



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 783**

51 Int. Cl.:  
**C07K 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05802611 .3**

96 Fecha de presentación : **22.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1809655**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **Procedimiento para la preparación selectiva de fragmentos de lisobactina.**

30 Prioridad: **05.11.2004 DE 10 2004 053 409**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.06.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.06.2010**

73 Titular/es: **AiCuris GmbH & Co. KG.**  
**Friedrich-Ebert-Strasse 475**  
**42117 Wuppertal, DE**

72 Inventor/es: **Von Nussbaum, Franz;**  
**Schroder, Werner y**  
**Furstner, Chantal**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 340 783 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

Procedimiento para la preparación selectiva de fragmentos de lisobactina.

5 La invención se refiere a procedimientos para la preparación selectiva de derivados de lisobactina mediante modificaciones químicas y enzimáticas combinadas. Especialmente, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación del fragmento de lisobactina 4-11 mediante reducción química y disociación de los productos formados mediante quimotripsina.

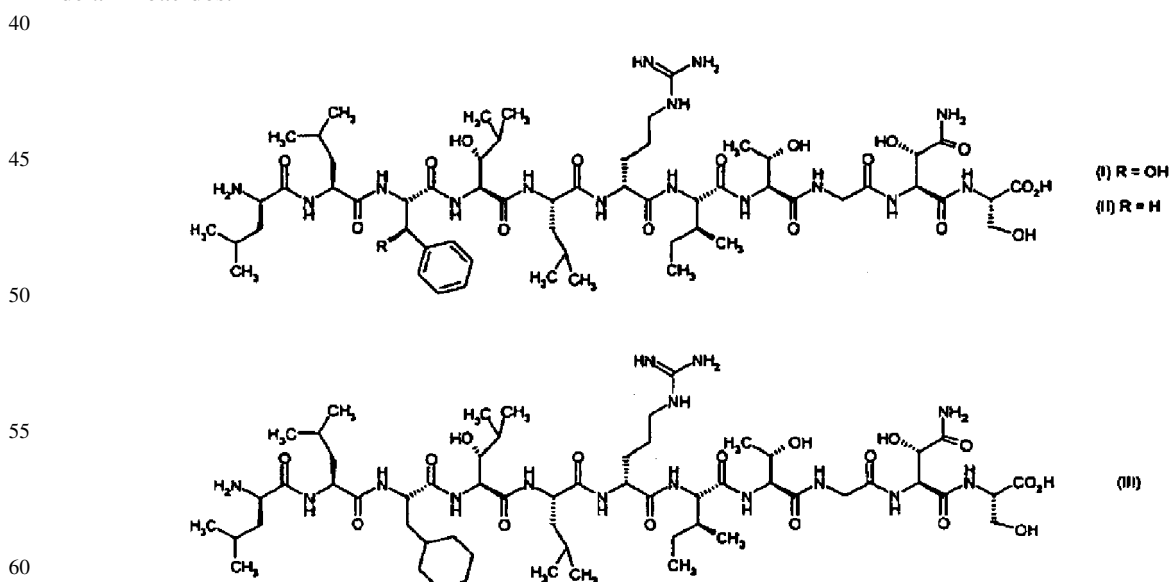
10 La lisobactina es un depsipéptido cíclico que procede de un programa de cribado para encontrar nuevos antibióticos que intervienen en la biosíntesis de paredes celulares bacterianas (O'Sullivan J. y col. (1988) J. Antibiot. 41 (12), 1740-1744 y Bonner, D. P. y col. (1988) J. Antibiot. 41 (12), 1745-1751; Tymiak, A. A. y col. (1989) J. Org. Chem. 54, 1149-1157). Muestra una alta eficacia frente a bacterias aerobias y anaerobias Gram-positivas. Es poco común el alto número de aminoácidos no proteinógenos en la molécula. Además de los tres  $\beta$ -hidroxiaminoácidos (2S,3R)- $\beta$ -hidroxi-leucina, 15 (2S,3R)- $\beta$ -hidroxi-fenilalanina y (2S,3S)- $\beta$ -hidroxi-asparagina, también se presentan los D-aminoácidos D-leucina y D-arginina, así como alo-treonina. Esta complejidad y el tamaño de la sustancia natural lisobactina representan una gran dificultad para modificaciones químicas selectivas.

20 Por tanto, un objetivo de la presente invención es poner a disposición procedimientos de síntesis nuevos y alternativos para la síntesis selectiva de fragmentos de lisobactina para la preparación de nuevos antibióticos usando fragmentos de lisobactina.

Una solución la ofrece la disociación enzimática selectiva, la preparación enzimática selectiva y la posterior unión de fragmentos de lisobactina en combinación con etapas de modificación química, por ejemplo, la hidrogenación.

25 Los experimentos de digestión enzimática de lisobactina y de la forma de cadena abierta obtenida mediante hidrólisis ("lisobactina de cadena abierta"; compuesto de fórmula (I)) con enzimas como pepsina, tripsina, quimotripsina y peptidasa mucosa no mostraron ninguna digestión (como, por ejemplo, en pepsina) o sólo una digestión enzimática insuficiente (R. A. Blackburn y col. (1993) Drug Metab. Dispos. 21(4), 573-579). Una disociación enzimática ineficiente muy lenta de la lisobactina sólo se produce después de la apertura del anillo mediante hidrólisis en el tampón usado. Esto conduce como reacción secundaria no deseada a una desamidación de las cadenas laterales en (2S,3S)- $\beta$ -hidroxi-asparagina. Es decir, la unidad de  $\beta$ -hidroxi-asparagina se convierte en una unidad de  $\beta$ -hidroxi-aspartato.

30 Se encontró sorprendentemente que el fragmento de lisobactina 4-11 puede prepararse con alta eficiencia y cuantitativamente mediante disociación enzimática con quimotripsina a partir de dihidro-lisobactina (compuesto de fórmula (II)) y octahidro-lisobactina (compuesto de fórmula (III)), así como a partir de una mezcla de ambos componentes. La disociación tiene lugar tan rápidamente que los fragmentos 1-3 y 4-11 se forman prácticamente después de la mezcla de los correactantes (sustrato y enzima). No tienen lugar reacciones secundarias no deseadas en las cadenas laterales de aminoácidos.



65 La dihidro-lisobactina y la octahidro-lisobactina se obtienen mediante apertura hidrogenolítica de lisobactina con hidrógeno convirtiéndose la unidad de (2S,3R)- $\beta$ -hidroxi-fenilalanina en una fenilalanina o unidad de 3-ciclohexilalanina. Los fragmentos de lisobactina formados dihidro-lisobactina y octahidro-lisobactina se usan luego para la digestión enzimática.

## ES 2 340 783 T3

Sorprendentemente, la dihidro-lisobactina y la octahidro-lisobactina también son buenos sustratos para otras enzimas de manera que mediante la elección de la enzima también pueden prepararse otros fragmentos con alto rendimiento.

5 Es objeto de la invención un procedimiento para la preparación de dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina en el que la lisobactina se convierte en dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina mediante apertura de anillo hidrogenolítica con hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación en un disolvente.

10 Los catalizadores de hidrogenación son, por ejemplo, catalizadores de paladio, rutenio, rodio, iridio y platino o níquel Raney. Estos catalizadores pueden usarse como sales (por ejemplo, dióxido de platino, cloruro de rodio (III)) o como catalizadores soportados (por ejemplo, paladio sobre carbón (del 5-30%) o rodio sobre carbón (del 5%)). Los materiales de soporte adecuados para catalizadores soportados son, por ejemplo, carbón activo, tierra de infusorios, gel de sílice, bentonita, caolín, piedra pómez, silicatos de aluminio u óxido de aluminio. El material de soporte preferido es carbón activo.

15 También pueden usarse catalizadores bimetálicos o bien catalizadores multicomponentes.

Se prefieren catalizadores de paladio, por ejemplo, paladio sobre carbón (del 5-30%), se prefiere especialmente paladio sobre carbón (del 10%).

20 La apertura de anillo hidrogenolítica se realiza en general en un disolvente, preferiblemente en un intervalo de temperatura de temperatura ambiente a 150°C, preferiblemente en un intervalo de temperatura de temperatura ambiente a 80°C, en un intervalo de presión normal de presión normal a 200 bar (20 MPa), preferiblemente en un intervalo de presión de 3 a 80 bar (0,3 a 8 MPa).

25 Los disolventes son, por ejemplo, alcoholes como metanol, etanol o isopropanol o mezclas de los alcoholes con agua, o ácido acético o disoluciones acuosas de ácido acético, o mezclas de THF-agua, o mezclas de dioxano-agua, o bien mezclas ternarias de los disolventes previamente mencionados, por ejemplo, isopropanol-agua-ácido acético. Se prefiere una mezcla de isopropanol-agua.

30 Otro objeto de la invención es un procedimiento para la preparación del fragmento de lisobactina 4-11 y el fragmento de lisobactina 1-3 en el que la dihidro-lisobactina y/o la octahidro-lisobactina se disocian enzimáticamente en el fragmento de lisobactina 4-11 y el fragmento de lisobactina 1-3.

35 Se prefiere una disociación enzimática de dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina usándose como enzima una serina proteasa eucariota o una serina proteasa microbiana.

40 Las serina proteasas eucariotas son, por ejemplo, quimotripsina, cathepsina G, quimasa u otras enzimas de la familia de las quimotripsinas u otras serina proteasas eucariotas que se disocian después de aminoácidos aromáticos, se prefiere la quimotripsina.

Las serina proteasas microbianas son, por ejemplo, subtilisina, proteinasa K, proteasa A de *Streptomyces* u otras enzimas que se disocian después de aminoácidos aromáticos, se prefiere la subtilisina.

45 La invención comprende además un procedimiento para la disociación enzimática de dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina en fragmentos de lisobactina más pequeños.

50 Otro objeto de la invención es correspondientemente un procedimiento para la preparación del fragmento de lisobactina 3-11 y/o fragmento de lisobactina 5-11 y/o fragmento de lisobactina 4-10 y/o fragmento de lisobactina 1-9, caracterizado porque la dihidro-lisobactina y/o la octahidro-lisobactina se disocian enzimáticamente para dar el fragmento de lisobactina 3-11 y/o el fragmento de lisobactina 5-11 y/o el fragmento de lisobactina 4-10 y/o el fragmento de lisobactina 1-9.

55 Se prefiere una disociación enzimática de dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina usándose como enzima una metaloproteasa o una cisteína proteasa.

Las metaloproteasas son, por ejemplo, termolisina o micolisina.

60 Las cisteína proteasas son, por ejemplo, papaína, bromelaína o ficina.

La disociación enzimática se realiza en general en un tampón de disociación acuoso con la adición de un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o acetonitrilo, preferiblemente en un intervalo de temperatura de 10°C a 40°C, preferiblemente en un intervalo de pH de 6 a 9 a presión normal.

65 Un tampón de disociación acuoso contiene, por ejemplo, hidrogenocarbonato de amonio y urea, o fosfato de sodio, cisteína y EDTA, o tetraborato de sodio, u otros aditivos con los que se cubre un intervalo de tamponamiento de pH 6 a 9, se prefiere el hidrogenocarbonato de amonio y la urea.

## ES 2 340 783 T3

El alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> es, por ejemplo, metanol, etanol o isopropanol, se prefiere el metanol.

