más abundantes en los espectros fueron aislados y fragmentados por CID. La calibración de masa se realizó externamente usando un estándar NaTFA. La muestra se diluyó en metanol/agua.

Se usó el software de análisis Bruker Compass Data para predecir posibles composiciones de fórmulas moleculares para los iones detectados. La predicción se realizó teniendo en cuenta la presencia de C, H, N, O para todos los iones. Además, otros elementos; S, Br, Cl, P, etc. se incluyeron en búsquedas en las que el patrón de isótopos sugería la presencia de otros átomos además de C, H, N y O. La predicción se realizó inicialmente con un error de masa de 2 ppm. Los patrones de isótopos teóricos de las fórmulas moleculares sugeridas se compararon con las señales en los espectros de MS. Los análisis HDX se realizaron diluyendo una muestra de MBL-AB01 en d_4 -metanol y los espectros CID se registraron después de 60, 120 min y 240 horas.

El patrón de isótopos muestra la presencia de Cl. La fórmula molecular se identificó como $\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{ClNO}_{10}$ y esta fórmula es consistente con los resultados del experimento de etiquetado de fermentación y la distribución isotópica observada con LC-QTOF y FT-ICR. Los experimentos de fragmentación muestran la pérdida de CO_2 seguido por agua del ion molecular sugerido. Los análisis HDX muestran la presencia de un máximo de 5 protones intercambiables.

Elucidación estructural con RMN

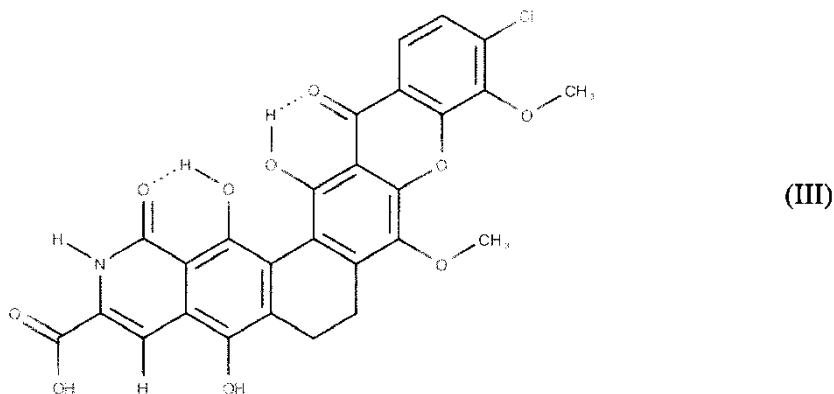
El objetivo fue identificar la estructura química de la molécula identificada como compuesto activo en el Ejemplo 2, con una masa de 551.061927 Da, y la fórmula química de $\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{ClNO}_{10}$. La xantolipina es la única molécula divulgada en el dominio público con esta fórmula química, pero los datos muestran claramente que MBL-AB01 no es idéntica a la xantolipina.

Se obtuvo un vial de 0.7 miligramos de MP127-igl7 purificada. El material sólido se almacenó a -18°C hasta que se realizaron los experimentos de RMN.

La muestra se disolvió en 120 μl de DMSO- d_6 en el vial. La solución se transfirió a una muestra de RMN de 3 mm, PN027-20-02. Se usaron 60 μl adicionales de DMSO- d_6 para enjuagar el vial y esta solución de lavado también se transfirió al tubo de RMN. El tubo se lavó con gas nitrógeno antes de colocar la tapa. Los experimentos de RMN se realizaron en el espectrómetro de 800 MHz con una criosonda TCO (bobina interna ^{13}C , es decir, optimizada para la detección de carbono).

La identificación del espectro ^1H reveló una muestra muy pura de MBL-AB01. La muestra se analizó más mediante una serie de espectros de RMN adicionales (ver figura 2).

La estructura propuesta de MBL-AB01 (ver fórmula III) está respaldada y es consistente con todos los datos de RMN y MS disponibles. La estructura también se considera razonable con respecto a los datos y publicaciones sobre rutas biosintéticas de compuestos relacionados (por ejemplo, xantolipina), así como totalmente realista desde una perspectiva de química orgánica general.



