



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 346 183**

(51) Int. Cl.:

C12P 11/00 (2006.01)	C12P 13/00 (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01)	C12P 17/14 (2006.01)
C12P 35/00 (2006.01)	C12P 37/00 (2006.01)
C07C 235/60 (2006.01)	C07D 501/18 (2006.01)
C07D 499/21 (2006.01)	C07D 499/68 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)	

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01951629 .3**

(96) Fecha de presentación : **23.06.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1303631**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

(54) Título: **Biotransformación de compuestos biológicamente activos a partir de sustancias químicas de diferentes clases por medio de la enzima laccasa y peroxidasa de manganeso.**

(30) Prioridad: **23.06.2000 DE 100 29 671**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2010

(73) Titular/es: **Dritte Patentportfolio
Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. KG.
Berliner Strasse 1
12529 Schönefeld, Waltersdorf, DE**

(72) Inventor/es: **Jülich, Wolf Dieter;
Schauer, Frieder;
Lindequist, Ulrike;
Hammer, Elke;
Schäfer, Annett y
Jonas, Ulrike**

(74) Agente: **Blanco Jiménez, Araceli**

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

Biotransformación de compuestos biológicamente activos a partir de sustancias químicas de diferentes clases por medio de la enzima laccasa y peroxidasa de manganeso.

Se divulgan nuevos compuestos biológicamente activos, el procedimiento para su fabricación y su utilización. De los antibióticos y la quimioterapia se obtienen productos de acoplamiento que presentan una eficacia antimicrobiana mejorada o características de aplicación mejoradas en una biotransformación catalizada con las enzimas laccasa.

Estado de la técnica

Los antibióticos forman un grupo de compuestos, heterólogo en cuanto a su estructura y efecto biológico, que pertenecen a la terapéutica más aplicada en la medicina humana y veterinaria así como en la protección fitosanitaria. A los antibióticos pertenecen las sustancias formadas por microorganismos así como los derivados formados de estos que pueden combatir enfermedades infecciosas en caso de aplicación intrasomática. Además de los antibióticos antibacterianos se descubrieron antibióticos con tripanocidas antifúngicos, antivíricos así como con características cancerostáticas. Por aplicación de antibióticos fabricados por vía fermentativa en la quimioterapia del cáncer, la definición originaria fue igualmente ampliada como por aplicación en la cría de animales como sistema ergotrópico y en la protección fitosanitaria como herbicidas, insecticidas, pesticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas (U. Gräfe: Biochemie der Antibiotika, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín, New York, 1992). El hallazgo de nuevas zonas de actividad celular para antibióticos y sustancias bioactivas similares hasta hoy en día aún no está terminado y conduce a nuevas posibilidades de aplicación en la medicina humana y veterinaria así como por ejemplo en la protección fitosanitaria.

La modificación extensiva parcialmente sintética de antibióticos naturales existentes y la síntesis química total han dado lugar finalmente a medicamentos que superan considerablemente el potencial originario de las sustancias naturales. Finalmente fueron localizados también sintéticos totales sin referencia a productos microbianos, que han de equipararse a los antibióticos clásicos en cuanto a su efecto sobre microorganismos y su mecanismo de acción (U. Gräfe: Biochemie der Antibiotika, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín, New York, 1992).

En lo sucesivo se utiliza el concepto antibióticos en este sentido general para sustancias biológicamente activas con efectos selectivos en diferentes zonas de actividad de microorganismos patógenos (bacterias, hongos, virus) y organismos filogénicos superiores (p. ej. rickettsias, tripanosomas, células tumorales o parásitos).

Los antibióticos con diferentes actividades biológicas para diferentes campos de aplicación son modificados continuamente por reacciones químicas, para adaptarlos a nuevas tareas. Ningún otro grupo de antibióticos ha sufrido una modificación semisintética tan amplia como los antibióticos β -lactámicos. El descubrimiento del ácido 6-aminopenicilánico como cuerpo básico de las penicilinas y el ácido 7-aminocefalosporánico como cuerpo básico de las cefalosporinas introdujo una nueva etapa de la modificación con la dirección de destino (meta) de derivados de efecto optimizado, que hasta hoy en día no está terminada.

Las ventajas de las penicilinas y cefalosporinas originariamente descubiertas, como la toxicidad muy escasa y el alto efecto bactericida, fueron adaptadas a las exigencias aumentadas mediante una modificación química continua. Las patentes US-A-5,695,951 y US-A-5,939,299 divulgan métodos para clorurar el derivado de cefalosporina cefalexina mediante una haloperoxidasa. Un método para la introducción enzimática de halógenos utilizando haloperoxidasas está descrito en WO-A-OO/15771.

Estas modificaciones químicas y bioquímicas de los antibióticos β -lactámicos sin embargo no podían mantenerse al nivel del desarrollo de resistencia de los microorganismos patógenos, de modo que actualmente numerosos gérmenes, en particular los estafilococos multirresistentes, ya no pueden ser medicados con los antibióticos β -lactámicos actualmente disponibles.

Las laccasas (E.C. 1.10.3.2) son enzimas que catalizan la oxidación de un sustrato. Ellas se obtienen a partir de microbios, plantas y animales. En la naturaleza las laccasas y peroxidases desempeñan un papel importante, p. ej. en la degradación biológica de lignina, por eso pueden ser aisladas entre otras cosas de los hongos de podredumbre blanca. Dichas enzimas ligninolíticas son capaces de transformar oxidativamente diferentes contaminantes ambientales (Jonas, U., Hammer, E., Schauer F., Bollag, J.-M.: Biodegradation 1998; 8: 321-328; Bollag, J.-M., Shuttlesworth, K.L., Anderson, D.H.: Appl Environ Microbiol 1988; 54: 3086-3091; Bumpus, J.A., Aust, S.D.: Bioessays 1986; 6: 166-170; Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D.A.: Science 1985; 228: 143-147).

DE-A-197 26 241 divulga un sistema de multicomponentes ampliado para el tratamiento de aguas residuales que puede contener entre otras cosas también oxidoreductasas obtenidas a partir de hongos de podredumbre blanca. Entre otras cosas puede emplearse también la laccasa en una concentración de 0,001 a 1 U/ml para el tratamiento de aguas residuales. El sistema de multicomponentes desarrollado para el tratamiento de aguas residuales puede emplearse también para síntesis orgánicas, p. ej. para la oxidación de alifatos insaturados o para la oxidación de alcoholes para obtener aldehídos. Ha resultado ventajoso según DE-A-24 02 452 efectuar oxidaciones mediadas por la laccasa en un sistema bifásico de agua y un disolvente orgánico.