La disociación enzimática tiene lugar con especial preferencia en un intervalo de temperatura de 30°C a 37°C.

5 La concentración de alcohol en el medio de reacción asciende a del 0% al 40%, preferiblemente del 10% al 15%.

La relación de enzima respecto a sustrato (dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina) asciende a 1:1 a 1:4000, preferiblemente a 1:25 a 1:100.

10 Otro objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de derivados de lisobactina que presenta las siguientes etapas, concretamente

- apertura de anillo hidrogenolítica de lisobactina con hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación en un disolvente para la formación de dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina,
- 15 - disociación enzimática de la dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina,
- unión de los fragmentos de lisobactina.

### 20 Descripción de las figuras

Fig. 1: Desarrollo temporal de una disociación enzimática preparativa con quimotripsina (Ejemplo 11). Superposición de diagramas de HPLC de una disociación enzimática preparativa con quimotripsina de una mezcla de dihidro- y octahidro-lisobactina. Las condiciones de separación son como se especifican en la descripción en el Ejemplo 30 (detección UV 210 nm).

Fig. 2: Desarrollo temporal de una disociación enzimática de octahidro-lisobactina con quimotripsina (Ejemplo 5). Superposición de diagramas de CZE de una disociación enzimática con quimotripsina de octahidro-lisobactina. Las condiciones de separación son como se especifican en la descripción en el Ejemplo 31 (detección UV 210 nm).

30

### Definiciones

Dihidro-lisobactina: D-Leu-Leu-Phe-Leu(OH)-Leu-D-Arg-Ile-*allo*-Thr-Gly-Asn(OH)-Ser

35 Octahidro-lisobactina: D-Leu-Leu-Ala(3-ciclohexil)-Leu(OH)-Leu-D-Arg-Ile-*allo*-Thr-Gly-Asn(OH)-Ser

Fragmento de lisobactina 4-11: Leu(OH)-Leu-D-Arg-Ile-*allo*-Thr-Gly-Asn(OH)-Ser

40 Fragmento de lisobactina 1-3: D-Leu-Leu-Phe o D-Leu-Leu-Ala(3-ciclohexilo)

A continuación se citan los procedimientos usados en el desarrollo de las reacciones químicas y enzimáticas y las caracterizaciones analíticas.

### 45 Ejemplos

#### Abreviaturas

atm	atmósfera (unidad de presión)
50 Ej.	ejemplo
CZE	electroforesis capilar de zona
55 DCI	ionización química directa (en EM)
DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
60 d.t.	del teórico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético (Ethylene Diamine Tetracetic Acid)
65 El	ionización por impacto electrónico (en EM)
ESI	ionización por electropulverización (en EM)

## ES 2 340 783 T3

	empr.	empresa
	h	hora(s)
5	HPLC	cromatografía líquida de alta presión, de alta resolución
	HR	alta resolución (High Resolution)
	conc.	concentrado
10	EM-CL	espectroscopía de masas acoplada a cromatografía de líquidos
	LLF	D-Leu-Leu-Phe
15	LL(3-ciclohexil)A	D-Leu-Leu-(3-ciclohexil)Ala
	min	minuto/minutos
	EM	espectroscopía de masas
20	neg.	negativa
	RMN	espectroscopía de resonancia magnética nuclear (nuclear magnetic resonance)
25	Pd	paladio
	Pd-C	paladio sobre carbón
	pos.	positiva
30	%	en porcentaje
	PTFE	politetrafluoroetileno
35	cuant.	cuantitativo
	RP-HPLC	HPLC en fase inversa
	TA	temperatura ambiente
40	R <sub>t</sub>	tiempo de retención (en HPLC)
	TFA	ácido trifluoroacético
45	TOF	tiempo de vuelo (time of flight)
	UV	ultravioleta
	Vis	visible (visible)
50	ac.	acuoso

### Bibliografía

55 Para la nomenclatura de péptidos y ciclodepsipéptidos véanse:

1. A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds (Recommendations 1993), 1993, *Blackwell Scientific publications*.

60 2. Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, UK. *Biochemical Journal* 1984, 219,345-373, así como la bibliografía citada.

### *Procedimientos generales de EM-CL, EM-HR y HPLC*

65 *Procedimiento 1 (EM-CL):* tipo de instrumento de EM: Micromass ZQ; tipo de instrumento de HPLC: HP 1100 Series; UV DAD; columna: Phenomenex Synergi 2  $\mu$  Hydro-RP Mercury 20 mm x 4 mm; eluyente A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50%, eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50%; gradiente: 0,0 min

## ES 2 340 783 T3

90% de A → 2,5 min 30% de A → 3,0 min 5% de A → 4,5 min 5% de A; flujo: 0,0 min 1 ml/min, 2,5 min/3,0 min/4,5 min 2 ml/min; horno: 50°C; detección UV: 210 nm.

5 *Procedimiento 2 (HPLC preparativa; Symmetry; ácido trifluoroacético)*: instrumento: Gilson Abimed HPLC; detector UV 210 nm; sistema de bombeo binario; columna: SymmetryPrep™C<sub>18</sub>, empresa Waters, 7 μm; 300 x 19 mm; eluyente A: 0,05% de ácido trifluoroacético en agua, eluyente B: 0,05% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo; gradiente: 0-5 min 5% de B con velocidad de flujo 20 ml/min, 5-30 min rampa de gradiente del 5 al 60% de B con los siguientes aumentos de la velocidad de flujo: 22 ml/min a partir de 6 min, 23 ml/min a partir de 10 min, 24 ml/min a partir de 15 min; 30-35 min rampa de gradiente del 60% al 98% de B con reducción de la velocidad de flujo a 21 ml/min a partir de 38 min; 40-45 min 10% de B.

15 *Procedimiento 3 (procedimiento para la separación preparativa de dihidro- y octahidro-lisobactina mediante HPLC)*: columna: SymmetryPrep™C<sub>18</sub>, empresa Waters, 7 μm 300 x 19 mm; flujo 25 ml/min; TA; eluyente A: 0,2% de TFA en agua, eluyente B: acetonitrilo, 0-10 min gradiente: 80% de A, 20% de B al 35% de A, 65% de B; 10,01-15 min: 80% de A, 20% de B; detección 210 nm. Las fracciones se controlan mediante EM-CL (Procedimiento 1), se liberan del acetonitrilo en el rotavapor y se liofilizan.

20 *Procedimiento 4 (HPLC analítica 1100, ZQ2, Phenomenex, Synergi, Hydro-RP)*: tipo de instrumento de HPLC: HP 1100 Series; UV DAD; columna: empresa Phenomenex, MercuryMS, Synergi 2 μ Hydro-RP 20 x 4 mm; eluyente A: agua/0,05% de ácido fórmico, eluyente B: acetonitrilo; gradiente: 0,0-2,5 min, 90-30% de A, flujo 1-2 ml/min, 2,5-3,0 min, 30-5% de A, flujo 2,0 ml/min, 3,0-4,5 min, 5% de A; horno: 50°C; detección UV: 210 nm.

25 *Procedimiento 5 (EM-HR-TOF)*: los espectros de EM-HR-ESI+-TOF se registran con un instrumento Micromass LCT (tensión del capilar: 3,2 KV, tensión del cono: 42 V, temperatura de la fuente: 120°C, temperatura de desolvatación: 280°C). Para esto se usa una bomba de jeringa (empr. Harvard Apparatus) para la introducción de muestras. Como patrón sirve leucina-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu).

30 *Procedimiento 6 (HPLC)*: tipo de instrumento de HPLC: HP 1100 Series; columna UV DAD: Zorbax Eclipse XBD-C8 (Agilent), 150 mm x 4,6 mm, 5 μm; eluyente A: 5 ml de HClO<sub>4</sub>/I de agua, eluyente B: acetonitrilo; gradiente: 0-1 min 10% de B, 1-4 min 10-90% de B, 4-5 min 90% de B; flujo: 2,0 ml/min; horno: 30°C; detección UV: 210 y 254 nm.

35 *Procedimiento 7 (HPLC)*: columna: Kromasil RP-18, 60 mm x 2 mm, 3,5 μm; eluyente A: 5 ml de HClO<sub>4</sub>/I de agua, eluyente B: acetonitrilo; gradiente: 0 min 2% de B, 0,5 min 2% de B, 4,5 min 90% de B, 9 min 90% de B; flujo: 0,75 ml/min; horno: 30°C; detección UV: 210 nm.

40 *Procedimiento 8 (HPLC)*: columna: Kromasil RP-18, 250 mm x 4 mm, 5 μm; eluyente A: 5 ml de HClO<sub>4</sub>/I de agua, eluyente B: acetonitrilo; gradiente: 0 min 5% de B, 10 min 95% de B; flujo: 1 ml/min; horno: 40°C; detección UV: 210 nm.

45 *Procedimiento 9 (HPLC)*: columna: Kromasil RP-18, 250 mm x 4 mm, 5 μm; eluyente A: 2 ml de HClO<sub>4</sub>/I de agua, eluyente B: acetonitrilo; isocráticamente: 45% de B, 55% de A; flujo: 1 ml/min; horno: 40°C; detección UV: 210 nm.

50 *Procedimiento 10 (HPLC)*: instrumento: Agilent 1100 con DAD (G1315B), bomba binaria (G1312A), inyector automático (G1313A), desgasificador de disolvente (G1379A) y termostato de columna (G1316A); columna: Agilent Eclipse XDB-C8 4,6 x 150 x 5 mm; temperatura de columna: 40°C; eluyente A: 0,05% de ácido perclórico al 70% en agua; eluyente B: metanol; flujo: 2,00 ml/min; isocráticamente: 0-7 min 55% de B.

55 *Procedimiento 11 (HPLC)*: procedimiento de HPLC analítica disociación con bromelaina/quimotripsina. Se cromatografía aproximadamente 20 μg del producto de disociación enzimática o de los compuestos de partida en una columna 300SB-C18 (4,6 mm x 125 mm; material de 3,5 μm; diámetro de poro de 300 Angström). Como eluyente se usa un gradiente de acetonitrilo/TFA. Eluyente A: 0,1% de TFA en agua, eluyente B: 0,1% de TFA en 60% de acetonitrilo/40% de agua; gradiente: 0 min 0% de B, 2 min 10% de B, 50 min 80% de B, 52 min 100% de B, 55 min 0% de B, 60 min 0% de B; flujo: 0,7 ml/min; temperatura de la columna: 40°C; detección: 210 nm.

*Caracterización química de proteínas de dihidro-, octahidro-lisobactina y de los productos de disociación enzimática*

### *Instrumentos*

60 Los análisis de secuencias se realizan con un secuenciador de proteínas Procise™ de la empr. Applied Biosystems. Se usa el programa de secuenciación estándar. El secuenciador, los distintos programas de secuenciación, así como el sistema de detección de PTH se describen en detalle en el manual de usuario User's Manual Set, Protein Sequencing System Procise™ (1994), Applied Biosystems Forster City, CA 94404, EE.UU.

65 Los reactivos para el funcionamiento del secuenciador y la columna de HPLC para la detección de PTH se compran en Applied Biosystems.

## ES 2 340 783 T3

Los análisis de HPLC se realizan con un sistema de HPLC HP1100 de Agilent. Para las separaciones se usa una columna Zorbax 300SB-C18 (4,6 mm x 150 mm; material de 3,5  $\mu\text{m}$ ; diámetro de poro de 300 Angström) de Agilent (D-Waldbronn).