Ejemplo 4: Aislamiento del principio activo de cultivo bacteriano con 0.5 x agua de mar artificial

El cultivo de MP127-igl7 para la producción de MBL-AB01 se realizó en fermentadores Applicon de 3 litros con medio PM6_MOD3 de 1.65 litros en fermentación por lotes (La composición del medio PM6_MOD3 utilizado: almidón soluble

30 g/l; extracto de levadura 2 g/l ; licor de macerado de maíz 2.5 g/l; peptona 2.0 g/l; CaCO₃ 3.0 g/l). Las fermentaciones se realizaron durante 8 días a 25 °C con 0.25 vvm de aireación (flujo de volumen de gas por unidad de volumen de líquido por minuto) desde el inicio, luego se redujeron a 15 vvm para el resto del cultivo y agitación. El oxígeno disuelto estaba por encima del 30 %. Los cultivos de semillas para las fermentaciones se prepararon en matraces de agitación con deflectores de 500 ml con 100 ml de medio de caldo de triptona y soja (Oxoid).

La materia seca del caldo de fermentación PM6_MOD3 se recogió por centrifugación y luego se secó por congelación. A continuación, el polvo resultante se lavó con 50 ml de metanol/g de polvo y se extrajo dos veces con 5 y 10 ml de DMSO/g de polvo, respectivamente. Los dos extractos de DMSO se mezclaron y luego se liofilizaron. El extracto seco se resuspendió en una pequeña cantidad de DMSO y la materia no disuelta se eliminó por filtración.

El extracto se separó en un sistema HPLC Agilent con una columna Zorbax eclipse XBD-C18, 5 µm, 9.4 x 250 mm conectada a un detector de matriz de diodos y un colector de fracciones. Acetato de amonio 20 mM al que se añadió 0.4 ml de NH₃/l al 25 % [A] y metanol se utilizaron como fases móviles. La HPLC se ejecutó isocráticamente al 76 % [B] durante los primeros 7.5 min. De 7.6 a 9.0 min se aplicó 100 % [B]. El compuesto activo eluyó aproximadamente a los 5.5 min. Para evitar la degradación del compuesto, se añadió 0.01 x el volumen de fracción de 50 g/l de acetato de amonio pH=4 a cada uno de los viales colectores de fracciones antes del fraccionamiento. El compuesto activo de las fracciones se unió a una columna de fase sólida (60 mg Oasis HLB) que se acondicionó con metanol al 100 %, luego se añadió metanol al 76 %, 50 g/l de acetato de amonio al 0.1 %, pH 4. Después de unir el compuesto a la columna, la columna se lavó con 1.5 ml de metanol al 85 % pH=4, luego con 5 ml de metanol al 76 % pH=4. El compuesto se eluyó de la columna con metanol al que se añadió 0.1 % de 50 g/l de acetato de amonio pH=8. El metanol se eliminó en una centrífuga de vacío; al compuesto se le añadió agua y se liofilizó.

Ejemplo 5: Actividad antibacteriana in vitro (determinación de MIC) de MBL-AB01, una comparación con otros compuestos antimicrobianos conocidos.

MBL-AB01 se probó frente a un panel de patógenos Gram-negativos y Gram-positivos. Las CIM para todas las cepas bacterianas grampositivas y gramnegativas se determinaron mediante pruebas estandarizadas de microdilución utilizando caldo Mueller-Hinton (Acumedia). Inóculos bacterianos que contienen 5×10^5 Se incubaron UFC/ml durante 19 h a 35 °C en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico de acuerdo con los protocolos del Clinical and Laboratory Standards Institute. Las cepas bacterianas se obtuvieron de las colecciones de cultivos ATCC (American Type Culture Collection), NCTC (National Collection of Type Cultures) y CCUG (culture collection university of Göteborg Suecia).

Las CIM de MBL-AB01, que oscilaron entre menos de 0.032 y 0.5 µg/ml para la mayoría de las cepas grampositivas, fueron comparables o inferiores a las del antibiótico de referencia vancomicina, gentamicina, estreptomina y daptomicina (Tabla 1). MBL-AB01 también inhibió el crecimiento de cepas bacterianas resistentes a la vancomicina representadas por enterococo faecalis CCUG 37832 y E. faecium CTC 492, con una MIC de 0.25 y 0.5 µg/ml, respectivamente.

Tabla 1. Actividad antibacteriana in vitro del compuesto MBL-AB01 contra diferentes cepas bacterianas.