US-A-5,389,356 y US-A-5,468,628 describen métodos de la oxidación o reducción selectiva, en la cual una peroxidasa sirve de catalizador generando radicales libres. Este método p. ej. es adecuado para degradar tetracloruro de carbono.

Además es conocido oxidar fenoles mediante la laccasa o peroxidasa, teniendo las soluciones reactivas un efecto antimicrobiano y pueden ser utilizadas en procesos industriales para la desgerminación. Una aplicación especial de la oxidación inofensiva con ayuda de tirosinasas y laccasas está descrita en US-A 6,015,683. Por lo tanto con la ayuda de la laccasa por intermediación se produce un reactivo colorante que permite la verificación espectrofotométrica de acetaminofén en soluciones acuosas.

En la fuerza de oxidación se basa también el efecto antimicrobiano conocido de las laccasas en presencia de oxígeno. Igualmente en una oxidación se basa la formación de derivados de fenoxazinona antimicrobiana eficaz bajo la influencia de laccasa. La laccasa y peroxidasa de manganeso se aprovechan de manera económica para los más diversos propósitos. Ellas blanquean el material que contiene lignina y se utilizan por eso en la industria papelera. De WO-A 95/01426 es sabido que los compuestos órgano-químicos, que consisten en al menos dos anillos aromáticos, pueden reforzar la actividad de la laccasa. Este refuerzo fue aprovechado para blanquear colorantes en soluciones o lignina y materiales que contienen lignina.

En US-A-4,478,683 es descrito impedir el crecimiento de microorganismos en la depuración de aguas residuales industrial por adición de laccasas y peroxidadas.

La laccasa y peroxidasa de manganeso fueron utilizadas en pocos casos para efectuar un acoplamiento de diferentes compuestos biológicos. Puesto que entonces se debe contar preferiblemente con hacer frente a los grupos funcionales esenciales para la eficacia, se puede esperar generalmente un empeoramiento de la eficacia. Probablemente por este motivo, los ensayos para utilizar la peroxidasa de manganeso y la laccasa para la derivatización de antibióticos se limitan a pocos ejemplos. En los ejemplos realizados hasta ahora no se logró el objetivo deseado de un refuerzo del efecto antimicrobiano. Por ejemplo se utilizó la laccasa para enlazar los antibióticos del grupo del ácido aureólico con hidroquinonas (Anyanwutaku, I.O., Petrowski, R.J., Rosazza, I.P.: Bioorg. Med. Chem. 1994; 2: 543-551). La actividad biológica de las sustancias de partida se perdió en este caso. Agematu *et al.* (Biosci. Biotechnol. Biochem. 57 (8), 1387-1388 (1993) describen la transformación del ácido 7-(4-hidroxifenilacetamido)-cefalosporínico por una oxidación fenólica catalizada por la laccasa. También aquí el producto de reacción era menos eficaz que la cefalosporina originaria. Uemtsu *et al.* (jpn. Kokai Tokkyo JP 05,163,281) emplean oxidadas para la oxidación de las cefalosporinas.

A partir del éster metílico de penicilina se obtienen bajo ciertas condiciones y el efecto de laccasa 3 tipos de dímeros diferentes, que son todos inactivos biológicamente (Agematu, H., Tsuchida, T., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T., Murano, S.: J. Antibiot. Tokyo. 1993; 46: 141-148). La síntesis enzimática de los dímeros del fenol y de penicilina está resumida por Agematu (Baioisainsu to Indasutori 1996, 54, 715-718).

Las enzimas utilizadas hasta ahora para la modificación de antibióticos como haloperoxidasa tienen un espectro del sustrato limitado. La cloración mediada por las haloperoxidasas solamente es aplicable en casos especiales.

Cuando los microorganismos están expuestos al efecto permanente de la concentración de antibióticos subletal, estos desarrollan resistencias a los antibióticos como parte genética de su mecanismo de adaptación programado a condiciones ambientales alternativas, es decir, ya no se inhiben por la concentración inhibitoria mínima originaria de la respectiva sustancia activa. Puesto, que el efecto de dosis subletales nunca se puede evitar completamente, se desarrolla una resistencia contra cualquier nueva sustancia activa antibiótica por parte de los microorganismos patógenos. Las sustancias activas formadas bajo la influencia de peroxidadas o laccasas con eficacia contra gérmenes vueltos resistentes no han sido descritas hasta ahora.

Debido a la problemática de la resistencia creciente existe ahora como antes una gran necesidad de antibióticos, que no se cubre por las sustancias activas correspondientes al estado de la técnica.

Esto rige particularmente para la utilización de antibióticos en caso de enfermedades infecciosas clínicamente difíciles de controlar. En caso de infecciones con gérmenes gram positivos actualmente sólo son suficientemente eficaces los antibióticos glicopéptidos. Los agentes patógenos gram positivos como los estafilococos y enterococos desarrollan cada vez más una resistencia múltiple. Pero también las enfermedades infecciosas causadas por agentes patógenos gram negativos en el futuro ya no podrán ser dominados clínicamente con seguridad. Igualmente en la medicina veterinaria las enfermedades infecciosas de animales útiles con estafilococos multirresistentes se vuelven cada vez más amenazadoras. Por una transmisión posible de gérmenes vueltos resistentes al ser humano amenaza un riesgo adicional.

La tarea basada en la invención consistía en seguir desarrollando sustancias biológicamente activas mediante biotransformación y haciéndolas utilizables como productos de acoplamiento con otras sustancias activas antimicrobianas para una utilización médica. La invención se basa particularmente en la tarea de cubrir la necesidad de acción existente por el aumento del desarrollo de resistencia de bacterias con respecto a los antibióticos convencionales, particularmente en la terapia de enfermedades infecciosas, en la medicina humana y veterinaria, mediante el desarrollo de un procedimiento de biotransformación, con el cual se pueden obtener sustancias activas desconocidas hasta ahora a partir de las sustancias activas antimicrobianas conocidas.

ES 2 346 183 T3

Esta tarea se soluciona según la invención mediante un procedimiento según las reivindicaciones.

Los sustratos son preferiblemente antibióticos β -lactámicos.

5 Según la invención pueden obtenerse compuestos a partir de estas sustancias activas antimicrobianas por transformación según un procedimiento conforme a las reivindicaciones 1 a 5, los cuales están caracterizados por el hecho de que se obtiene una eficacia no demostrable en las sustancias iniciales, preferiblemente contra gérmenes multirresistentes. Los compuestos que se pueden obtener por transformación según el procedimiento conforme a la invención pueden ser caracterizados además por el hecho de que la formación de resistencias por enlace covalente de moléculas con diferente mecanismo de acción y diferentes lugares de ataque moleculares. Se puede conseguir sin embargo también según la invención, por introducción de componentes hidrófilos y/o hidrófobos adicionales, una mejora de las características de aplicación sin cambiar el espectro de acción.