5 Los reactivos usados son de calidad para HPLC y se compran en Merck (D-Darmstadt).

La electroforesis capilar modelo 270A-HT es de Applied Biosystems. Las muestras se inyectan generalmente hidrodinámicamente durante distintos intervalos de tiempo. La columna capilar usada (50  $\mu\text{m}$  de diámetro x 72 cm de longitud) es de Applied Biosystems. Los programas de separación y el funcionamiento del analizador se describen detalladamente en el manual de usuario del instrumento (User's manual capillary electrophoresis system model 270A HT; Applied Biosystems Forster City, CA 94404, EE.UU.; 1989).

Los reactivos usados son de calidad bioquímica y se compran en Merck (D-Darmstadt) o Sigma (D-Deisenhofen).

15 Los análisis de aminoácidos se realizan con un analizador de aminoácidos LC3000 de Eppendorf/Biotronik. Se usa un programa de separación estándar ligeramente modificado de Eppendorf/Biotronik. Los programas de separación y el funcionamiento del analizador se describen detalladamente en el manual de usuario del instrumento (Handbuch des Aminosäureanalysators LC 3000, Wissenschaftliche Geräte GmbH Biotronik, Maintal, 1996).

20 Los reactivos usados son de calidad bioquímica y se compran en Merck (D-Darmstadt), Fluka (D-Neu-Ulm) o Sigma (D-Deisenhofen).

Los pesos moleculares se determinan con un sistema ZQ-1 de Micromass (Manchester, RU). Los fragmentos se separan a este respecto mediante cromatografía RP-18-HPLC (sistema HP1100) y el peso molecular se determina mediante ionización por electropulverización (ESI). Se realiza un calibrado externo. El calibrado y el funcionamiento del sistema se describen detalladamente en el manual de usuario del instrumento.

Las enzimas y productos químicos usados son de calidad bioquímica y se compran en las empresas Fluka, Calbiochem (D-Heidelberg) y Sigma.

30 El material para la cromatografía preparativa Source 15RPC se compra en Amersham Bioscience (D-Friburgo). La separación preparativa se realiza con un sistema ÄKTA™ de Amersham Bioscience.

Los compuestos químicos mencionados en la invención también pueden presentarse en forma de sales, solvatos o solvatos de las sales.

Como *sales* se prefieren en el marco de la presente invención sales fisiológicamente inocuas de los compuestos que pueden prepararse o usarse según la invención. Pero también están comprendidas sales que por sí mismas no son adecuadas para aplicaciones farmacéuticas pero pueden usarse, por ejemplo, para el aislamiento o la purificación de los compuestos que pueden prepararse o usarse según la invención o sales mixtas.

Las sales fisiológicamente inocuas de los compuestos que pueden prepararse o usarse según la invención comprenden sales de adición de ácido de ácidos minerales, ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido benzoico.

Las sales fisiológicamente inocuas de los compuestos que pueden prepararse o usarse según la invención también comprenden sales de bases habituales como a modo de ejemplo y preferiblemente sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio y potasio), sales alcalinotérreas (por ejemplo, sales de calcio y magnesio) y sales de amonio derivadas de amoniaco o aminas orgánicas con 1 a 16 átomos de C como a modo de ejemplo y preferiblemente etilamina, dietilamina, trietilamina, etildiisopropilamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, dicitlohexilamina, dimetilaminoetanol, procaína, dibencilamina, N-metilmorfolina, arginina, lisina, etilendiamina y N-metilpiperidina.

55 Como *solvatos* se denominan en el marco de la invención aquellas formas de los compuestos que pueden prepararse o usarse según la invención que en estado sólido o líquido forman un complejo mediante coordinación con moléculas de disolvente. Los hidratos son una forma especial de los solvatos en los que la coordinación se realiza con agua.

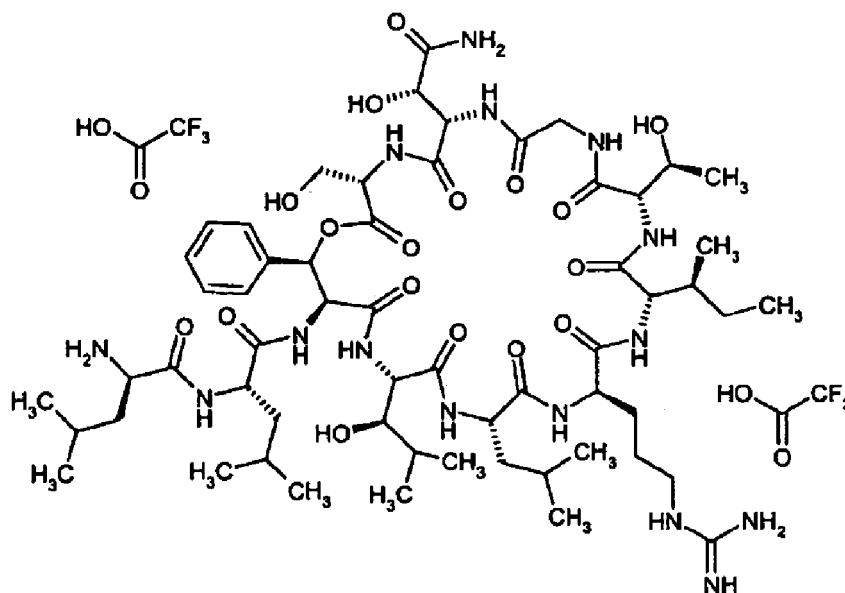
60

65

## Ejemplo 1

Bistrifluoroacetato de D-leucil-N<sup>1</sup>-{(3S,6S,12S,15S,18R,21S,24S,27S,28R)-6-[(1S)-2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil]-18-(3-[[amino(imino)metil]amino]propil)-12-[(1S)-1-hidroxietil]-3-(hidroximetil)-24-[(1R)-1-hidroxi-2-metilpropil]-21-isobutil-15-[(1S)-1-metilpropil]-2,5,8,11,14,17,20,23,26-nonaixo-28-fenil-1-oxa-4,7,10,13,16,19,22,25-octaazaclooctacosan-27-il)-L-leucinamida

Bistrifluoroacetato de {D-leucil-L-leucil-[(3R)-3-hidroxi-L-fenilalanil]}-[(3R)-3-hidroxi-L-leucil]-L-leucil-D-arginil-L-isoleucil-L-alotreonil-glicil-[(3S)-3-hidroxi-L-asparaginil]-L-serin-C<sup>1,11</sup>-O<sup>3,3</sup>-lactona (lisobactina)



## Fermentación

*Medio de cultivo:*

**YM:** agar de levadura-malta: D-glucosa (4 g/l), extracto de levadura (4 g/l), extracto de malta (10 g/l), 1 litro de agua con Lewatit. Antes de la esterilización (20 minutos a 121°C) se ajusta el pH a 7,2.

**HPM:** manitol (5,4 g/l), extracto de levadura (5 g/l), peptona de carne (3 g/l).

Conserva de trabajo: la cepa liofilizada (ATCC 53042) se cultiva en 50 ml de medio YM.

**Fermentación en matraz:** se inoculan 150 ml de medio YM o 100 ml de medio HPM en un matraz Erlenmeyer de 1 l con 2 ml de la conserva de trabajo y se dejan crecer durante 30-48 horas a 28°C en un agitador a 240 rpm.

**Fermentación de 30 l:** 300 ml de la fermentación en matraz (medio HPM) se usan para inocular una disolución de medio nutriente de 30 l estéril (1 ml de Antifoam SAG 5693/1). Este cultivo se deja crecer durante 21 horas a 28°C, 300 rpm y una aireación con aire estéril de 0,3 vvm. El pH se mantiene constante con ácido clorhídrico 1 M a pH = 7,2. En total, durante el tiempo de cultivo se añaden 880 ml de ácido clorhídrico 1 M.

**Cultivo principal (200 l):** se inoculan 15 x 150 ml de medio YM en matraces Erlenmeyer de 1 l con 2 ml de la conserva de trabajo y se dejan crecer a 28°C durante 48 horas y 240 rpm en el agitador. 2250 ml de este cultivo se usan para inocular una disolución de medio nutriente de 200 l estéril (YM) (1 ml de Antifoam SAG 5693/1) y se dejan crecer durante 18,5 horas a 28°C, 150 rpm y una aireación con aire estéril de 0,3 vvm.

Para controlar el desarrollo de la fermentación, cada hora se sacan muestras (50 ml). 2 ml de este caldo de cultivo se mezclan con 1 ml de metanol (ácido trifluoroacético al 0,5%) y se filtran a través de un filtro de 0,45 μm. 30 μl de esta suspensión se analizan mediante HPLC (Procedimiento 6 y Procedimiento 7).

Después de 18,5 horas, el caldo de cultivo del cultivo principal se separa a 17000 rpm en sobrenadante y sedimento.

*Aislamiento:*

**El sobrenadante** (183 l) se ajusta a pH 6,5 a 7 con ácido trifluoroacético concentrado o solución cáustica y se aplica a una columna Lewapol (OC 1064, contenido de 60 l). A continuación se eluye con agua pura, agua/metanol 1:1 y a

## ES 2 340 783 T3

continuación con metanol puro (con ácido trifluoroacético al 0,1%). Esta fase orgánica se concentra a vacío hasta dar un resto acuoso restante de 11,5 l.

La fase acuosa restante se une a gel de sílice C<sub>18</sub> y se separa (MPLC, Biotage Flash 75, 75 x 30 cm, KP-C18-WP, 15-20 μm, flujo: 30 ml; eluyente: acetonitrilo/agua con ácido trifluoroacético al 0,1%; gradiente: 10%, 15% y 40% de acetonitrilo). La fase de 40% de acetonitrilo, que contiene la cantidad principal del Ejemplo 1A, se concentra a vacío y a continuación se liofiliza (aproximadamente 13 g). Esta mezcla de sólidos se separa inicialmente en porciones de 1,2 g en una HPLC preparativa (Procedimiento 1), a continuación mediante filtración en gel en Sephadex LH-20 (5 x 70 cm, acetonitrilo/agua 1:1, respectivamente con ácido trifluoroacético al 0,05%) y otra HPLC preparativa (Procedimiento 8).

Este proceso proporciona 2250 mg del Ejemplo 1.

El sedimento se recoge en 4 l de acetona/agua 4:1, se mezcla con 2 kg de Celite, se ajusta a pH = 6 con ácido trifluoroacético, se agita y se centrifuga. El disolvente se concentra a vacío y el residuo se liofiliza. El liofilizado obtenido (89,9 g) se recoge en metanol, se filtra, se concentra y se separa en gel de sílice (Procedimiento 9). El Ejemplo 1A se purifica después mediante filtración en gel (Sephadex LH-20, 5 x 68 cm, agua/acetonitrilo 9:1 (con ácido trifluoroacético al 0,05%), flujo: 2,7 ml/min. Tamaño de fracciones 13,5 ml) para dar la sustancia pura. Este proceso proporciona 447 mg del Ejemplo 1.