	MIC µg/ml				
	MBL-AB (+)01	Vancomicina	Gentamicina	Estreptomina	Daptomicina
E. faecalis CCUG 37832*	0.25	>16	16	>16	>16
E. faecalis CTC 492	0.5	1	16	>16	>16
M. lúteo, ATCC 9341	0.063	1	4	8	0.5
S. aureus ATCC 29213	<0.032	2	4	16	4
S. aureus ATCC 43300 (MRSA)	0.032	2	16	16	4
S. aureus NCTC 6571	0.032	2	4	16	4

*) Enterococcus faecium CCUG37832: aislado clínico multiresistente vanA positivo. Mic (µg/ml): Ampicilina (20), clortetraciclina (>10), eritromicina (>20), lincomicina (>10), vancomicina (>20), apramicina (>20), bacitracina (>8), cicloserina (>8), espectinomina (> 8), sensibilidad: Gramicidina (0.01)

Ejemplo 6: Determinación de citotoxicidad in vitro de MBL-AB01 y Xantolipin para células de fibroblastos IMR90

La citotoxicidad de MBL-AB01 y Xantolipina se evaluó en ensayos in vitro con célula de fibroblastos de pulmón humano IMR90 (ATCC CCL-186).

Se aisló MBL-AB01 como se describió en el ejemplo 5 anterior. La xantolipina se obtuvo de la Universidad Shaghai Jiao Tong, China. Se estableció una solución madre de xantolipina en metanol, y la concentración de la solución madre de xantolipina se correlacionó con MBL-AB01 sobre la base de la absorción UV/vis suponiendo que los compuestos tienen coeficientes de extinción similares a 395 nm.

Las células IMR90 se cultivaron en DMEM - glucosa baja (Sigma) complementado con L-Glutamina 2 mm, MEM NEAA al 1 % (Sigma), piruvato de sodio 1 mm, HEPES 10 mm y Pen-Strep 100 U/ml. Las células se subcultivaron dos o tres veces por semana en proporciones entre 1:2 y 1:8, dependiendo de la confluencia. El día anterior a la exposición de las células a los compuestos, 30 µl de suspensión celular con 1.2×10^5 Se sembraron células IMR90 por ml en placas de 384 pocillos (Corning Assay Plate, 3712) usando una estación de trabajo robótica Tecan EVO con unidad de pipeteo MCA384 usando puntas desechables (Tecan MCA 125 µl, 300 51 808). Las microplacas con suspensión celular se agitaron a 1600 rpm con 2.5 mm de amplitud (Bioshake) durante 20 segundos después de la siembra. La suspensión celular se transfirió a las microplacas desde un depósito agitado (Depósito base plana 300 ml 10723363) con barras agitadoras magnéticas estériles (15 x 4.5 mm VWR 442-4522) con agitación a 350 rpm colocadas en Tecan EVO. Las microplacas con las células IMR90 se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 %.

El día de la exposición de las células se realizaron diluciones en serie de MBL-AB01 y Xantolipina en DMSO. Las diluciones en serie con los compuestos se diluyeron más en medio de cultivo celular y se transfirieron a los pocillos de ensayo, dando una concentración total de DMSO en los pocillos de ensayo del 0.6 %.

Después de la exposición, las placas de ensayo con las células IMR90 se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas. La viabilidad de las células después de la incubación se midió utilizando el ensayo de viabilidad Promega CellTiter-GLO 2.0. Los valores de EC₅₀ para MBL-AB01 y xantolipina se estimaron en función de la viabilidad de las células expuestas en relación con la viabilidad de los pocillos de control con medio de cultivo añadido con una concentración similar de DMSO. El valor EC₅₀ de MBL-AB01 se estimó en 20 µg/ml y el valor EC₅₀ de xantolipina se estimó en 1 µg/ml para células IMR90 en este ensayo.

Depósito y soluciones expertas

El solicitante solicita que se deposite una muestra del microorganismo depositado en virtud del Tratado de Budapest con DSMZ el 7 de abril, 2016 bajo el número de depósito DSM 32287 sólo podrá ponerse a disposición de un experto, hasta la fecha en que se conceda la patente.

Referencias:

Behal, V. 2000. Productos bioactivos de *Streptomyces*. Avances en Microbiología Aplicada, Vol 47. 47:113-156.

Bennett, J. W. y R. Bentley. 1989. Qué hay en un nombre: metabolismo secundario microbiano. Adv Appl Microbiol. 34:1-28.