15 Según la invención se emplean preferiblemente enzimas que corresponden a la clasificación según la Nomenclatura internacional de enzimas (Enzym Nomenclature, Academic Press, Inc, 1992, S. 24-154) E C 1.10.3.2. (Lacease).

Si se realiza el procedimiento según la invención en una solución acuosa, ésta presenta preferiblemente un valor pH de 2-8, preferiblemente en caso de un pH de 3-5, así como temperaturas entre 5°C y 60°C.

20 Como sintones polifuncionales entran en consideración: los sintones de alquilo C1-C18; alqueno C1-C18; alquino C1-C18; alcoxi C1-C18; oxicarbonilo C1-C18; oxoalquilo C1-C18; alquilsulfanilo C1-C18; alquilsulfonilo C1-C18; sintones alquilimínicos C1-C18 o alquilamínicos. Se prefieren según la invención las moléculas aromáticas siguientes: los sintones aromáticos mono-, di- o policíclicos, respectivamente dotados opcionalmente de uno o varios grupos funcionales o sustituyentes del grupo de los halógenos; los sustituyentes tipo sulfo-, sulfona; sulfamina; sulfanilo-; amino-; amido-; nitro-; azo-; imino-; carboxi-; cianuro-; formil-; hidroxi-; halocarbonilo-; carbamilo-; carbamidoil-; fosfona; fosfonilo; alquilo C1-18; alqueno C1-18; alquino C1-18; alcoxi- C1-18; oxicarbonilo C1-18; oxoalquilo C1-18; alquilsulfanilo C1-18; alquilsulfonilo C1-18; alquilimino-C1-18 o alquilamino. Los ejemplos para dichos compuestos son sin excluir otros, aminofenoles, fenoles, así como derivados del ácido 2,5-benzoico dihidroxilado. Además entran en consideración sin excluir otros compuestos los siguientes: 3,4-dietoxianilina, 2-metoxi-p-fenilendiamina, 1-amino-4-betametoxietil-aminobenceno, (N-.beta.-metoxietil-p-fenilendiamina), 1-amino-4-bis-(.beta.hidroxi-etil)-aminobenceno, 2-metil-1,3-diaminobenceno (2,6-diaminotolueno), 2,4-diaminotolueno, ácido 1-amino-4-benceno-sulfónico, ácido 4-aminobenceno 1-N-metil sulfónico, 1-metil-2-hidroxi-4-aminobenceno (3-amino-o-cresol), 1-metoxi-2,4-diaminobenceno (2,4-diaminoanisoles), 1-etoxi-2,3-diamino-benceno (2,4-diaminofenol), 1-beta-hidroxietiloxi-2,4-diamino-benceno (2,4-diaminofenoxietanol), 1,3-dihidroxi-2-metilbenceno (2-metil resorcinol), 1,2,4-trihidroxibenceno, 1,2,4-trihidroxi-5-metilbenceno (2,4,5-trihidroxitolueno), 2,3,5-trihidroxitolueno, 1,4-fenilendiamina, 2,5-diaminotolueno, 2-cloro-1,4-fenilendiamina, 2-aminofenol, 3-aminofenol, 4-aminofenol, 1,3-fenilendiamina, 1,2,3-bencenotriol (pirogallol), 1,3-bencenodiol (resorcinol), 1,2-bencenodiol (pirocatechol), ácido 2-hidroxicinámico, ácido 3-hidroxicinámico, ácido 4-hidroxicinámico, ácido 2,3-diaminobenzoico, ácido 2,4-diaminobenzoico, ácido 3,4-diaminobenzoico, ácido 3,5-diaminobenzoico, metil-2,3-diaminobenzoato, etil-2,3-diaminobenzoato, isopropil-2,3-diaminobenzoato, metil-2,4-diaminobenzoato, etil-2,4-diaminobenzoato, isopropil-2,4-diaminobenzoato, metil-3,4-diaminobenzoato, etil-3,4-diaminobenzoato, isopropil-3,4-diaminobenzoato, metil-3,5-diaminobenzoato, etil-3,5-diaminobenzoato, isopropil-3,5-diaminobenzoato, ácido N,N-dietil-amida-3,4-diaminobenzoico, ácido N,N-dipropil-amida 3,4-diaminobenzoico, 3,4-dihidroxibenzaldehído, ácido antranílico, ácido 4-aminobenzoico, etilhidroquinona, ácido mandélico, o-nitrobenzaldehído, bencilimidazol, ácido salicílico, ácido 3-aminosalicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 5-aminosalicílico, metil-3-aminosalicilato, metil-4-aminosalicilato, metil-5-aminosalicilato, etil-3-aminosalicilato, etil-4-aminosalicilato, etil-5-aminosalicilato, propil-3-aminosalicilato, propil-4-aminosalicilato, propil-5-aminosalicilato, amida del ácido salicílico 4-aminotiofenol, 4-hidroxitiofenol, N,N-dimetil-1,4-fenilendiamina, N,N-dietil-1,4-fenilendiamina, N-fenil-1,2-fenilendiamina, 1,2-fenilendiamina, 2-nitroanilina, 3-nitroanilina, 2-cloroanilina 3-cloroanilina, 3-cloroanilina, 4-cloroanilina, 4-aminoacetanilida.

50 En el procedimiento según la invención se puede lograr una variación del valor pH óptimo utilizando laccasas recombinantes.

La reacción de acoplamiento según la invención puede tener lugar en su caso en presencia de al menos un mediador del grupo de hidroxilaminas y/o ácidos hidroxámicos y en su caso de un mediador del grupo de amidas.

Eventualmente los productos de reacción se pueden estabilizar después de la terminación de la reacción.

60 Se divulgan también compuestos que pueden obtenerse a partir de sustancias activas de diferentes clases por una biotransformación según la invención.

Los compuestos biológicamente activos divulgados pueden ser utilizados en la medicina humana y veterinaria así como en la protección fitosanitaria como sustancia activa única o en forma de preparados combinados.

65 Los compuestos biológicamente activos divulgados pueden ser utilizados particularmente en la lucha contra enfermedades infecciosas, preferiblemente como remedio con efecto antimicrobiano y antiviral para la aplicación local y/o sistémica, en caso de enfermedades infecciosas con gérmenes gram positivos o gram negativos, como antimicótico para la aplicación local y/o sistémica y como citostático en la medicina humana y veterinaria.