HPLC (Procedimiento 6): R<sub>t</sub> = 6,19 min

EM (ESIpos): m/z = 1277 [M+H]<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 0,75 (d, 3H), 0,78 (d, 6H), 0,80 (t, 3H), 0,82 (d, 3H), 0,90 (d, 3H), 0,91 (d, 3H), 0,92 (d, 3H), 0,95 (d, 3H), 0,96 (d, 3H), 1,05 (m, 1H), 1,19 (d, 3H), 1,25 (m, 2H), 1,50 (m, 4H), 1,51 (m, 2H), 1,55 (m, 1H), 1,61 (m, 1H), 1,65 (m, 1H), 1,65 (m, 1H), 1,84 (m, 1H), 1,85 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 1,89 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 2,75 (m, 2H), 3,40 (m, 1H), 3,52 (m, 2H), 3,53 (dd, 1H), 3,64 (m, 2H), 3,66 (m, 1H), 3,68 (dd, 1H), 3,73 (m, 2H), 4,00 (dd, 1H), 4,02 (a, 1H), 4,13 (a, 1H), 4,32 (dd, 1H), 4,39 (t, 1H), 4,55 (m, 1H), 4,75 (dd, 1H), 5,19 (t, 1H), 5,29 (d, 1H), 5,30 (a, 1H), 5,58 (m, 2H), 6,68 (m, 3H), 6,89 (d, 1H), 6,93 (m, 3H), 6,94 (a, 1H), 6,98 (d, 1H), 7,12 (a, 1H), 7,20 (a, 2H), 7,23 (m, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,54 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 8,32 (a, 1H), 9,18 (a, 1H), 9,20 (m, 2H), 9,50 (a, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (125,77 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 10,3, 15,3, 19,0, 19,2, 19,6, 20,0, 20,9, 22,0, 22,4, 23,0, 23,2, 24,3, 24,4, 25,0, 25,4, 26,0, 27,8, 30,9, 35,4, 39,5, 40,8, 40,9, 41,6, 44,1, 51,5, 52,7, 55,9, 56,2, 56,4, 57,9, 58,8, 60,2, 61,1, 62,6, 70,1, 71,6, 71,7, 75,5, 128,1, 128,6, 136,7, 156,8, 168,2, 170,1, 170,4, 171,2, 171,5, 171,9, 172,2, 172,4, 173,7.

La asignación de las señales se realizó según la asignación descrita en la bibliografía (T. Kato, H. Hino, Y. Terui, J. Antibiot., 1988, 61, 719-725).

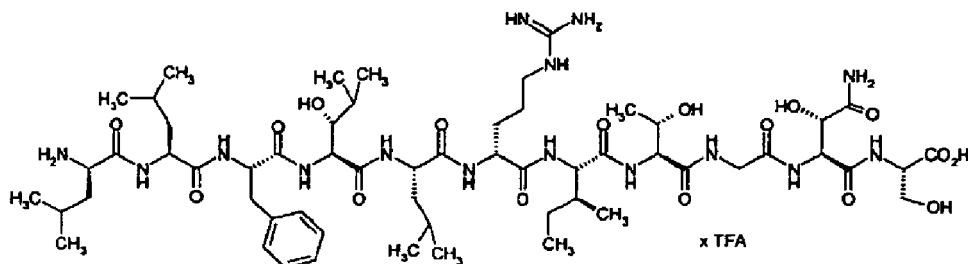
### Ejemplo 2 y Ejemplo 3

Trifluoroacetato de D-Leu-Leu-Phe-[(3R)-Leu(3-OH)]-Leu-D-Arg-Ile-aThr-Gly-[(3S)-3-Asn(3-OH)]-Ser (dihidro-lisobactina)

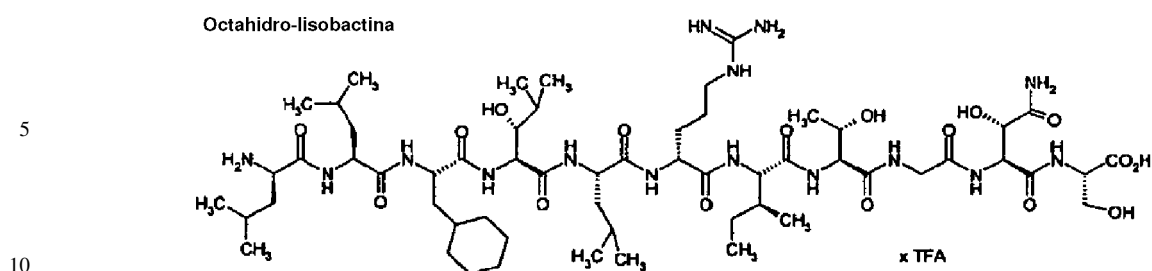
y

Trifluoroacetato de D-Leu-Leu-Ala(3-ciclohexil)-[(3R)-Leu(3-OH)]-Leu-D-Arg-Ile-aThr-Gly-[(3S)-3-Asn(3-OH)]-Ser (octahidro-lisobactina)

Dihidro-lisobactina



## ES 2 340 783 T3



### Procedimiento de hidrogenación 1

Se disuelve el compuesto del Ejemplo 1 (lisobactina, 250 mg, 170 pmol) en isopropanol/agua (2:1, 60 ml) y se hidrogena en presencia de 200 mg de Pd (10% sobre carbón) a 1 atm (0,1 MPa) de hidrógeno. El desarrollo de la reacción se sigue mediante EM-CL (Procedimiento 1). Después de la conversión casi completa (>95%), el catalizador se separa por filtración, se lava con isopropanol y el filtrado se liofiliza. En este producto bruto, los productos se distribuyen según EM-CL del siguiente modo: dihidro-lisobactina aproximadamente el 74%, octahidro-lisobactina aproximadamente el 12%. El residuo se purifica por HPLC (Procedimiento 2). Después de la liofilización de las fracciones adecuadas se obtiene el compuesto puro Ejemplo 2 (81,5 mg, 31% d.t.).

EM-CL: (Procedimiento 1):  $R_t = 1,56$  min ES+:  $m/z = 1279$   $[M + H]^+$ ,  $640,1$   $[M + 2H]^{2+}$ ; ES<sup>-</sup>:  $m/z = 1277$   $[M - H]^-$ ,  $638,1$   $[M - 2H]^{2-}$ .

Véase la Tabla 1 para secuencias de péptidos de la hidro-lisobactina.

### Procedimiento de hidrogenación 2

Con hidrogenación a presión de hidrógeno de 3 atm (0,3 MPa), en el procedimiento por lo demás idéntico al Procedimiento de hidrogenación 1 se obtiene la siguiente distribución determinada por EM-CL en el producto bruto: dihidro-lisobactina aproximadamente el 80%, octahidro-lisobactina aproximadamente el 17%. Después de la purificación por HPLC (Procedimiento 2) se obtiene el compuesto puro Ejemplo 2 (86 mg, 33% d.t.).

### Procedimiento de hidrogenación 3

Con un periodo de hidrogenación prolongado a 3 bar (0,3 MPa) de hidrógeno o con más presión (hasta 80 bar (8 MPa) de presión de hidrógeno) puede obtenerse proporcionalmente más octahidro-lisobactina. En la mayoría de los casos, las mezclas brutas de dihidro- y octahidro-lisobactina no se separan, sino que se usan directamente en la disociación enzimática.

### Procedimiento de hidrogenación 4

En el siguiente caso, el compuesto octahidro-lisobactina también se aísla en forma pura.

Se disuelve lisobactina (Ejemplo 1, 1,04 g, 0,69 mmol) en isopropanol/agua (2:1, 90 ml) y se hidrogena en presencia de 200 mg de Pd (10% sobre carbón) a 3 atm (0,3 MPa) de hidrógeno durante 7 días. El catalizador se separa por filtración, se lava con isopropanol y el filtrado se libera del isopropanol en rotavapor y luego se liofiliza. En este producto bruto, los productos se distribuyen según EM-CL (Procedimiento 1) del siguiente modo: dihidro-lisobactina aproximadamente el 65%, octahidro-lisobactina aproximadamente el 35%. El residuo se purifica por HPLC (Procedimiento 2, a continuación Procedimiento 3). Se obtienen dihidro-lisobactina (Ejemplo 2) (280 mg, 27% d.t.) y octahidro-lisobactina (Ejemplo 3) (212 mg, 20% d.t.).

EM-CL: (Procedimiento 1):  $R_t = 1,63$  min ES Ips.:  $m/z = 643,3$  (100)  $[M + 2H]^{2+}$ ; ES Ineg.:  $m/z = 1283$   $[M - H]^-$ ,  $641,2$   $[M - 2H]^{2-}$ .

### Procedimiento de hidrogenación 5

Como ejemplo de una hidrogenación a alta presión de hidrógeno, después de 4 días a 40°C y 50 bar (5 MPa) de hidrógeno se obtiene la siguiente mezcla bruta según EM-CL (Procedimiento 1): 45% de dihidro-lisobactina y 45% de octahidro-lisobactina.

### Procedimiento de hidrogenación 6

Se disuelve bistrifluoroacetato de lisobactina (Ejemplo 1, 500 mg, 0,33 mmol) en isopropanol/agua 2:1 (30 ml). Bajo atmósfera protectora de argón se añade el 10% de paladio sobre carbón (100 mg). La mezcla de reacción se agita (después de la desgasificación) en un autoclave a presión a 80-70 bar (8-7 MPa) de hidrógeno y se agita a TA durante 48 h. Para la reacción se añade de nuevo 10% de paladio sobre carbón (100 mg). La mezcla de reacción se

## ES 2 340 783 T3

agita de nuevo (después de la desgasificación) en un autoclave a presión a 80-70 bar (8-7 MPa) de hidrógeno y se agita a TA durante 48 h. Ahora ya no puede detectarse más lisobactina mediante HPLC (por ejemplo, Procedimiento 4). La mezcla de reacción se filtra a través de una frita de vidrio (tamaño de poro de 2 ó 3), se concentra a vacío, de nuevo se recoge en metanol/0,2% de ácido acético glacial, se filtra a través de un filtro de jeringa (empr. Biotage, PTFE), se concentra a vacío y se seca a alto vacío. Se obtienen 496 mg (cuant.) de producto (80% de dihidro-lisobactina, 20% de octahidro-lisobactina).

### Procedimiento de hidrogenación 7

Se hidrogena monoacetato de monotrifluoroacetato de lisobactina (5 mg, 3,45  $\mu$ mol) en una mezcla de isopropanol (2 ml), agua (0,25 ml) y ácido acético (0,05 ml) en presencia de dióxido de platino (20 mg) a 80 bar (8 MPa) y 50°C. Después de 17 h, la presión se alivia, se ventila con argón y la suspensión se libera del catalizador mediante microfiltros. El análisis de EM-CL del filtrado (Procedimiento 4) muestra el 7% d.t. de octahidro-lisobactina ( $R_t = 1,54$  min, Procedimiento 4).