Bentley, SD, KF Chater, AM Cerdano-Tarraga, GL Challis, NR Thomson, KD James, DE Harris, MA Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, CW Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, CH Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O. 'Neil, E. Rabinowitsch, MA Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, BG Barrell, J. Parkhill y DA Hopwood. 2002. Secuencia completa del genoma del actinomiceto modelo *Streptomyces coelicolor* A3(2). Naturaleza 417:141-147.

Berge SM, Bighley LD, Monkhouse DC. Sales farmacéuticas. J Pharm Sci. 1977 enero;66(1):1-19.

Bode, H. B., B. Bethe, R. Hofs y A. Zeeck. 2002. Grandes efectos de pequeños cambios: posibles formas de explorar la diversidad química de la naturaleza. Proverbios 3: 619-627

Brautaset, Trygve; Borgos, Sven Even F.; Sletta, Havard; Ellingsen, Trond Erling; Zochev, Sergey. (2003) Mutagénesis específica del sitio y sustituciones de dominio en el módulo de carga de la policétido sintasa de nistatina y sus efectos sobre la síntesis de nistatina en *Streptomyces noursei*. Revista de Química Biológica. vol. 278.

Cragg, G. M., P. G. Grothaus y D. J. Newman. 2009. Impacto de los productos naturales en el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos. química Apocalipsis 109:3012-3043.

Fenical, W. y P. R. Jensen. 2006. Desarrollo de un nuevo recurso para el descubrimiento de fármacos: bacterias actinomicetos marinos. Nat. química Biol. 2:666-673.

Fischbach, M. A. y C. T. Walsh. 2006. Enzimología de línea de montaje para policétidos y antibióticos de péptidos no ribosómicos: lógica, maquinaria y mecanismos. química Apocalipsis 106:3468-3496.

Engelhardt, K., K.F. Degnes, M. Kemmler, H. Bredholt, E. Fjaervik, G. Klinkenberg, H. Sletta, T.E. Ellingsen y S. B. Zochev. 2010. Producción de un nuevo antibiótico tiopéptido, TP-1161, por una especie de *Nocardiopsis* marina. *Aplicación Environ Microb.* 76:4969-4976.

5 Illing, GT, I.D. Normansell y J.F. Peberdy. 1989. Aislamiento y regeneración de protoplastos en *Streptomyces clavuligerus*. *J. Gen. Microbiol.* 135:2289-2297.

Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK Metabolitos secundarios farmacéuticamente activos de actinobacterias marinas. *Res. microbiol.* abril de 2014, 169 (4): 262-78. doi: 10.1016/j.micres.2013.07.014.

10 Magarvey, N. A., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin y D. H. Sherman. 2004. Aislamiento y caracterización de nuevos taxones de actinomicetos de origen marino ricos en metabolitos bioactivos. *aplicación Alrededor de. Microbiol.* 70:7520-7529.

15 Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman y W. Fenical. 2002. Poblaciones generalizadas y persistentes de un importante taxón nuevo de actinomicetos marinos en sedimentos oceánicos. *aplicación Alrededor de. Microbiol.* 68:5005-5011.

20 elá'ez, F. 2006. La entrega histórica de antibióticos a partir de productos naturales microbianos: ¿puede repetirse la historia? *Bioquímica Farmacol.* 71:981-990.

Newman, D. J. y G. M. Cragg. 2007. Los productos naturales como fuentes de nuevos fármacos en los últimos 25 años. *J.Nat. Pinchar.* 70:461-477.

25 Peak KK, Duncan KE, Luna VA, King DS, McCarthy PJ, Cannons AC. Las cepas de *Bacillus* más estrechamente relacionadas con *Bacillus nealsonii* no están efectivamente circunscritas dentro de la definición de especie taxonómica. *Int J Microbiol.* 2011, 2011: 673136. doi: 10.1155/2011/673136. epub **2011** 20 de octubre

30 Riedlinger, J., A. Reicke, H. Zahner, B. Krismer, A. T. Bull, L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow, B. Bister, D. Bischoff, R. D. Sussmuth y H. P. Fiedler. 2004. Abisomicinas, inhibidores de la ruta del ácido para-aminobenzoico producidos por la cepa marina *Verrucospora* AB-18-032. *J. Antibiótico.* (Tokio) 57:271-279.

35 Sekurova, O, Sletta H, TEE, Valla S, Zotchev S. 1999. Clonación molecular y análisis de un locus de genes reguladores pleiotrópicos del productor de nistatina *Streptomyces noursei* ATCC11455. *Cartas de Microbiología FEMS.* 177, 297-304.