También están divulgados los medicamentos que contienen uno o varios de los compuestos divulgados.

Los compuestos obtenidos después de la biotransformación pueden ser empleados solos así como en combinación entre sí.

Por la introducción de componentes hidrófilos y/o hidrófobos adicionales se puede lograr según la invención una mejora de las características de aplicación del compuesto de partida. Los compuestos divulgados pueden emplearse particularmente como agentes tensioactivos límite.

Los compuestos divulgados que pueden ser obtenidos a partir de sustancias activas antimicrobianas por transformación según el procedimiento conforme a la invención, muestran ventajosamente una eficacia no demostrable en las sustancias de partida, preferiblemente contra gérmenes multirresistentes.

Los compuestos divulgados que pueden ser obtenidos a partir de sustancias activas antimicrobianas por transformación según el procedimiento conforme a la invención dificultan la creación de resistencias por el enlace covalente de moléculas con diferente mecanismo de acción y diferentes lugares de ataque moleculares logrado por la influencia de enzimas que forman radicales.

Sobre la base de una reacción de acoplamiento catalizada por las laccasas así como por enzimas que forman radicales similares a la laccasa es accesible según la invención un procedimiento de la biotransformación generalmente aplicable, con el cual pueden ser enlazadas las diferentes sustancias biológicamente activas que, como el grupo funcional, contienen grupos amínicos o hidroxílicos, de manera que se logre una mejora de la actividad biológica y/o una mejora de las características de aplicación. Las etapas características esenciales para la fabricación de los nuevos compuestos son las oxidaciones de un solo electrón enzimáticamente catalizadas, una formación enzimáticamente catalizada del radical superóxido o una formación enzimáticamente catalizada del radical arilo.

Sorprendentemente se consideró que por estas transformaciones enzimáticamente catalizadas serán disponibles sustancias activas con una actividad biológica claramente superior a las sustancias iniciales. Para estas etapas de reacción enzimáticamente catalizadas es necesaria la presencia de particularmente la laccasa según la invención. A este respecto se entienden bajo laccasas particularmente las enzimas resumidas en la clasificación EC 1. 10.3.2. Las laccasas son obtenidas preferiblemente a partir de hongos de las especies *Pycnoporus*, *Trametes*, *Coriolus*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Podospora*, *Phlebia* o *Myceliophthora* o por vía biológica.

Con el procedimiento según la invención pueden ser enlazadas las sustancias activas de diferentes clases de sustancias químicas. Las sustancias activas que deben ser compuestas presentan ventajosamente efectos biológicos con diferentes puntos de ataque. Sin embargo es también posible con el procedimiento según la invención componer una sustancia activa biológicamente activa con una sustancia sin efecto propio antimicrobiano, para mejorar las características de aplicación, p. ej. el comportamiento de distribución. Por la influencia según la invención de la laccasa sobre sustancias activas antimicrobianas de partida se obtienen nuevos compuestos biológicamente activos que presentan características de aplicación mejoradas. Era completamente sorprendente que particularmente los antibióticos β -lactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas y las carbapenemas puedan ser transformadas con el procedimiento según la invención manteniendo la eficacia antimicrobiana. Especialmente ventajoso es componer β -lactam por una reacción catalizada por la laccasa con sustancias activas quinoides e hidroquinoides. Las nuevas sustancias activas obtenibles por biotransformación según la invención muestran una eficacia antimicrobiana incluso contra gérmenes multirresistentes. Con ello se crean las condiciones para una aplicación de las nuevas sustancias activas en la medicina humana y veterinaria para la lucha contra enfermedades infecciosas. Las nuevas sustancias activas obtenibles con el procedimiento según la invención pueden aplicarse tanto de manera local como también sistémica solas así como en forma de preparados combinados.

Ejemplo 1

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida con ácido 6-aminopenicilánico mediante biotransformación

Metodología

1.1 Preparación de la solución enzimática

Cultivo de los hongos filamentosos

El cultivo de los hongos filamentosos se realizó en primer lugar sobre agar oblicuo (agar de malta) a una temperatura de 30°C durante 7 días y luego durante 7 días sobre placas de agar de malta a una temperatura de 30°C. Tres piezas de agar de malta de un tamaño de aprox. 1 cm², bien cubiertas fueron recortadas a continuación con una espátula estéril de una cultura de placa de agar y transferidas a un matraz de Erlenmeyer de 300 ml con 60 ml BSM. Este precultivo fue incubado a una temperatura de 30°C durante 7 días como cultivo estático.

El micelio formado en el precultivo de glucosa de los hongos filamentosos fue homogeneizado tres veces durante 10 seg. con ayuda de un aparato Ultra-Turrax con 17000 r.p.m. 2,5 ml del producto homogeneizado fueron sobre-inoculados para los experimentos en un matraz de Erlenmeyer de 100-ml con 25 ml BSM. El matraz y el fluido fueron esterilizados por separado, para evitar pérdidas de fluidos durante la esterilización por calor en el autoclave. Antes de la inoculación se llenó el fluido en el matraz. Estas fórmulas fueron suplementadas con una solución de Tween 80 al 0,05%. Los matraces fueron cultivados en un incubador agitador con 158 r.p.m. y a una temperatura de 30°C.

Cromatografía del intercambiador de aniones

Para la secreción reforzada de las enzimas ligninolíticas en cultivos de *T. versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus* se utilizó alcohol veratrílico. Puesto que este compuesto y sus metabolitos tienen un efecto perturbador en experimentos de incubación posteriores con filtrado de cultivo, su segregación se realizó con Q-sefarosa. Para ello, 1 ml de la matriz de intercambiador de aniones fue equilibrado tres veces con 100 ml de un tampón de histidina. A continuación, la Q-sefarosa equilibrada fue agitada lentamente con 80 ml de un cultivo filtrado sobre un agitador magnético a temperatura ambiente. Luego el sobrante acuoso fue filtrado de la Q-sefarosa mediante un filtro de fibra de vidrio GF-6, la matriz con respectivamente 10 ml de un tampón de histidina fue lavado 20 veces y la proteína fue eluida con 15 ml de un tampón de sal común-histidina.

Ultrafiltración

Para la comparación de los experimentos con el filtrado de cultivo se debería trabajar con la misma actividad enzimática en las fórmulas de incubación. Para eso era necesario limitar los excesos de cultivo purificados y diluirlos correspondientemente para los metabolismos. La concentración se realizó por ultrafiltración con microconcentradores Centricon-30 y Centriprep-30 en una centrífuga de refrigeración con 3000 r.p.m. y una temperatura de 4°C durante 60 min.