### Procedimiento de hidrogenación 8

Se disuelve bistrifluoroacetato de lisobactina (Ejemplo 1A, 10 g, 6,65 mmol) en isopropanol/agua 9:2 (110 ml). Bajo atmósfera protectora de argón se añade paladio sobre carbón (del 10%; 5 g). La mezcla de reacción se agita (después de la desgasificación) en un autoclave a presión a 80-70 bar (8-7 MPa) de presión de hidrógeno y 40°C durante 12 h. Para la reacción se añade de nuevo paladio sobre carbón (del 10%; 5 g). La mezcla de reacción se agita de nuevo (después de la desgasificación) en un autoclave a presión a 80-70 bar (8-7 MPa) de presión de hidrógeno y 40°C durante 12 h. La mezcla de reacción se agita otra vez más (después de la desgasificación) en un autoclave a presión a 80-70 bar (8-7 MPa) de presión de hidrógeno y 40°C durante 12 h. Ahora ya no puede detectarse más lisobactina mediante HPLC analítica (Procedimiento 10). La mezcla de reacción se filtra a través de tierra de infusorios, se concentra a vacío y se seca a alto vacío. Se obtienen 9,17 g (99% d.t.) de producto (60% de dihidrolisobactina, 40% de octahidrolisobactina).

### Procedimiento de hidrogenación 9

Se disuelve bistrifluoroacetato de lisobactina (Ejemplo 1A, 5 g, 3,32 mmol) en isopropanol/agua 9:2 (110 ml). Bajo atmósfera protectora de argón se añade paladio sobre carbón (del 10%; 5 g). La mezcla de reacción se agita (después de la desgasificación) en un autoclave a presión a 80 bar (8 MPa) de presión de hidrógeno y 40°C durante 12 h. La mezcla de reacción se filtra a través de tierra de infusorios, se concentra a vacío y se seca a alto vacío. La hidrogenación se repite otras tres veces cada vez con 5,0 g de bistrifluoroacetato de lisobactina (total: 4 pases). Como fracción de producto reunida se obtienen 18,27 g de producto (dihidrolisobactina:octahidrolisobactina, aproximadamente 5:4).

### Ejemplo 4

#### Disociación con quimotripsina de dihidro-lisobactina, relación enzima/sustrato 1:50

Se disuelven 200  $\mu$ g de dihidro-lisobactina en 10  $\mu$ l de metanol y luego se mezclan con 190  $\mu$ l de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 4  $\mu$ g de quimotripsina (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30  $\mu$ l después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30  $\mu$ l de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta análisis por HPLC, electroforesis capilar de zona, análisis de secuencias, análisis de aminoácidos o investigación de EM a -20°C.

Véase la Tabla 2 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con quimotripsina.

### Ejemplo 5

#### Disociación con quimotripsina de octahidro-lisobactina, relación enzima/sustrato 1:50

Se disuelven 200  $\mu$ g de octahidro-lisobactina en 10  $\mu$ l de metanol y luego se mezclan con 190  $\mu$ l de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 4  $\mu$ g de quimotripsina (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30  $\mu$ l después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30  $\mu$ l de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

Véase la Tabla 2 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con quimotripsina.

### Ejemplo 6

#### Disociación analítica con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina, relación enzima/sustrato 1:25

Se disuelven 200  $\mu$ g de dihidro- (59%) y octahidro-lisobactina (34%) en 10  $\mu$ l de metanol y luego se mezclan con 190  $\mu$ l de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 8  $\mu$ g

## ES 2 340 783 T3

de quimotripsina (1:25) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3 h y la disociación con enzima se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

5 Véase la Tabla 2 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con quimotripsina.

### Ejemplo 7

10 *Disociación analítica con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina, relación enzima/sustrato 1:400*

15 Se disuelven 150 µg de dihidro- (59%) y octahidro-lisobactina (34%) en 15 µl de etanol y luego se mezclan con 126 µl de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 0,38 µg de quimotripsina (9 µl de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol/tampón de disociación, 0,2 mg/ml; 1:400) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 25 µl después de 0, 0,5, 1, 3 h y la disociación con enzima se detiene con 25 µl de 30% de acetonitrilo/0,1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

20 Véase la Tabla 2 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con quimotripsina.

### Ejemplo 8

25 *Disociación analítica con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina, concentración de sustrato 6 mg/ml*

30 Se disuelven 900 µg de dihidro- (59%) y octahidro-lisobactina (34%) en 15 µl de metanol y luego se mezclan con 99 µl de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 36 µg de quimotripsina (36 µl de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol 1:1,1 mg/ml; 1:25) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 25 µl después de 0, 0,5, 1, 3 h y la disociación con enzima se detiene con 25 µl de 30% de acetonitrilo/0,1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

Véase la Tabla 2 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con quimotripsina.

### Ejemplo 9

40 *Disociación analítica con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina, concentración de disolvente metanol al 30%*

45 Se disuelven 150 µg de dihidro- (59%) y octahidro-lisobactina (34%) en 45 µl de metanol y luego se mezclan con 99 µl de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 6 µg de quimotripsina (6 µl de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol 1:1,1 mg/ml; 1:25) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 25 µl después de 0, 0,5, 1, 3 h y la disociación con enzima se detiene con 25 µl de 30% de acetonitrilo/0,1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

Véase la Tabla 2 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con quimotripsina.

### Ejemplo 10

*Disociación analítica con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina, disociación a temperatura ambiente*

55 Se disuelven 200 µg de dihidro- (59%) y octahidro-lisobactina (34%) en 10 µl de metanol y luego se mezclan con 190 µl de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 8 µg de quimotripsina (8 µl de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol 1:1, 1 mg/ml; 1:25) y la reacción se realiza a temperatura ambiente (20-25°C). Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 h y la disociación con enzima se detiene con 30 µl de 30% de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

60 Véase la Tabla 2 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con quimotripsina.

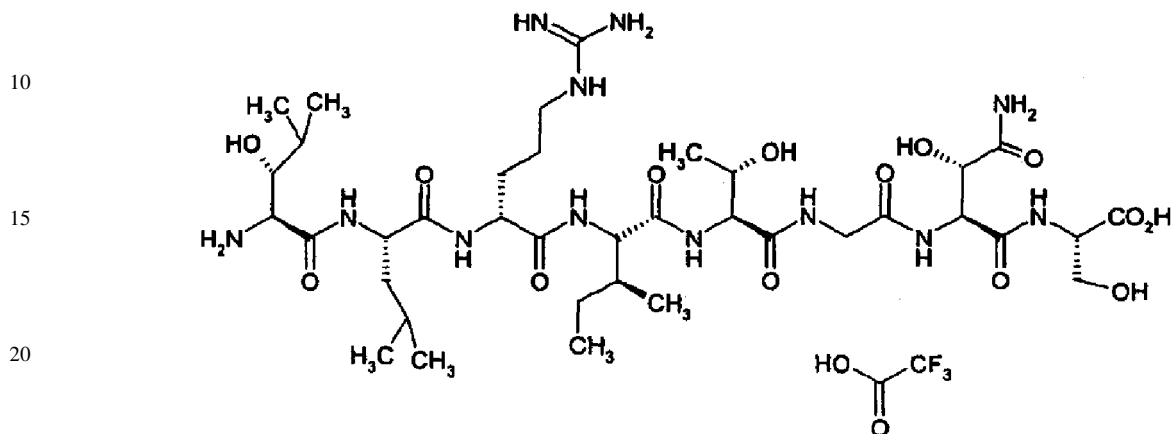
65

## ES 2 340 783 T3

### Ejemplo 11

#### Fragmento 4-11

5 *Trifluoroacetato de [(3R)Leu(3-OH)]-Leu-D-Arg-Ile-aThr-Gly-[(3S)-3-Asn(3-OH)]-Ser*



25 *Disociación preparativa con quimotripsina de dihidro-lisobactina, concentración de sustrato 1 mg/ml*

30 Se disuelven 2 x 80 mg de dihidro-lisobactina (35,3  $\mu\text{mol}$  y 33,8  $\mu\text{mol}$  de péptido puro determinado por análisis de aminoácidos) en cada vez 8 ml de metanol y luego se mezclan cada vez con 69 ml de tampón de disociación (hidro-  
 35 genocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Antes de la adición de enzima, las disoluciones se calientan en la estufa de secado a 37°C. Se añaden 3,2 mg de quimotripsina (3,2 ml de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol 1:1, 1 mg/ml; 1:25; precalentada a 37°C) y las reacciones se realizan a 37°C. Se toman alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  después de 0,5, 1 h y las disociaciones con enzimas se detienen con 200  $\mu\text{l}$  de 30% de acetonitrilo/0,1% de TFA. Las muestras se analizan con HPLC en paralelo a las disociaciones con enzimas en el plazo de 15 min (tiempo de retención del fragmento 4-11 aproximadamente 3,6 min, fragmento 1-3 (LLF) aproximadamente 9,6 min, condiciones: disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 60% de acetonitrilo/0,1% de TFA, gradiente: 0 min 30% de B, 10 min 80% de B, 11 min 100% de B, 12 min 30% de B, 15 min 30% de B; flujo 0,7 ml/min, 40°C, detección UV 210 nm). Las reacciones enzimáticas se detienen después de aproximadamente 70 min con 3 ml de acetonitrilo y aproximadamente 0,6 ml de TFA. El valor de pH de la disolución se encuentra entre 1 y 2. Las disoluciones pueden guardarse a -20°C hasta la separación preparativa.

#### Separación preparativa de los fragmentos 1-3 y 4-11

45 Se filtran 2 x aproximadamente 80 ml de las disoluciones de disociación a través de un filtro (0,2  $\mu\text{m}$ ) y luego se reúnen. La disolución se divide en cuatro porciones cada una de aproximadamente 38,5 ml (total 154 ml) y se cromatografían respectivamente en una columna Source 15RPC (3 ml) con un gradiente de acetonitrilo/TFA. Condiciones: disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 0,1% de TFA/acetonitrilo; gradiente: 0% de B al 45% de B en 40 min; flujo 2 ml/min; detección UV 210 nm. Las cuatro pasadas se realizan sucesivamente y las fracciones se recogen en el mismo tubo. Los cromatogramas resultantes son congruentes.

50 Los fragmentos 4-11 ( $R_t$  = aproximadamente 15 min) y 1-3 (LLF) ( $R_t$  = aproximadamente 25 min) se combinan, se diluyen 1:1 con agua y luego se liofilizan.

55 Se liofilizan por separado alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de los conjuntos respectivos para el análisis de aminoácidos, la HPLC analítica, la electroforesis capilar de zona (CZE), el análisis de secuencias y la espectrometría de masas.

El rendimiento del fragmento 4-11 asciende después del análisis de aminoácidos a 68,3  $\mu\text{mol}$  (99% d.t.) y del fragmento 1-3 a 67,4  $\mu\text{mol}$  (98% d.t.).

### 60 Ejemplo 12

#### *Disociación preparativa con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina 1 mg/ml*

##### Mezcla 1

65 Se disuelven 2 x 700 mg de dihidro- (56%) y octahidro-lisobactina (21%) (682  $\mu\text{mol}$  de dihidro- y octahidro-lisobactina contenidos como péptidos puros determinados mediante análisis de aminoácidos) cada uno en 70 ml de

## ES 2 340 783 T3

metanol y luego se mezclan cada uno con 602 ml de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Antes de la adición de enzima, las disoluciones se calientan en la estufa de secado a 37°C. Se añaden 28 mg de quimotripsina (28 ml de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol 1:1, 1 mg/ml; 1:25; precalentada a 37°C) y las reacciones se realizan a 37°C. Se toman alícuotas de 200 µl después de 0,5, 1 h y las disociaciones con enzimas se detienen con 200 µl de 30% de acetonitrilo/0,1% de TFA. Las muestras se analizan con HPLC en paralelo a las disociaciones con enzimas en el plazo de 15 min (tiempo de retención del fragmento 4-11 aproximadamente 3,6 min, fragmento 1-3 (LLF) aproximadamente 9,6 min, fragmento 1-3 (LL(3-ciclohexil)A) aproximadamente 11,3 min, condiciones: disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 60% de acetonitrilo/0,1% de TFA, gradiente: 0 min 30% de B, 10 min 80% de B, 11 min 100% de B, 12 min 30% de B, 15 min 30% de B; flujo 0,7 ml/min, 40°C, detección UV 210 nm). Las reacciones enzimáticas se detienen después de aproximadamente 60 min con 30 ml de acetonitrilo y aproximadamente 6 ml de TFA. El valor de pH de la disolución se encuentra entre 1 y 2. Las disoluciones pueden guardarse a -20°C hasta la separación preparativa.