Thompson, C.J., J.M. Ward y D. A. Hopwood. 1980. Clonación de ADN en *Streptomyces*: genes de resistencia de especies productoras de antibióticos. *Naturaleza.* 286:525-527.

40 Wendt-Pienkowski, E., Y. Huang, J. Zhang, B. Li, H. Jiang, H. Kwon, C.R. Hutchinson y B. Shen. 2005. Clonación, secuenciación, análisis y expresión heteróloga del grupo de genes biosintéticos de frederamicina de *Streptomyces griseus*. *Mermelada. química Soc.* 127:16442-16452.

45 Zochev, Sergey. (2012) Los actinomicetos marinos como un recurso emergente para las líneas de desarrollo de fármacos. *Revista de Biotecnología.* vol. 158 (4).

Lista de secuencias

<110> MarBiLeads AS

50 <120> Nuevo compuesto antimicrobiano

<130> P24635PC00

55 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

60 <211> 1458

<212> ADN

65 <213> *Actinoalloteichus* sp.

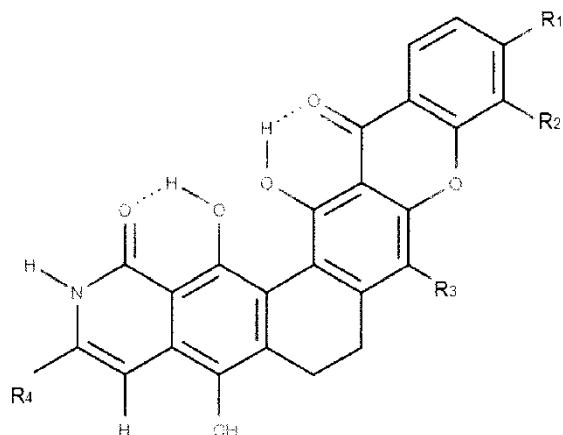
ES 2 909 248 T3

<400> 1

ggctcaggac gaacgctgcg gcgtgcttaa cacatgcaag tcgagcggta aggcccttcg	60
gggtacacga gcggcgaacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctgc actttggaat	120
aacctcgga aaccggggct aataccggat atgacatgtc atcgcatggt ggtgtgtgga	180
aagttccggc ggtgtgggat gggcccgcg cctatcagct tgttgggtgg gtgatggcct	240
accaaggcga cgacgggtag ccggcctgag agggcgaccg gccacactgg gactgagaca	300
cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg cgcaatgggc gaaagcctga	360
cgcagcgacg ccgcgtgagg gatgactgcc ttccgggttgt aaacctcttt cagcgccgaa	420
gaagcgaaag tgacggtagg cgcagaagaa gcaccggcta actacgtgcc agcagcccg	480
gtaatacgta gggcgcgagc gttgtccgga attattgggc gtaaagagct cgtaggcgg	540
ttgtcgcgtc ggctgtgaaa acctggggct taaccccggt cgtgcagtcg atacgggcag	600
acttgagttc ggcaggggag actggaattc ctggtgtagc ggtgaaatgc gcagatatca	660
ggaggaacac cgggtggcgaa ggcgggtctc tgggcccata ctgacgctga ggagcgaaag	720
cgtggggagc gaacaggatt agataccctg tagtccacgc cgtaaaccgt gggcgctagg	780
tgtgggggat ttccacgtcc tccgtgccgt agctaaccga ttaagcgccc cgcctgggga	840
gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacgag cggcgagca	900
tgtggattaa ttcatgcaa cgcgaagaac cttacctggg ttgacatgc accggacagc	960
ctcagagatg gggtttccgc aaggctcgtg tacagggtgt gcatggctgt cgtcagctcg	1020
tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccga cgcgcgaac ccttattcca tgttgccagc	1080
acgtaatggt ggggactcat gggagactgc cggggtcaac tcggaggaag gtggggacga	1140
cgtcaagtca tcatgccctt tatgtccagg gcttcacaca tgctacaatg gccggtacaa	1200
agggctgcta agccgtgagg tggagcgaat ccagaaagc cggctctcagt tcggatcggg	1260
gtctgcaact cgaccccggtg aagtcggagt cgtagtaat cgcagatcag caacgctgcg	1320
gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcacg tcacgaaagt cggtaacacc	1380
cgaagcccat ggcccaaccc gtgagggggg gagtggtcga aggtgggact ggcgattggg	1440
acgaagtcgt aacaaggt	1458