Desalado

Para los metabolismos con filtrado de cultivo era necesario desalar una muestra de proteínas limpiada y limitada. Sobre una columna de Sephadex G-25 superfino fueron aplicados 2,5 ml de la muestra y eluidos con 3,7 ml de un tampón de histidina.

El eluado de proteínas obtenido fue almacenado a una temperatura de -20°C.

1.2. Reacción de acoplamiento

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida es transformada en la relación equimolar con ácido 6-aminopenicilano (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Trametes versicolor*) durante 35 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del cuerpo básico de antibióticos ácido 6-aminopenicilánico con la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 66%.

El análisis del compuesto obtenido mediante métodos espectrométricos de masas resultó una masa de 411.

En la suma de los resultados respecto al análisis de estructura ha de adoptarse la siguiente estructura para el producto de acoplamiento obtenido:

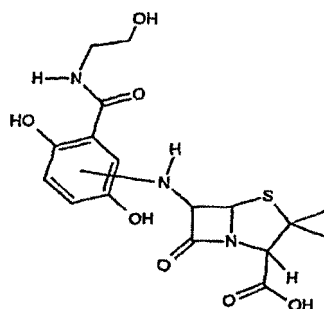


Fig.: Estructura propuesta para el producto de acoplamiento cruzado.

Ejemplo 2

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida con ácido 7-aminocefalosporínico mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida es transformada en la relación-equimolar con ácido 7-aminocefalosporínico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 35 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetónitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del cuerpo básico de antibióticos ácido 7-aminocefalosporínico con la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 68%.

Ejemplo 3

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida con ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida es transformada en la relación equimolar con ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Trametes versicolor*) durante 40 min a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción a 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante la fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente es depurado con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del cuerpo básico de antibióticos ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico con la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 73%.

El análisis del compuesto obtenido mediante métodos espectrométricos de masas dio como resultado una masa de 409. Los resultados de los análisis espectroscópicos de resonancia nuclear se resumen en la tabla siguiente. Para la comparación de las señales ¹H-NMR ha sido examinado también la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida. Las mediciones se efectuaron en el disolvente DMSO-d₆ con el estándar interno TMS con un ARX 300 (Bruker, Karlsruhe).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 346 183 T3

TABLA

Comparación de espectros $^1\text{H-NMR}$ del producto de acoplamiento cruzado 3 con el compuesto de partida 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida

Resonancias [ppm] producto de acoplamiento cruzado 3	Multiplicidad, constante de acoplamiento	Resonancias [ppm] 2,5- dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida	Multiplicidad, constante de acoplamiento	Número y tipo de átomos, asignación
12,79	s	-	-	1H, COOH
9,98	s	11,60	s,	1H, OH am C2, $\text{C}_6\text{H}_{2(3)}$
9,66	s	8,98	s	1H, OH am C5, $\text{C}_6\text{H}_{2(3)}$
8,50	t, $^3J = 5,3$	8,69	t, $^3J = 5,3$	1H, NH, $\text{CH}_2\text{-NH}$
6,73	s	7,27	d(s), $^4J = 2,8$	1H, H am C6, $\text{C}_6\text{H}_{2(3)}$
6,65	s	6,85	dd, $^3J = 8,7$, $^4J = 2,8$	1H, H am C4, $\text{C}_6\text{H}_{2(3)}$
-		6,73	d, $^3J = 8,7$	1H, H am C3, $\text{C}_6\text{H}_{2(3)}$
6,42	d, $^3J = 9,3$	-		1H, NH am anillo _-lactámico
5,85	t, $^3J = 5,4$	4,78	t, $^3J = 5,5$	1H, OH, $\text{CH}_2\text{-OH}$
5,48	m, $^3J = 9,3$, $^3J = -4,4$			1H, H7 anillo _-lactámico
5,02	m, $^3J = 4,4$	-		1H, H6 anillo _-lactámico
3,63	m	3,54	m	2H, CH_2 , $\text{CH}_2\text{-OH}$
3,49	m	3,36	m	2H, CH_2 , $\text{CH}_2\text{-NH}$
3,29/3,50	ABq, $^2J = 17,2$	-		2H, CH_2 , anillo heterocíclico
1,91	s	-		3H, CH_3

En la suma de los resultados respecto al análisis de estructura ha de adoptarse el producto de acoplamiento obtenido para la estructura siguiente:

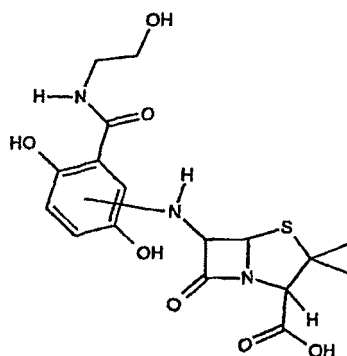


Fig.: Estructura propuesta para el producto de acoplamiento cruzado.

Ejemplo 4

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida con Amoxicilina mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida es transformada en la relación equimolar con amoxicilina (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Trametes versicolor*) durante 50 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del antibiótico amoxicilina con 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 55%.

El análisis del compuesto obtenido mediante métodos espectrométricos de masas resultó una masa de 560. Los resultados de los análisis espectroscópicos de resonancia nuclear se resumen en la tabla siguiente. Para la comparación de las señales $^1\text{H-NMR}$ fueron examinados también la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida (véase la tabla en el ejemplo 3) y la amoxicilina. Las mediciones se realizaron en el disolvente CD_3OD con el estándar interno TMS con un ARX 300 (Bruker, Karlsruhe).

TABLA

$^1\text{H-NMR}$ - Comparación de los espectros del producto de acoplamiento cruzado 4 con el compuesto de partida amoxicilina

Resonancias [ppm] producto de acoplamiento cruzado 4	Multiplicidad	Resonancias [ppm] amoxicilina	Multiplicidad	Número y tipo de átomos, asignación
7,48	d, $^3J = 7,2$	7,49	d, $^3J = 7,2$	2H, H am C3/C5, C_6H_4
6,85	d, $^3J = 7,2$	6,83	d, $^3J = 7,2$	2H, H am C2/C6, C_6H_4
6,74	d, $^3J = 8,6$	-	-	1H, H am C3, C_6H_2
6,63	d, $^3J = 8,6$	-	-	1H, H am C4, C_6H_2
5,99	m, $^3J = 4,2$	5,99	m, $^3J = 4,2$	1H, H7 anillo β - lactámico
5,92	m, $^3J = 4,2$	5,92	m, $^3J = 4,2$	1H, H6 anillo β - lactámico
4,31	s	4,31	s	1H, CH, anillo heterocíclico
3,70	m	-	-	2H, CH_2 , $\text{CH}_2\text{-OH}$
3,49	m	-	-	2H, CH_2 , $\text{CH}_2\text{-NH}$
1,57	s	1,57	s	3H, CH_3 , anillo heterocíclico
1,50	s	1,50	s	3H, CH_3 , anillo heterocíclico