### 15 Mezcla 2

Se disuelven 775 mg de dihidro- (45%) y octahidro-lisobactina (48%) (468 µmol de dihidro- y octahidro-lisobactina contenidos como péptidos puros determinados por análisis de aminoácidos) en 77,5 ml de metanol y luego se mezclan con 667 ml de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Antes de la adición de enzima, la disolución se calienta en estufa de secado a 37°C. Se añaden 31 mg de quimotripsina (31 ml de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol 1:1, 1 mg/ml; 1:25; precalentada a 37°C) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 200 µl después de 0,5, 1 h y la disociación con enzima se detiene con 200 µl de 30% de acetonitrilo/0,1% de TFA. Las muestras se analizan con HPLC en paralelo a la disociación con enzima en el plazo de 15 min (tiempo de retención del fragmento 4-11 aproximadamente 3,6 min, fragmento 1-3 (LLF) aproximadamente 9,6 min, fragmento 1-3 (LL(3-ciclohexil)A) aproximadamente 11,3 min) (disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 60% de acetonitrilo/0,1% de TFA, gradiente 0 min 30% de B, 10 min 80% de B, 11 min 100% de B, 12 min 30% de B, 15 min 30% de B; flujo: 0,7 ml/min, temperatura: 40°C, detección UV 210 nm). La reacción enzimática se detiene después de 60 min con 30 ml de acetonitrilo y aproximadamente 6 ml de TFA. El valor de pH de la disolución debe encontrarse entre 1 y 2. La disolución puede guardarse a -20°C hasta la separación preparativa.

30

### *Separación preparativa de los fragmentos 1-3 y 4-11*

Las mezclas de disociación 1 y 2 se filtran a través de un filtro (0,2 µm) y luego se reúnen. La disolución se divide en varias porciones y se cromatografían respectivamente en una columna Source 15RPC con un gradiente de acetonitrilo/TFA como se describe anteriormente. Las pasadas se realizan sucesivamente y las fracciones se recogen en el mismo tubo. Los cromatogramas resultantes son congruentes.

El fragmento 4-11 ( $R_t$  aproximadamente 15 min) se combina, se diluye 1:1 con agua y luego se liofiliza.

40

El rendimiento del fragmento 4-11 asciende después de la liofilización a 1,1 g (1095 µmol). Con un uso de 1150 µmol de material disociable, el rendimiento del fragmento 4-11 es del 95% d.t.

### 45 Ejemplo 13

#### *Disociación preparativa con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina, concentración de sustrato 3 mg/ml*

Se disuelven 2 x 0,995 g de una mezcla de dihidro- (52%) y octahidro-lisobactina (37%) cada una en 33 ml de metanol y luego se mezclan cada una con 257 ml de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Antes de la adición de enzima, la disolución se calienta en estufa de secado a 37°C. Se añaden 39,6 mg de quimotripsina (39,6 ml de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol 1:1, 1 mg/ml; 1:25; precalentada a 37°C) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 200 µl después de 0,5, 1 h y la disociación con enzima se detiene con 200 µl de 30% de acetonitrilo/0,1% de TFA. Las muestras se analizan con HPLC en paralelo a la disociación con enzima en el plazo de 15 min (tiempo de retención del fragmento 4-11 aproximadamente 3,6 min, fragmento 1-3 (LLF) aproximadamente 9,6 min, fragmento 1-3 (LL(3-ciclohexil)A) aproximadamente 11,3 min) (disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 60% de acetonitrilo/0,1% de TFA, gradiente 0 min 30% de B, 10 min 80% de B, 11 min 100% de B, 12 min 30% de B, 15 min 30% de B; flujo: 0,7 ml/min, temperatura: 40°C, detección UV 210 nm). Las reacciones enzimáticas se detienen después de 60 min cada una con 30 ml de acetonitrilo y aproximadamente 2,5 ml de TFA. El valor de pH de la disolución debe encontrarse entre 1 y 2. La disolución puede guardarse a -20°C hasta la separación preparativa.

65

## ES 2 340 783 T3

### Ejemplo 14

*Disociación preparativa con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina, concentración de sustrato 5 mg/ml*

5 Se disuelven 10 g de dihidro- (aproximadamente el 40%) y octahidro-lisobactina (aproximadamente el 60%) en 200 ml de metanol y luego se mezclan con 1700 ml de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Antes de la adición de enzima, la disolución se calienta en estufa de secado a 37°C. Se añaden 400 mg de quimotripsina (100 ml de disolución de quimotripsina agua/etilenglicol 1:1, 4 mg/ml; 1:25; precalentada a 37°C) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 200 µl después de 0,5, 1 h y la disociación con enzima se detiene con 200 µl de 30% de acetonitrilo/0,1% de TFA. Las muestras se analizan con HPLC en paralelo a la disociación con enzima en el plazo de 15 min (tiempo de retención del fragmento 4-11 aproximadamente 3,6 min, fragmento 1-3 (LLF) aproximadamente 9,6 min, fragmento 1-3 (LLA(3-ciclohexil)) aproximadamente 11,3 min) (disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 60% de acetonitrilo/0,1% de TFA, gradiente 0 min 30% de B, 10 min 80% de B, 11 min 100% de B, 12 min 30% de B, 15 min 30% de B; flujo: 0,7 ml/min, temperatura: 40°C, detección UV 210 nm). La reacción enzimática se detiene después de 60 min con 75 ml de acetonitrilo y aproximadamente 15 ml de TFA. El valor de pH de la disolución debe encontrarse entre 1 y 2. La disolución puede guardarse a -20°C hasta la separación preparativa.

20 El fragmento 4-11 se aísla en varias pasadas como se describe anteriormente mediante HPLC preparativa.

La actividad de la carga de quimotripsina usada (70 U/mg) se comprueba mediante una disociación de control con la proteína muteína doble de interleucina 4 Arg(121) → Asp(121)/Tyr(124) → Asp(124) (BAYER Healthcare AG, D-Wuppertal).

25

### Ejemplo 15

*Disociación con subtilisina de dihidro-lisobactina*

30 Se disuelven 200 µg de dihidro-lisobactina en 10 µl de metanol y luego se mezclan con 190 µl de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 4 µg de subtilisina (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

35

Véase la Tabla 3 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con subtilisina.

### Ejemplo 16

40

*Disociación con subtilisina de octahidro-lisobactina*

Se disuelven 200 µg de octahidro-lisobactina en 10 µl de metanol y luego se mezclan con 190 µl de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 4 µg de subtilisina (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

45

Véase la Tabla 3 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con subtilisina.

50 La actividad de la carga de subtilisina usada (aproximadamente 12 U/mg) se comprueba mediante una disociación de control con la proteína muteína doble de interleucina 4 Arg(121) → Asp(121)/Tyr(124) → Asp(124) (BAYER Healthcare AG, D-Wuppertal).

### Ejemplo 17

*Disociación con termolisina de dihidro-lisobactina*

60 Se disuelven 200 µg de dihidro-lisobactina en 10 µl de metanol y luego se mezclan con 190 µl de tampón de disociación (tris-(hidroximetil)-aminometano 0,1 M/cloruro de calcio 5 mM, pH 7,45). Se añaden 4 µg de termolisina (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

65

Véase la Tabla 4 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con termolisina.

## ES 2 340 783 T3

### Ejemplo 18

#### *Disociación con termolisina de octahidro-lisobactina*

5 Se disuelven 200  $\mu\text{g}$  de octahidro-lisobactina en 10  $\mu\text{l}$  de metanol y luego se mezclan con 190  $\mu\text{l}$  de tampón de disociación (hidrogenocarbonato de amonio 0,1 M/urea 0,5 M, pH 8). Se añaden 4  $\mu\text{g}$  de termolisina (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

10 Véase la Tabla 4 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con termolisina.

La actividad de la carga de termolisina usada (aproximadamente 55 U/mg) se comprueba mediante una disociación de control con la proteína muteína doble de interleucina 4 Arg(121)  $\rightarrow$  Asp(121)/Tyr(124)  $\rightarrow$  Asp(124) (BAYER Healthcare AG, D-Wuppertal).

15

### Ejemplo 19

#### *Disociación con papaína de dihidro-lisobactina*

20

Se disuelven 200  $\mu\text{g}$  de dihidro-lisobactina en 10  $\mu\text{l}$  de metanol y luego se mezclan con 190  $\mu\text{l}$  de tampón de disociación (fosfato de sodio 0,1 M/cisteína 10 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5). Se añaden 4  $\mu\text{g}$  de papaína (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

25

Véase la Tabla 5 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con papaína.

### Ejemplo 20

30

#### *Disociación con papaína de octahidro-lisobactina*

35 Se disuelven 200  $\mu\text{g}$  de octahidro-lisobactina en 10  $\mu\text{l}$  de metanol y luego se mezclan con 190  $\mu\text{l}$  de tampón de disociación (fosfato de sodio 0,1 M/cisteína 10 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5). Se añaden 4  $\mu\text{g}$  de papaína (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

Véase la Tabla 5 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con papaína.

40 La actividad de la carga de papaína usada (aproximadamente 11 U/mg) se comprueba mediante una disociación de control con la proteína muteína doble de interleucina 4 Arg(121)  $\rightarrow$  Asp(121)/Tyr(124)  $\rightarrow$  Asp(124) (BAYER Healthcare AG, D-Wuppertal).

### Ejemplo 21

#### *Disociación con proteinasa K de dihidro-lisobactina*

50 Se disuelven 200  $\mu\text{g}$  de dihidro-lisobactina en 10  $\mu\text{l}$  de metanol y luego se mezclan con 190  $\mu\text{l}$  de tampón de disociación (tetraborato de sodio 0,1 M, pH 9). Se añaden 4  $\mu\text{g}$  de proteinasa K (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

55

Véase la Tabla 6 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con proteinasa K.

### Ejemplo 22

#### *Disociación con proteinasa K de octahidro-lisobactina*

60

Se disuelven 200  $\mu\text{g}$  de octahidro-lisobactina en 10  $\mu\text{l}$  de metanol y luego se mezclan con 190  $\mu\text{l}$  de tampón de disociación (tetraborato de sodio 0,1 M, pH 9). Se añaden 4  $\mu\text{g}$  de proteinasa K (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

65

Véase la Tabla 6 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con proteinasa K.

## ES 2 340 783 T3

La actividad de la carga de proteinasa K usada (aproximadamente 30 U/mg) se comprueba mediante una disociación de control con la proteína muteína doble de interleucina 4 Arg(121) → Asp(121)/Tyr(124) → Asp(124) (BAYER Healthcare AG, D-Wuppertal).