REIVINDICACIONES

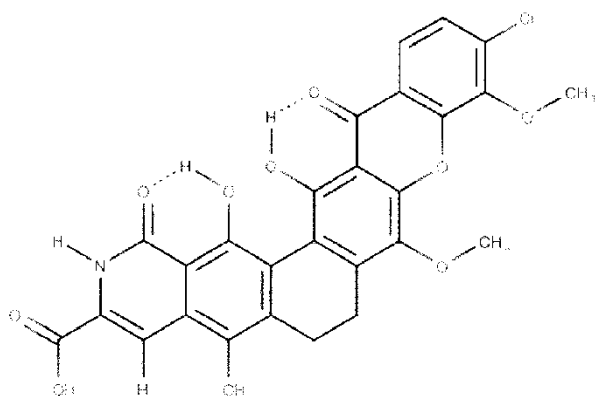
1. Un compuesto, que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula II



y sales y solvatos ed los mismos,

en el que R₁ es un átomo de halógeno, seleccionado de cloro, bromo y yodo, R₂ y R₃ es —O-CH₃, R₄ es -COOH, -C(O)OR₅ y —C(O)NR₅R₆, y R₅ y R₆ son independientemente un hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄, un grupo alquenilo C₂-C₄, un grupo alquinilo C₂-C₄ y un grupo fenilo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la estructura es de acuerdo con la fórmula III



(III)

y sales y solvatos de los mismos.

3. Un método para producir el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas:

a) cultivar una bacteria seleccionada del grupo que consta de:

i) un aislado bacteriano depositado bajo el Tratado de Budapest con DSMZ el 7 de abril, 2016 bajo el número de depósito DSM 32287; y

ii) una bacteria que está estrechamente relacionada con el aislado bacteriano de i) tal como una bacteria con características genotípicas y/o fenotípicas similares a la bacteria aislada;

en un medio de cultivo adecuado que comprende agua de mar;

b) extraer el compuesto del cultivo.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la bacteria comprende en su genoma un ARNr 16S que por transcripción inversa y síntesis de la segunda cadena proporciona una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia representada en SEQ ID NO 1.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que la etapa b) comprende la centrifugación de las bacterias cultivadas para obtener un sedimento celular, del que se extrae el compuesto.
- 5 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que el compuesto se extrae del sedimento celular utilizando dimetilsulfóxido (DMSO).
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que el medio de cultivo es PM6, opcionalmente con agua de mar artificial.
- 10 8. Uso de una bacteria aislada para producir el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la bacteria se selecciona del grupo que consiste en:
 - a) un aislado bacteriano depositado bajo el Tratado de Budapest con DSMZ el 7 de abril de 2016 bajo el número de depósito DSM 32287; y
 - 15 b) una bacteria que está estrechamente relacionada con el aislado bacteriano de a) tal como una bacteria con características genotípicas y/o fenotípicas similares a la bacteria aislada.
- 20 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la bacteria estrechamente relacionada comprende en su genoma un ARNr 16S que por transcripción inversa y síntesis de la segunda cadena proporciona una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia representada en SEQ ID NO 1.
- 25 10. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en terapia.
12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso como agente antimicrobiano.
- 30 13. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-12, para tratar una infección bacteriana en un sujeto, que comprende administrar el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 a dicho sujeto.
- 35 14. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la infección bacteriana está provocada por una bacteria resistente a múltiples fármacos.
15. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la infección bacteriana está provocada por una bacteria Gram-positiva o Gram-negativa.
- 40 16. Un método no médico para matar o inhibir el crecimiento de una bacteria, que comprende la etapa de poner el compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o la composición de acuerdo con la reivindicación 10 en contacto con la bacteria que se va a matar o inhibir.

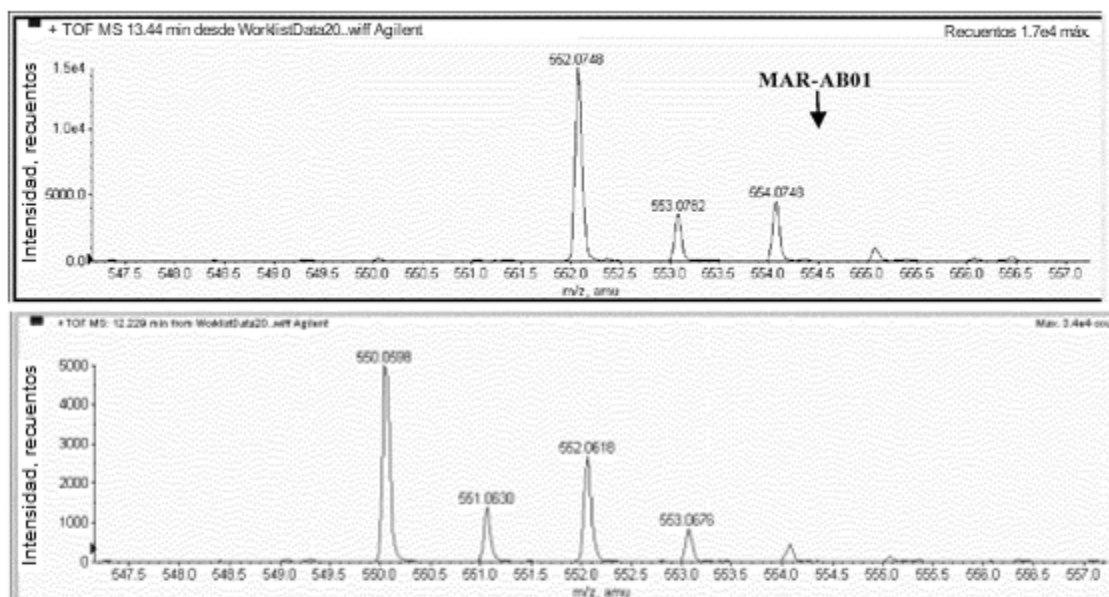
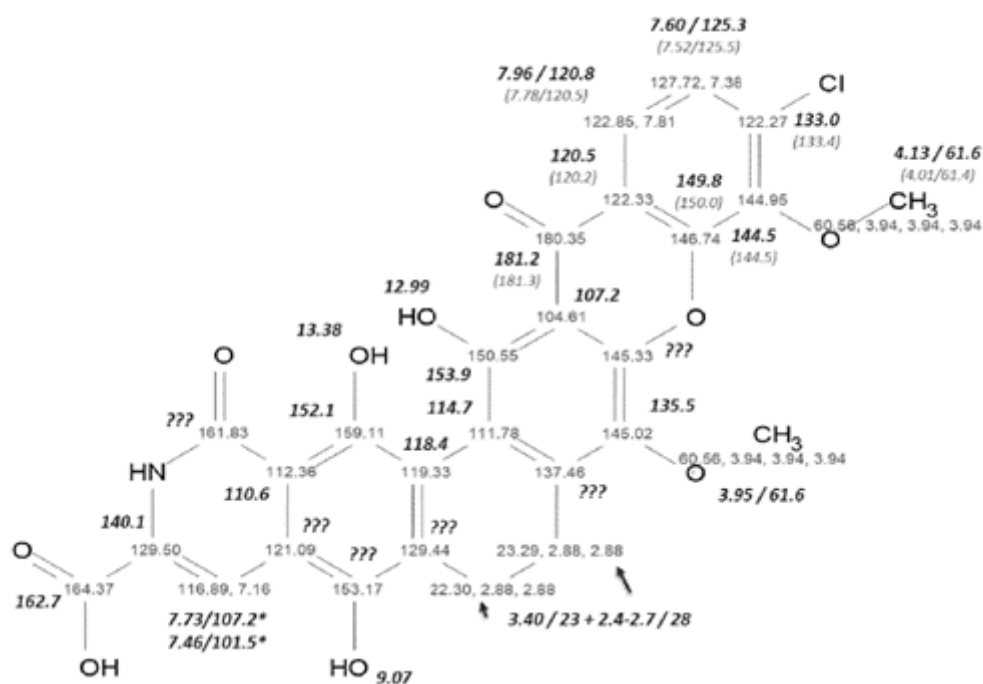


Figura 1: LC-DAD-isoplot (superior) y espectro MS en ESI+ (medio) y espectro MS de ESI- (inferior) de la fracción activa del extracto MP127-ig17 fraccionado en HPLC.



* dependiendo del pH

9.07 = desplazamientos químicos observados
 7.78/120.5 = desplazamientos químicos experimentales de Xantolipina
 Xxx = desplazamientos químicos predichos

Figura 2: RMN clave y datos de MS que respaldan la estructura og MBL-AB01