En la suma de los resultados respecto al análisis de estructura ha de adoptarse el producto de acoplamiento obtenido para la estructura siguiente:

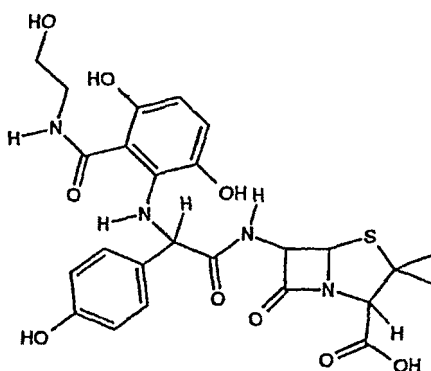


Fig.: Estructura propuesta para el producto de acoplamiento cruzado.

Ejemplo 5

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por el acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida con ampicilina mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida es transformada en la relación equimolar con ampicilina (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Trametes versicolor*) durante 50 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente es depurado con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del antibiótico ampicilina con 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 75%.

El análisis del compuesto obtenido mediante métodos espectrométricos de masas dio como resultado una masa de 544.

En la suma de los resultados respecto al análisis de estructura ha de adoptarse la estructura siguiente para el producto de acoplamiento obtenido:

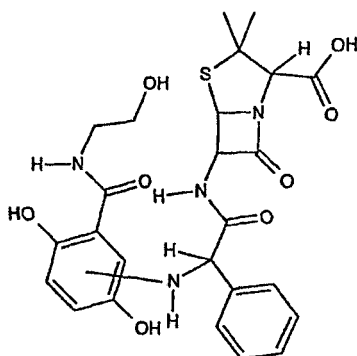


Fig.: Estructura propuesta para el producto de acoplamiento cruzado.

Ejemplo 6

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por el acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida con sulfonamidas mediante biotransformación

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida es transformada en la relación equimolar con p-aminobenzenosulfonamida (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 30 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento de la sustancia biológicamente activa de p-aminobenzenosulfonamida con la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 74%.

Ejemplo 7

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por el acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida con ácidos salicílicos sustituidos mediante biotransformación

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida es transformada en la relación equimolar con ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido p. ej. a partir de *Trametes versicolor* o *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 50 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico con la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietyl)-benzamida conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 73%.

Ejemplo 8

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de ácidos y ésteres 2,5-dihidroxibenzoicos con el ácido 6-aminopenicilánico mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

El éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico es transformado en la relación equimolar con ácido 6-aminopenicilánico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 1 h. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante se depura después de la eliminación del disolvente con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del cuerpo básico de antibióticos ácido 6-aminopenicilánico con el éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz con alta actividad hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 66%.

Ejemplo 9

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por el acoplamiento de ácidos y ésteres 2,5-dihidroxibenzoicos con ácido 7-aminocefalosporínico mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

El éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico es transformado en la relación equimolar con ácido 7-aminocefalosporínico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de p. ej. *Trametes versicolor*) durante 1 h. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del cuerpo básico de antibióticos ácido 7-aminocefalosporínico con el éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 63%.

Ejemplo 10

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por el acoplamiento de ácidos y ésteres 2,5-dihidroxibenzoicos con ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

El éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico es transformado en relación equimolar con ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 1 h. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución-de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante la fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento de ácidos y ésteres 2,5-dihidroxibenzoicos con mit ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 71%.

Ejemplo 11

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de ácidos y ésteres 2,5-dihidroxibenzoicos con amoxicilina mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

El éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico es transformado en relación equimolar con amoxicilina (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Trametes versicolor*) durante 45 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante la fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del antibiótico amoxicilina con el éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 66%.

En la suma de los resultados para el análisis de estructura ha de suponerse el producto de acoplamiento obtenido para la estructura siguiente:

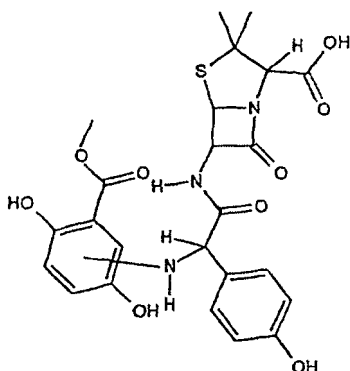


Fig.: Estructura propuesta para el producto de acoplamiento cruzado.

Ejemplo 12

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de ácidos y ésteres 2,5-dihidroxibenzoicos con ampicilina mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

El éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico es transformado en relación equimolar con ampicilina (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de *Trametes versicolor*) durante 45 min a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del antibiótico ampicilina con el éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 56%.

Ejemplo 13

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de ácidos y ésteres del ácido 2,5-dihidroxibenzoico con sulfonamidas mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

El éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico es transformado en relación equimolar con p-aminobenzenosulfonamida (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de por ejemplo *Trametes versicolor* o *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 45 min a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento del antibiótico p-aminobenzenosulfonamida con el éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 66%.

Ejemplo 14

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de ácidos y ésteres 2,5-dihidroxibenzoico con ácidos salicílicos sustituidos mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

El éster metílico del ácido 2,5-dihidroxibenzoico es transformado en la relación equimolar con ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de p. ej. *Trametes versicolor* o *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 45 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

Resultado: un acoplamiento de ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico con el éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido El rendimiento del producto de acoplamiento es de 63%.

Ejemplo 15

Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de ácido hidrocafeico con ácido 6-aminopenicilánico mediante biotransformación

Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

El ácido 3(3,4-dihidroxifenil)-propiónico es transformado la relación equimolar con ácido 6-aminopenicilánico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido

ES 2 346 183 T3

a partir de *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 2 h. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo.

- 5 Resultado: un acoplamiento del cuerpo básico de antibióticos ácido 6-aminopenicilánico con el ácido hidrocafeico conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz con alta actividad hasta ahora desconocido.

Ejemplo 16

10 *Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida con mercaptanos mediante biotransformación*

15 Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida es transformada en relación equimolar con 3-mercapto-1,2,4-triazol (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de p. ej. *Trametes versicolor* o *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 50 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución del producto se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

25 Resultado: un acoplamiento del 3-mercapto-1,2,4-triazol con la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida conduce a un compuesto antimicrobiano eficaz hasta ahora desconocido. El rendimiento del producto de acoplamiento es de 45%.

Ejemplo 17

30 *Fabricación de nuevas sustancias activas antimicrobianas por acoplamiento de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida con mercaptanos mediante biotransformación*

35 Metodología: la fabricación de la solución enzimática se realizó según el ejemplo 1.

La 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida es transformada en relación equimolar con ácido 2-mercapto-nicotínico (1 mM) en un tampón de acetato de sodio (pH 5, 0,02 M) bajo la influencia de una laccasa (975 nmol/2 ml/min; obtenido a partir de p. ej. *Trametes versicolor* o *Pycnoporus cinnabarinus*) durante 50 min. a temperatura ambiente. Para favorecer la velocidad de transmisión se agita la solución de reacción con 100 r.p.m. Para la reelaboración la solución de reacción es extraída mediante una fase sólida de octadecano. La elución de los productos se realiza con acetato de etilo o acetonitrilo. El residuo restante después de la eliminación del disolvente se depura con una cromatografía líquida de alta resolución.

45 Resultado: un acoplamiento del ácido 2-mercapto-nicotínico con la 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida conduce a compuestos antimicrobianos eficaces hasta ahora desconocidos. El rendimiento de productos de acoplamiento es de 55%.

Ejemplo 18

50 *Comprobación de los productos de acoplamiento según la invención sobre actividad antimicrobiana*

Metodología: se realizó la prueba de difusión de agar según Burkhardt (Burkhardt, Fr (editor) Diagnóstico microbiológico. Georg-Thieme Verlag Stuttgart, Nueva York 1992, pag. 724). Las sustancias de prueba se aplican en concentraciones escalonadas sobre plaquetas de prueba Sensi-Disc (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, USA). Para el Test de prueba fueron utilizados Mueller-Hinton II-Agar en placas de Petri Stacker (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, USA). Como cepa de prueba fueron seleccionados la cepa *S. aureus* ATCC 6538. La siembra de esta cepa de prueba se eligió de manera que después de una incubación de 16-20 h. se desarrollan colonias individuales densas pero no confluentes. Tras el secado de los caldos de cultivo inoculados se ponen como máximo 6 plaquetas de prueba con una ligera presión sobre la superficie de agar. Transcurridas unas 18 + 2 h. de incubación a 36°C se miden los halos de inhibición. Para la garantía de calidad interna se comprobó el método con *S. aureus* ATCC 25923.

65 Resultados: las sustancias activas obtenibles por biotransformación según la invención son eficaces antibacteriales (tab. 1). La máxima eficacia antimicrobiana se observa en los productos de acoplamiento según el ejemplo 4, 9 y 10.

ES 2 346 183 T3

TABLA 1

Eficacia antibacteriana en la prueba de difusión de agar según Burkhardt contra el S. aureus ATCC 6538

Sustancia activa	Halo de inhibición (mm)			
	250 µg	125 µg	50 µg	10 µg
Producto de acoplamiento de ácido 6-aminopenicilánico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 1	24	22	18	12
Producto de acoplamiento de ácido 7-aminocefalosporínico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 2	22	18	14	r
Producto de acoplamiento de ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 3	24	22	18	r
Producto de acoplamiento de amoxicilina y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 4	>30	>30	>30	>30
Producto de acoplamiento de p-aminobencenosulfonamida y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 6	22	20	r	r
Producto de acoplamiento de ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 7	10	r	r	r
Producto de acoplamiento de ácido 6-aminopenicilánico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 8		30	24	r
Producto de acoplamiento de ácido 7-aminocefalosporínico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 9		10	r	r
Producto de acoplamiento de éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico y ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico según el ejemplo 10		30	14	r
Producto de acoplamiento de amoxicilina y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 11	>30	>30	>30	>30
Producto de acoplamiento de p-aminobencenosulfonamida y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 13	10	r		
Producto de acoplamiento de ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 14	10	r		

Ejemplo 19

Prueba de eficacia antimicrobiana en gérmenes multirresistentes

5 Metodología: la prueba se realizó en un test de difusión de agar según la método descrita en el ejemplo 13. Como germen de prueba se utilizó la cepa de referencia multirresistente *S. aureus* “cepa del norte de Alemania” (Smith Kline Beecham).

10 Resultados: los productos de acoplamiento sorprendentemente son también parcialmente altamente eficaces contra gérmenes multirresistentes (Tab. 2). La eficacia de las sustancias de partida se supera claramente (Tab. 4)

TABLA 2

15 *Eficacia antibacteriana en la prueba de difusión de agar según Burkhardt contra el S. aureus “cepa del norte de Alemania”*

	Sustancia activa	Halo de inhibición mm			
		250 µg	125 µg	50 µg	10 µg
20	Producto de acoplamiento de ácido 6-aminopenicilánico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 1	20	18	16	r
25	Producto de acoplamiento de ácido 7-aminocefalosporínico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 2	28	24	20	r
30	Producto de acoplamiento de ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico y de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 3	24	22	20	r
35	Producto de acoplamiento de amoxicilina y 10 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 4	24	22	18	10
40	Producto de acoplamiento de p-aminobencenosulfonamida y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 6	26	22	18	r
45	Producto de acoplamiento de ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 7	r	r	r	r
50	Producto de acoplamiento de ácido 6-aminopenicilánico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 8		16	r	r
55	Producto de acoplamiento de ácido 7-aminocefalosporínico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 9		r	r	r
60	Producto de acoplamiento de éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico y ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico según el ejemplo 10		r	r	r
65	Producto de acoplamiento de amoxicilina y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 11	20	16	10	R
	Producto de acoplamiento de p-aminobencenosulfonamida y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 13	16	12		
	Producto de acoplamiento de ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 14	r	r		

Ejemplo 20

Metodología: la prueba se realizó en el test de difusión de agar según el método descrito en el ejemplo 13. Como germen de prueba se utilizó la cepa 99847 *S. epidermidis* coagulasa negativo multirresistente aislada del material del paciente.

Resultados: también contra los estafilococos coagulasa negativa difícilmente combatibles, que desempeñan un papel p. ej. en la colonización de materiales de catéter y pertenecen por eso a los gérmenes nosocomiales problemáticos, son eficaces los productos de acoplamiento según la invención. La eficacia de las sustancias de partida se supera claramente (Tab. 4)

TABLA 3

Eficacia antibacteriana en la prueba de difusión de agar según Burkhardt contra S. epidermidis

Sustancia activa	Halo de inhibición (mm)			
	250 µg	125 µg	50 µg	10 µg
Producto de acoplamiento de ácido 6-aminopenicilánico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 1	r	r	r	r
Producto de acoplamiento de ácido 7-aminocefalosporínico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 2	22	22	r	r
Producto de acoplamiento de ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 3	20	24	r	r
Producto de acoplamiento de amoxicilina y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 4	30	28	18	r
Producto de acoplamiento de p-aminobencenosulfonamida y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 6	26	20	r	r
Producto de acoplamiento de ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico y 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida según el ejemplo 7	r	r	r	r
Producto de acoplamiento de ácido 6-aminopenicilánico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 8				
Producto de acoplamiento de ácido 7-aminocefalosporínico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 9		14	r	r

5	Producto de acoplamiento de éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico y ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico según el ejemplo 10		r	r	r
10	Producto de acoplamiento de amoxicilina y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 11	20	20	14	r
15	Producto de acoplamiento de p-aminobencenosulfonamida y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 13	12	r		
20	Producto de acoplamiento de ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico según el ejemplo 14	r	r		

TABLA 4

Eficacia antimicrobiana de las sustancias de partida

Sustancia activa	Concentración/ disc	Tamaño del halo de inhibición (mm)	
		S. aureus "cepa nórdica"	S. epidermidis
Acetato de etilo	0,25	r	r
Éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico	0,25 mg	r	r
2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamid	0,25 mg	22	22
	0,05 mg	14	r
p-aminobencenosulfonamida	0,25 mg	r	r
Ácido 4-amino-2-hidroxibenzoico	0,25 mg	r	r
Amoxicilina	0,25 mg	16	24
	0,12 mg	14	20
	0,05 mg	10	18
	0,01 mg	r	12

Ejemplo 21

Método para la estabilización de los productos de acoplamiento según la invención

Para el aumento de la estabilidad del producto de acoplamiento cruzado de una fórmula equimolar de amoxicilina y éster metílico de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, preparado según el ejemplo 10, se desarrolló un método de extracción especial en fases sólidas de octadecano. A tal objeto, la fase sólida se activó mediante metanol y se equilibró con agua destilada. A continuación fueron aplicados x ml de la fórmula de acoplamiento cruzado acuoso aplicada y después del ligamiento de los compuestos durante 20 min se secaron en la corriente de aire. Sigue una etapa de lavado con una mezcla de 10% de metanol/90% de agua destilada. La elución del producto de acoplamiento cruzado se realizó igualmente con 100% de acetonitrilo desgasificado. El extracto obtenido de esta manera se almacenó en oscuridad a 4°C.

Resultado: El producto de acoplamiento es estable dentro del período de observación de 21 d.

Documentos citados en la descripción

Esta lista de los documentos relacionados por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente mencionados en la descripción

- US 5695951 A [0006]
- US 5468628 A [0010]
- US 5939299 A [0006]
- US 6015683 A [0011]
- WO 0015771 A [0006]
- WO 9501426 A [0012]
- DE 19726241 A [0009]
- US 4478683 A [0013]
- DE 2402452 A [0009]
- JP 05163281 B [0014]
- US 5389356 A [0010]

Bibliografía no de patente relacionada en la descripción

• Tieraufzucht als Ergotropika und im Pflanzenschutz als Herbizide, Insektizide, Pestizide, Akarizide, Nematizide, Molluskizide (Cría de animales como sistema ergotrópico y en la protección fitosanitaria como herbicidas, insecticidas, pesticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas. Spektrum Akademischer Verlag 1992. [0002]

- U. Gräfe Biochemie der Antibiotika. Spektrum Akademischer Verlag 1992. [0003]
- Jonas, U; Hammer, E; Schauer F.; Bollag, J.-M.; *Biodegradation*, 1998, vol. 8, 321-328 [0008],
- Bollag, J.-M. Shuttleworth, K.L. Anderson, D.H. *Appl Environ Microbiol*, 1988, vol. 54, 3086-3091 [0008]
- Bumpus, J.A. Aust, S.D. *Bioessays*, 1986, vol. 6, 166-170 [0008]
- Bumpus, J.A. Tien, M. Wright, D.A. 1985 *Science*, 1985, vol. 228, 143-147 [0008]
- Anyanwutaku, I.O. Petrowski, R.J. Rosazza, I.P. *Bioorg. Med. Chem.*, 1994, vol. 2, 543-551 [0014]
- Agematu et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993, vol. 57, no. 8. 1387-1388 [0014]
- Agematu, si. Ts?chida, T. Kominato, K. Shibamoto, N. Yoshioka, T. Nishida, H. Okamoto, R. Shin, T. Murano, S. J. *Antibiot. Tokyo.*, 1993, vol. 46, 141-148 [0015]
- Baioasainsu to Indasutori 1996, 1996, vol. 54, 715-718 [0015]
- Enzym Nomenclature Academic Press, Inc. 1992. 24-154 [0024]
- Mikrobiologische Diagnostik. Georg-Thieme Verlag 1992. 724- [0109]

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de fabricación de sustancias biológicamente activas a partir de medicamentos, **caracterizado** por el hecho de que los medicamentos son antibióticos β -lactámicos y por que por el efecto de la enzima que forma radicales laccasa EC 1.10.3.2. (clasificación según la Nomenclatura internacional de enzimas (Enzym Nomenclature, Academic Press, Inc, 1992, pags. 24-154)) se pueden obtener productos de acoplamiento con enlaces heteromoleculares conteniendo moléculas aromáticas como compuestos con un espectro de actividad modificada que presentan un comportamiento de repartición modificado con la medida de que la molécula aromática que está sustituida es el benceno.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual los productos de acoplamiento son obtenidos en una solución acuosa con un valor pH de 2 a 8 a temperaturas comprendidas entre 5°C y 60°C.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 y/o 2, en el cual la molécula aromática está dotada opcionalmente de uno o varios grupos funcionales o sustituyentes del grupo de los halógenos; los sustituyentes tipo sulfo-; tipo sulfona; sulfamino; sulfanilo; amino; amido; nitro; azo; imino; carboxilo; ciano; formil; halocarbonilo; carbamilo; carbamidoil; fosfona; fosfonilo; alquilo C1-18; alquenilo C1-18; alquinilo C1-18; alcoxi C1-18; oxicarbonilo C1-18; oxoalquilo C1-18; alquilsulfanilo C1-18; alquilsulfonilo C1-18; alquilimino C1-18 o alquilamino.

20 4. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que la reacción de acoplamiento tiene lugar en presencia de al menos un mediador del grupo de hidroxilaminas y/o ácidos hidroxámicos y en su caso un mediador del grupo de las amidas.

25 5. Procedimiento según la reivindicación 1 a 4, **caracterizado** por el hecho de que los productos de reacción están estabilizados una vez terminada la reacción.

30

35

40

45

50

55

60

65