5

### Ejemplo 23

#### *Disociación con bromelaína de dihidro-lisobactina*

10 Se disuelven 200 µg de dihidro-lisobactina en 10 µl de metanol y luego se mezclan con 190 µl de tampón de disociación (fosfato de sodio 0,1 M, cisteína 10 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5). Se añaden 4 g de bromelaína (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

15 Véase la Tabla 7 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con bromelaína.

### Ejemplo 24

#### *Disociación con bromelaína de octahidro-lisobactina*

20 Se disuelven de 200 µg de octahidro-lisobactina en 10 µl de metanol y luego se mezclan con 190 µl de tampón de disociación (fosfato de sodio 0,1 M, cisteína 10 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5). Se añaden 4 µg de bromelaína (1:50) y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la disociación con enzima se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

Véase la Tabla 7 para las secuencias de péptidos de los productos de disociación con bromelaína.

30 La actividad de la carga de bromelaína usada (aproximadamente 4 U/mg) se comprueba mediante una disociación de control con la proteína muteína doble de interleucina 4 Arg(121) → Asp(121)/Tyr(124) → Asp(124) (BAYER Healthcare AG, D-Wuppertal).

### Ejemplo 25

35

#### *Síntesis enzimática de dihidro-lisobactina con quimotripsina*

40 Se disuelven 800 µg del péptido Leu-Leu-PheOMe y 100 µg del péptido 4-11 en 200 µl de metanol y luego se mezclan con 200 µl de tampón de síntesis (tetaborato de sodio 0,1 M, pH 9). Se añaden 24 µg de quimotripsina y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la síntesis se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

La detección de la dihidro-lisobactina se realiza mediante HPLC y CZE.

45

### Ejemplo 26

#### *Síntesis enzimática de derivados de dihidro-lisobactina con quimotripsina*

50 Se disuelven 800 µg del péptido Boc-Leu-Leu-PheOMe en 200 µl de tetraclorometano y luego se mezclan con 200 µl de tampón de síntesis (tetaborato de sodio 0,1 M, pH 9) de 100 µg del péptido 4-11. Se añaden 24 µg de quimotripsina y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la síntesis se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

55 La detección de derivados de dihidro-lisobactina se realiza mediante HPLC y CZE.

### Ejemplo 27

#### *Síntesis enzimática de octahidro-lisobactina con quimotripsina*

60 Se disuelven 800 µg del péptido Leu-Leu-Ala(3-ciclohexil)OMe y 100 µg del péptido 4-11 en 200 µl de metanol y luego se mezclan con 200 µl de tampón de síntesis (tetaborato de sodio 0,1 M, pH 9). Se añaden 24 µg de quimotripsina y la reacción se realiza a 37°C. Se toman alícuotas de 30 µl después de 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h y la síntesis se detiene con 30 µl de acetonitrilo/1% de TFA. Las muestras se guardan hasta el análisis a -20°C.

La detección de la octahidro-lisobactina se realiza mediante HPLC y CZE.

## ES 2 340 783 T3

### Ejemplo 28

#### *Análisis de secuencias del extremo N*

5 Se cargan 3 nmol de fragmentos disueltos en 60% de acetonitrilo/0,1% de TFA en una hoja de secuenciador que se ha incubado previamente con Polybren<sup>R</sup>. Las proteínas se secuencian con el ciclo de secuenciador normal. Los aminoácidos PTH se identifican mediante HPLC en línea con ayuda de un patrón de PTH de 40 pmol. Los aminoácidos no proteinógenos se identifican mediante su posición relativa con respecto a los aminoácidos patrón. La pureza de los péptidos se estima mediante el aminoácido del 1-3 ciclo de PTH. Los distintos péptidos se secuencian durante 4 a 12  
10 horas. Las Tablas 1 a 7 muestran las secuencias de proteínas determinadas.

TABLA 1

*Secuencias de péptidos de los sustratos*

Péptido	Secuencias de péptidos determinadas de los sustratos
1. Dihidro-lisobactina	Leu-Leu-Phe-Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser
2. Octahidro-lisobactina	Leu-Leu-PTHAla(3-ciclohexil)*-Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser

TABLA 2

30 *Análisis de secuencias de distintos péptidos (1-3) o fragmentos de péptidos (1-3) de la disociación con quimotripsina*

Péptido	Secuencias de péptidos determinadas de productos de disociación con quimotripsina
1. Péptido 4-11	Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser
2. Péptido 1-3	Leu-Leu-Phe
3. Péptido 1-3	Leu-Leu-PTHAla(3-ciclohexilo)*
*El PTHAla(3-ciclohexilo) no puede detectarse como pico con el sistema de PTH usado.	

TABLA 3

50 *Análisis de secuencias de distintos péptidos o fragmentos de péptidos de la disociación con subtilisina de dihidro- y octahidro-lisobactina (1-4). El producto de disociación 4-10 sólo se forma a un mayor grado después de 24 h*

Péptido	Secuencias de péptidos determinadas de los productos de disociación con subtilisina
1. Péptido 4-11	Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser
2. Péptido 4-10	Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser
3. Péptido 1-3	Leu-Leu-Phe
4. Péptido 1-3	Leu-Leu-PTHAla(3-ciclohexilo)*
*El PTHAla(3-ciclohexilo) no puede detectarse como pico con el sistema de PTH usado.	

## ES 2 340 783 T3

TABLA 4

*Análisis de secuencias de distintos péptidos o fragmentos de péptidos de la disociación con termolisina de dihidro- y octahidro-lisobactina (1-3)*

5

Péptido	Secuencias de péptidos determinadas de los productos de disociación con termolisina
1. Péptido 3-11	Phe-Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser
2. Péptido 3-11	PTHAla(3-ciclohexil)*-Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)
3. Péptido 1-2	Leu-Leu
*El PTHAla(3-ciclohexilo) no puede detectarse como pico con el sistema de PTH usado.	

10

15

20

TABLA 5

*Análisis de secuencias de distintos péptidos o fragmentos de péptidos de la disociación con papaína de dihidro- (1, 2, 3, 4) y octahidro-lisobactina (1, 2, 3, 5). El producto de disociación 4-10 sólo se forma a un mayor grado después de 24 h*

25

Péptido	Secuencias de péptidos determinadas de los productos de disociación con papaína
1. Péptido 5-11	Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser
2. Péptido 5-9	Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly
3. Péptido 10-11	Asn(OH)-Ser
4. Péptido 1-4	Leu-Leu-Phe-Leu(OH)
5. Péptido 1-4	Leu-Leu-PTHAla(3-ciclohexil)*-Leu(OH)
*El PTHAla(3-ciclohexilo) no puede detectarse como pico con el sistema de PTH usado.	

30

35

40

45

TABLA 6

*Análisis de secuencias de distintos péptidos o fragmentos de péptidos de la disociación con proteinasa K de dihidro- (1, 2) y octahidro-lisobactina (3, 4)*

50

Péptido	Secuencias de péptidos determinadas de los productos de disociación con proteinasa K
1. Péptido 4-11	Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser
2. Péptido 5-11	Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)-Ser
4. Péptido 4-10	Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)
5. Péptido 5-10	Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly-Asn(OH)
6. Péptido 1-2	Leu-Leu

55

60

65

## ES 2 340 783 T3

TABLA 7

*Análisis de secuencias de distintos péptidos o fragmentos de péptidos de la disociación con bromelaína de lisobactina de cadena abierta (1, 4), dihidro- (2, 4) y octahidro-lisobactina (3, 4)*

Péptido	Secuencias de péptidos determinadas de los productos de disociación de bromelaína
2. Péptido 1- 9	Leu-Leu-Phe-Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly
3. Péptido 1- 9	Leu-Leu-PTHAla(3-ciclohexil)*-Leu(OH)-Leu-Arg-Ile-(allo)Thr-Gly
4. Péptido 10-11	Asn(OH)-Ser
*El PTHAla(3-ciclohexilo) no puede detectarse como pico con el sistema de PTH usado.	

### Ejemplo 29

#### *Análisis de aminoácidos*

El análisis de aminoácidos representa un importante parámetro cualitativo y cuantitativo para la caracterización de proteínas. Además del contenido de proteínas, con la estructura primaria conocida se determina el número de aminoácidos individuales. El análisis de aminoácidos de derivados de lisobactina o fragmentos de péptidos concuerda bien con los valores teóricos de la estructura primaria (Tabla 8). Los aminoácidos no proteinógenos sólo se cuantifican en presencia de patrones correspondientes. Se disuelven 100 µg de derivados de lisobactina o fragmentos de péptidos en 200 µl de ácido clorhídrico 6 N y se hidrolizan 1 h a 166°C. Se añaden aproximadamente 5 nmol de las muestras al analizador de aminoácidos. La cantidad de aminoácido se determina mediante un patrón de aminoácidos de 4 nmol.

TABLA 8

*Análisis de aminoácidos de dihidro-, octahidro-lisobactina, dihidro- + octahidro-lisobactina, fragmento 4-11 y 1-3. Los números enteros se refieren a Ile = 1 o Leu = 2*

Aminoácido	Péptido 1-3	Valores teóricos	Péptido 4-11	Valores teóricos	Dihidro- + octahidro-lisobactina	Dihidro-lisobactina	Octahidro-lisobactina	Valores teóricos
Asx(OH)			s.d.	1	s.d.	s.d.	s.d.	1
Asx								
alloTHR			1,04	1	0,91	1,11	1,01	1
Ser			0,59	1	0,89	0,99	0,90	1
Glx								
Gly			1,11	1	1,15	1,17	1,12	1
Ala								
Val								
Met								

## ES 2 340 783 T3

Aminoácido	Péptido 1-3	Valores teóricos	Péptido 4-11	Valores teóricos	Dihidro- + octahidro- lisobactina	Dihidro- lisobactina	Octahidro- lisobactina	Valores teóricos
Ile*			1,00	1	1,00	1,00	1,00	1
Leu*	2,00	2	1,04	1	2,93	2,33	2,53	3
Tyr								
Phe	1,01	1			0,55	1,08		1
Ala(3- ciclohexilo)					s.d.		s.d.	1
Leu(OH)			s.d.	1	s.d.	s.d.	s.d.	1
Lys								
Arg			1,06	1	1,05	1,18	1,15	1
Phe(OH)								1
Suma AS	3,01	3	5,83	8	9,39	8,85	7,71	

### Ejemplo 30

#### *Cromatografía en fase inversa*

En la cromatografía por HPLC de proteínas en fases inversas químicamente unidas, mediante una interacción hidrófoba de las proteínas se produce un enlace a la fase usada. Los péptidos son desplazados por disolventes orgánicos (fase móvil) a la fase estacionaria según la fuerza de su enlace. Por este motivo, este procedimiento es un buen criterio para la valoración de la pureza de un péptido y para el control de la velocidad de la disociación enzimática y de los productos de disociación formados. Los péptidos dihidro-lisobactina y octahidro-lisobactina se eluyen a aproximadamente 35 min y aproximadamente 38 min, el fragmento 4-11 a aproximadamente 16 min, 1-3 (LLF) a aproximadamente 31 min y 1-3 (LLA(3-ciclohexilo)) a aproximadamente 37 min de la fase RP-18. La Figura 1 muestra el desarrollo temporal de una disociación enzimática preparativa con quimotripsina (Ejemplo 11).

Se cromatografían aproximadamente 20 µg de los productos de disociación enzimática o de los compuestos de partida dihidro-lisobactina y octahidro-lisobactina o de la mezcla en una columna Zobax 300SB-C18 (4,6 mm x 150 mm; material de 3,5 µm; diámetro de poro de 300 Angström). Como eluyente se usa un gradiente de acetonitrilo/TFA. Condiciones: disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 60% de de acetonitrilo/0,1% de TFA; flujo 0,7 ml/min, temperatura de columna 40°C, detección UV 210 nm, disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 0,1% de TFA/60% de acetonitrilo; gradiente: 0 min 0% de B, 2 min 10% de B, 50 min 80% de B, 52 min 100% de B, 55 min 0% de B, 60 min 0% de B.

### Ejemplo 31

#### *Electroforesis capilar de zona (CZE)*

La electroforesis capilar de zona permite la separación de péptidos y proteínas debido a su carga en el campo eléctrico. La calidad de la separación depende a este respecto del tampón, el valor de pH, la temperatura y los aditivos usados. Como capilares se usan las llamadas columnas de "sílice fundida" con un diámetro interno de 50-100 µm. Este procedimiento es un criterio muy bueno para la valoración de la pureza de un péptido y para el control de la formación de productos de disociación enzimática. Los péptidos dihidro-lisobactina y octahidro-lisobactina se eluyen a aproximadamente 21 min, el fragmento 4-11 a aproximadamente 18 min, 1-3 (LLF) a aproximadamente 24 min, 1-3 (LLA(3-ciclohexilo)) a aproximadamente 22 min, las formas desamidadas como pico doble a aproximadamente 30 min (1-11) y 24 min (4-11) de la columna capilar. La Figura 2 muestra el desarrollo temporal de una disociación enzimática de octahidro-lisobactina con quimotripsina (Ejemplo 5). Se ve claramente el fuerte aumento de los productos desamidados después de 24 h en tampón.

## ES 2 340 783 T3

Se investigan aproximadamente 4 ng de los productos de disociación enzimática o de los compuestos de partida dihidro-lisobactina y octahidro-lisobactina o de la mezcla mediante electroforesis capilar de zona en una columna de vidrio (longitud 72 cm, diámetro interno 50  $\mu$ m). Condiciones: intensidad de corriente 90  $\mu$ A, temperatura de columna 25°C, tampón de fosfato 100 mM, pH 3,0, detección UV 210 nm, alimentación a presión 3 segundos.

5

### Ejemplo 32

#### *Determinación del peso molecular por EM-ESI-HPLC*

10

Los péptidos y los productos de disociación enzimática se separan mediante cromatografía RP-18-HPLC y el peso molecular se determina por ionización por electropulverización (ESI).

15

Se separan aproximadamente 100  $\mu$ g de disociación con quimotripsina de la mezcla de dihidro-lisobactina y octahidro-lisobactina con una columna de HPLC C18 bajo las siguientes condiciones: disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 60% de acetonitrilo/0,1% de TFA; flujo 0,7 ml/min, temperatura de columna 40°C, detección UV 210 nm, disolvente A 0,1% de TFA, disolvente B 0,1% de TFA/60% de acetonitrilo; gradiente: 0 min 0% de B, 2 min 10% de B, 50 min 80% de B, 52 min 100% de B, 55 min 0% de B, 60 min 0% de B. Los péptidos se transfieren a la fuente de iones a presión atmosférica del espectrómetro de masas y allí se ionizan. Desde allí, los iones se transfieren a la región de alto vacío del espectrómetro de masas y se detectan. La Tabla 9 muestra los pesos moleculares determinados.

20

TABLA 9

25

*Pesos moleculares de dihidro-lisobactina, octahidro-lisobactina y de productos de disociación enzimática en comparación con los pesos moleculares teóricos (MW) en Dalton*

30

Péptidos	MW en Da	MW teórico en Da
1. Dihidro-lisobactina	1279	1278,5
2. Octahidro-lisobactina	1285	1284,6
3. Péptido 4-11	905	905
4. Péptido 1-3 (LLF)	391	391
5. Péptido 1-3 (LLA(3-ciclohexilo))	397	397
6. Péptido 1-9	1062	1061,5
7. Péptido 1-9 (A(3-ciclohexilo))	1068	1067,6

35

40

45

### Ejemplo 33

#### *Disociación preparativa con quimotripsina de la mezcla de dihidro-/octahidro-lisobactina*

50

Se disuelven 18,27 g de dihidro- y octa-lisobactina (aproximadamente 5:4) en 365 ml de metanol y se diluyen a 3654 ml con quimotripsina (731 mg) y tampón de disociación. La reacción se realiza 30 min a 37°C y luego se detiene con 20 ml de TFA y 150 ml de acetonitrilo. Antes de la adición de enzima, las disoluciones se calientan en estufa de secado a 37°C. Se toman alícuotas de 200  $\mu$ l después de 0 y 0,5 h y la disociación con enzima se detiene con 200  $\mu$ l de 0,1% de TFA en 30% de acetonitrilo/70% de agua. Las muestras se analizan por HPLC (tiempo de retención del fragmento 4-11 aproximadamente 3,6 min, fragmento 1-3 (LLF) aproximadamente 9,6 min, fragmento 1-3 (LL(hexahidro)F) aproximadamente 11,3 min) (eluyente A: 0,1% de TFA en agua, eluyente B: 0,1% de TFA en 60% de acetonitrilo/ 40% de agua, gradiente: 0 min 30% de B, 10 min 80% de B, 11 min 100% de B, 12 min 30% de B, 15 min 30% de B; flujo: 0,7 ml/min, temperatura de columna: 40°C, detección: 210 nm). Alternativamente se usa el Procedimiento 11. La disolución se reparte en 9 porciones x 500 ml y se congelan hasta la separación en RP preparativa a -70°C. El fragmento 4-11 se aísla en varias pasadas por HPLC preparativa.

55

60

#### *Separación preparativa de los fragmentos 1-3 y 4-11*

65

Se filtran aproximadamente 800 ml de la disolución de disociación a través de un cartucho (0,2  $\mu$ m) y se cromatografía en dos partes de aproximadamente 400 ml en una columna Source 15RPC (tamaño de columna: 2360 ml) con un gradiente de metanol/TFA. Eluyente A: 0,1% de TFA en agua, eluyente B: 0,1% de TFA en 100% de metanol; flujo:

## ES 2 340 783 T3

30 ml/min; detección 215 nm. El gradiente se ejecuta según volúmenes de columna: después de la aplicación se lava con 3,6 volúmenes de columna de eluyente A, luego en 18 volúmenes de columna al 45% de B, en 0,67 volúmenes de columna al 100% de B, 1,3 volúmenes de columna al 100% de B, en 0,67 al 0% de B, 7 volúmenes de columna de eluyente A para el equilibrado.

5

Como producto se obtienen 10,36 g (77% d.t.) del fragmento 4-11.

HPLC/UV-Vis (Procedimiento 4):  $R_t = 0,5$  min.

10

EM-CL (Procedimiento 1):  $R_t = 1,0$  min;

EM (ESIpos.):  $m/z$  (%) = 453,6 (100)  $[M + 2H]^{2+}$ , 906 (10)  $[M + H]^+$ .

15

EM (ESIneg.):  $m/z$  (%) = 904 (100)  $[M - H]^-$ .

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación de fragmentos de lisobactina que presenta las siguientes etapas, concretamente
- apertura de anillo hidrogenolítica de lisobactina usando hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación en un disolvente para la formación de dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina,
  - 10 - disociación enzimática de la dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que como enzima se usa serina proteasa eucariota o una serina proteasa microbiana.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que como enzima se usa una metaloproteasa o una cisteína proteasa.
4. Procedimiento para la preparación de derivados de lisobactina que presenta las siguientes etapas, concretamente
- 20 - apertura de anillo hidrogenolítica de lisobactina usando hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación en un disolvente para la formación de dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina,
  - disociación enzimática de la dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina,
  - 25 - unión de los fragmentos de lisobactina.
5. Procedimiento para la preparación de dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina, **caracterizado** porque la lisobactina se convierte en dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina mediante apertura de anillo hidrogenolítica con hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación en un disolvente.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que como catalizador de hidrogenación se usa un catalizador de paladio.
7. Procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que como disolvente se usa una mezcla de isopropanol-agua.
- 35 8. Procedimiento para la preparación del fragmento de lisobactina 4-11 y el fragmento de lisobactina 1-3, **caracterizado** porque la dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina se disocia enzimáticamente para dar el fragmento de lisobactina 4-11 y el fragmento de lisobactina 1-3.
- 40 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que como enzima se usa una serina proteasa eucariota o una serina proteasa microbiana.
10. Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que como serina proteasa se usa quimotripsina.
- 45 11. Procedimiento para la preparación del fragmento de lisobactina 3-11 y/o el fragmento de lisobactina 5-11 y/o el fragmento de lisobactina 4-10 y/o el fragmento de lisobactina 1-9, **caracterizado** porque la dihidro-lisobactina y/u octahidro-lisobactina se disocian enzimáticamente para dar el fragmento de lisobactina 3-11 y/o el fragmento de lisobactina 5-11 y/o el fragmento de lisobactina 4-10 y/o el fragmento de lisobactina 1-9.
- 50 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que como enzima se usa una metaloproteasa o una cisteína proteasa.

55

60

65

Fig. 1:

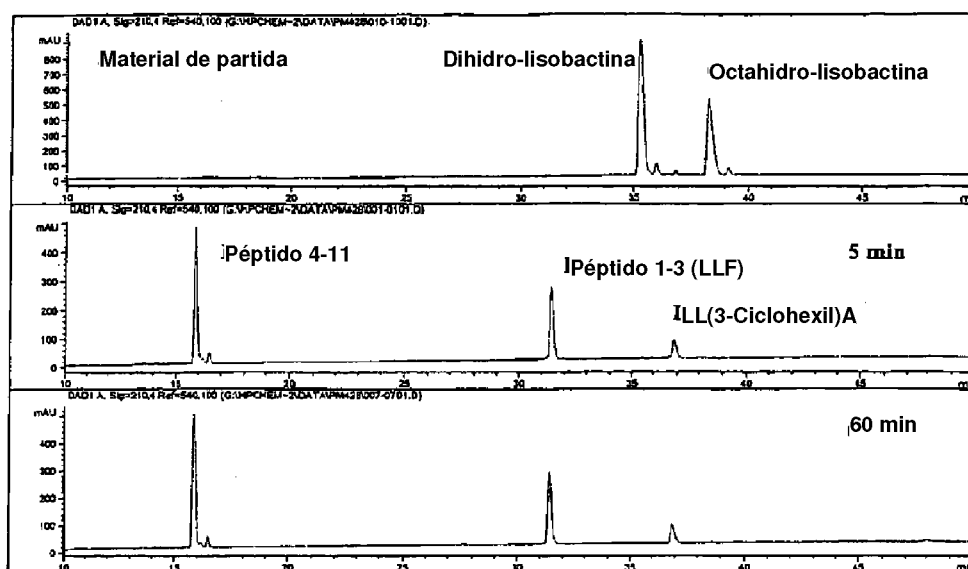


Fig. 2:

