

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 107**

51 Int. Cl.:
C12N 9/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07114433 .1**
96 Fecha de presentación: **06.03.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1854877**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Procedimiento para la desacilación de lipopéptidos cíclicos**

30 Prioridad:
08.03.1996 JP 5138696
24.07.1996 JP 19420796

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2012

73 Titular/es:
ASTELLAS PHARMA INC.
3-11, NIHONBASHI-HONCHO 2-CHOME, CHUO-
KU
TOKYO, JP

72 Inventor/es:
Ueda, Satoshi;
Tanaka, Miho;
Ezaki, Masami;
Sakamoto, Kazutoshi;
Hashimoto, Seiji;
Oohata, Nobutaka;
Tsuboi, Masaru y
Yamashita, Michio

74 Agente/Representante:
Espiell Volart, Eduardo María

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).

ES 2 379 107 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la desacilación de lipopéptidos cíclicos

Esta solicitud es una solicitud divisional de la patente EP-97905455.8.

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a la tecnología enzimática.

La presente invención se refiere a una nueva acilasa capaz de desacilar la cadena lateral acilo de un compuesto lipopeptídico cíclico y a un procedimiento de desacilación en el que se utilice la misma.

10 Más concretamente, la invención se refiere a una nueva acilasa adaptada para desacilar la cadena lateral acilo de la sustancia FR901379 (descrita en la patente japonesa Kokai Tokkyo Koho H3-184921), la cual es producida por el microorganismo Coleophoma sp. F-11899 (FERM BP-2635), o de un análogo de la sustancia FR901379 y a un procedimiento de desacilación en el que se use la misma.

TÉCNICA ANTERIOR

Existe una necesidad constante de una acilasa capaz de desacilar la cadena lateral acilo de un compuesto lipopeptídico cíclico, especialmente de dicha sustancia FR901379 o análogo, con una buena eficacia.

15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han investigado extensamente en búsqueda de una nueva acilasa capaz de desacilar la cadena lateral acilo de un lipopéptido cíclico representado por la sustancia FR901379 o sus análogos, tales como equinocandina B y aculeacina A. Como resultado, han descubierto una acilasa producida por Streptomyces anulatus con la cual se alcanza eficazmente la desacilación objetivo.

20 Esta nueva acilasa de lipopéptidos cíclicos y el procedimiento de desacilación en el cual se utilice la misma se describen ahora en cuanto a sus aspectos principales.

En primer lugar, se describe el microorganismo productor de la acilasa de lipopéptidos cíclicos.

El microorganismo productor de la nueva acilasa de lipopéptidos cíclicos es Streptomyces sp. 6907 (FERM BP-5809 depositado en el NIBH tal como se menciona más adelante).

25 A continuación se describen las características de esta cepa.

La cepa productora de la nueva acilasa de lipopéptidos cíclicos denominada Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809) (denominada en lo sucesivo de forma abreviada cepa n° 6907 (FERM BP-5809)) se aisló por primera vez de una muestra de tierra recogida en la prefectura de Fukushima. A continuación se describen las características bacteriológicas de esta cepa n° 6907 (FERM BP-5809).

30 Características de cultivo

En la tabla 5 se resumen las características de cultivo de la cepa n° 6907 (FERM BP-5809) en agar extracto de levadura-extracto de malta, agar avena, agar almidón-sales inorgánicas, agar glicerina-asparagina, agar peptona-extracto de levadura-hierro y agar tirosina tras una incubación de 14 días a 30 °C y los resultados obtenidos por microscopía óptica y electrónica de barrido para los crecimientos respectivos. Las descripciones de color presentadas a continuación corresponden a la nomenclatura definida en el Methuen Handbook of Colour, Methuen, Londres, 1978.

35

Tabla 5. Características de cultivo de la cepa n° 6907 (FERM BP-5809)

Medio	Características de cultivo
Agar extracto de levadura-extracto de malta (ISP-2)	C: bueno A: abundante, gris amarillento, blanco (4A2) R: naranja grisáceo (5B6) S: ninguno
Agar avena (ISP-3)	C: moderado A: abundante, gris azulado (22C2) R: marrón claro (4D4) S: ninguno
Agar almidón-sales inorgánicas (ISP-4)	C: bueno A: abundante, gris azulado (19C2) R: marrón (6F4) S: ninguno
Agar glicerina-asparagina (ISP-S)	C: bueno

	A: abundante, gris azulado (22B2) R: marrón rojizo (8E4) S: ninguno
Agar peptona-extracto de levadura-hierro (ISP-6)	C: moderado A: ninguno R: marrón grisáceo (9F3) S: marrón oscuro
Agar tirosina (ISP-7)	C: bueno A: moderado, blanco amarillento (4A2) R: magenta oscuro (13F3) S: marrón oscuro
Códigos: C: crecimiento, A: micelio aéreo, R: color del reverso, S: pigmento soluble	

El color del micelio aéreo se encontraba entre gris amarillento y gris azulado, el color de crecimiento del reverso estaba entre marrón claro y marrón y los pigmentos intracelulares no eran sensibles a pH. En caldo de triptona-extracto de levadura, agar peptona-extracto de levadura-hierro y agar tirosina se produjeron pigmentos melanoides.

5 Características fisiológicas

En la tabla 6 se resumen las características fisiológicas de la cepa nº 6907 (FERM BP-5809).

Tabla 6. Características fisiológicas de la cepa nº 6907 (FERM BP-5809)

Parámetros	Resultados
Intervalo de temperatura para el crecimiento	9,0 - 40,0 °C
Licuefacción de gelatina	+
Coagulación de leche	+
Peptonización de leche	-
Hidrólisis de almidón	+
Producción de pigmentos melanoides	+
Utilización de carbono:	
D-glucosa	+
L-arabinosa	+
D-xilosa	+
Inositol	+
Manitol	+
D-fructosa	+
L-ramnosa	+
Sacarosa	+
Rafinosa	+
+: positivo, ±: débilmente positivo, -: negativo	

10 Esta cepa utilizó todas las fuentes de carbono ensayadas. No peptonizó la leche. El intervalo de temperatura para el crecimiento se encontraba entre 9,0 y 40,0 °C.

15 El micelio vegetativo de la cepa nº 6907 (FERM BP-5809) se desarrolló bien y se ramificó irregularmente pero sin fragmentarse. El micelio aéreo que se extendía desde el micelio vegetativo se ramificó monopódicamente para constituir cadenas de esporas alargadas. La morfología de las cadenas de esporas del micelio aéreo era recta-flexuosa o de bucles incompletos, perteneciendo así al tipo RF o RA de acuerdo con la clasificación de Pridham y col. (Pridham, T.G. y col.: Appl. Microbiol., 6:54, 1958). Cada cadena de esporas se compone de 20 o más esporas. La espora presenta una superficie lisa y es cilíndrica. El tamaño de las esporas es de 0,5-0,7 x 0,7-1,3 µm. No se observaron esclerocios, esporangios ni zoosporas.

Tipo de pared celular

20 En cuanto a la composición de aminoácidos de la pared celular, se analizó el lisado celular completo mediante el método de Becker y col. (Becker, B., M. P. Lechevalier, R. E. Gordon y H. A. Lechevalier: Rapid differentiation between Nocardia and Streptomyces by paper chromatography of whole-cell hydrolysates: Appl. Microbiol., 12:421-423, 1964) y el método de Yamaguchi (Yamaguchi, T.: Comparison of the cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes: J. Bacteriol., 89:444-453, 1965). El análisis indicó la existencia de ácido LL-diaminopimélico. Por lo tanto, la pared celular de esta cepa se consideró de tipo I.

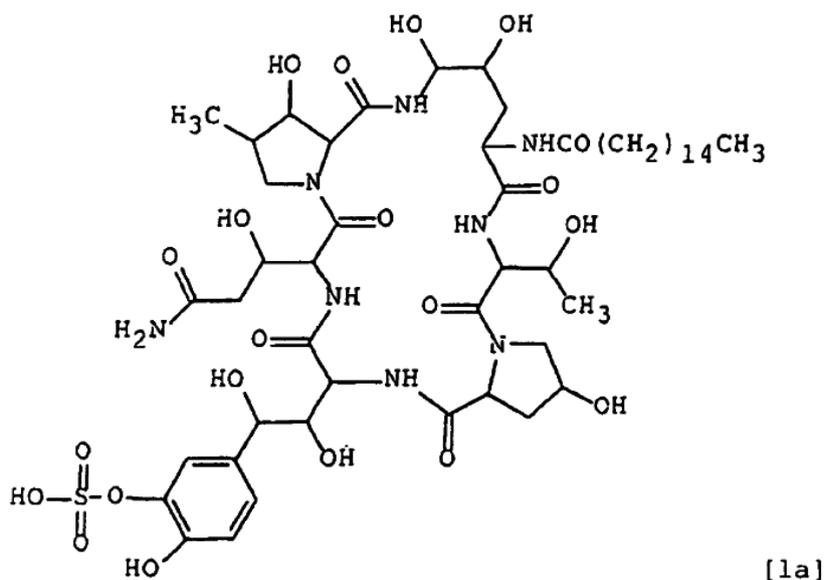
25 En base a la observación morfológica y el análisis químico anteriores, se consideró que la cepa nº (FERM BP-5809) pertenece al género Streptomyces de acuerdo con la clasificación taxonómica de Pridham y col. (Pridham, T. G. y col.: Appl. Microbiol., 6:54, 1958). Por consiguiente, se compararon las características de esta cepa con las de Streptomyces species descritas en la bibliografía, a saber, en Shirling y col. (Shirling, E. B. y D. Gottlieb: Cooperative Description of Type Culture of Streptomyces. 2. Species descriptions from first study, Intern. J. Syst. Bacteriol., 18:69-189, 1968;

Shirling, E.B. y D. Gottlieb: Cooperative Description of Type Culture of Streptomyces. 3. Additional species descriptions from first and second studies, Intern. J. Syst. Bacteriol., 18:279-392, 1968; Shirling, E. B. y D. Gottlieb: Cooperative Description of Type Culture of Streptomyces. 4. Species descriptions from second, third and fourth studies, Intern. J. Syst. Bacteriol., 19:391-512, 1969; Skerman y col. (Skerman, V. B., V. McGowan y P. H. A. Sneath: Approved List of Bacterial Names, Amended Edition, American Society for Microbiology, Washington D. C., 1989); y Moore y col. (Moore, W. E., E. P. Cato y L. V. H. Moore: Index of Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes, American Society for Microbiology, Washington D. C., 1992). La comparación no permitió indicar una especie con la cual se pudiera identificar y, por lo tanto, esta cepa se denominó *Streptomyces* sp. n° 6907 (FERM BP-5809).

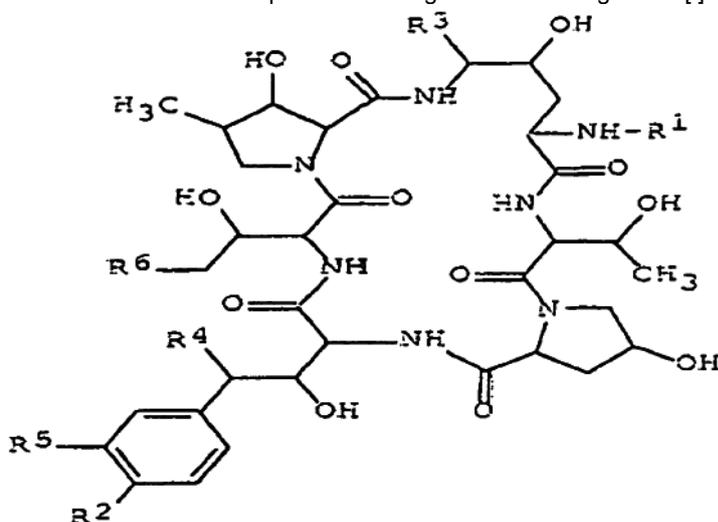
Esta *Streptomyces* sp. n° 6907 (FERM BP-5809) se depositó originalmente el 8 de marzo de 1996 en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (NIBH, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) (código ZIP 305) bajo el número de acceso FERM P-15506, y posteriormente se depositó de nuevo bajo el número de acceso FERM BP-5809 de acuerdo con el Tratado de Budapest del 3 de febrero de 1997.

La expresión "compuesto lipopeptídico cíclico" tal como se utiliza en esta memoria descriptiva se refiere a un compuesto que presenta un anillo polipeptídico y, en tal anillo, un grupo "acilamino" como cadena lateral, opcionalmente con o sin una o más cadenas laterales distintas.

La sustancia FR901379, la cual es un ejemplo representativo de dicho "compuesto lipopeptídico cíclico", es una sustancia antifúngica conocida producida por el microorganismo *Coleophoma* sp. F-11899 (FERM BP-2635) (descrito en la patente japonesa Kokai Tokkyo Koho H3-184921) y que presenta la siguiente fórmula química [1a]:



El "análogo de la sustancia FR901379" es un compuesto de la siguiente fórmula general [I] o una sal del mismo



[en la que

R¹ es acilo,

R² es hidroxilo o aciloxi,

R³ es hidrógeno o hidroxilo,

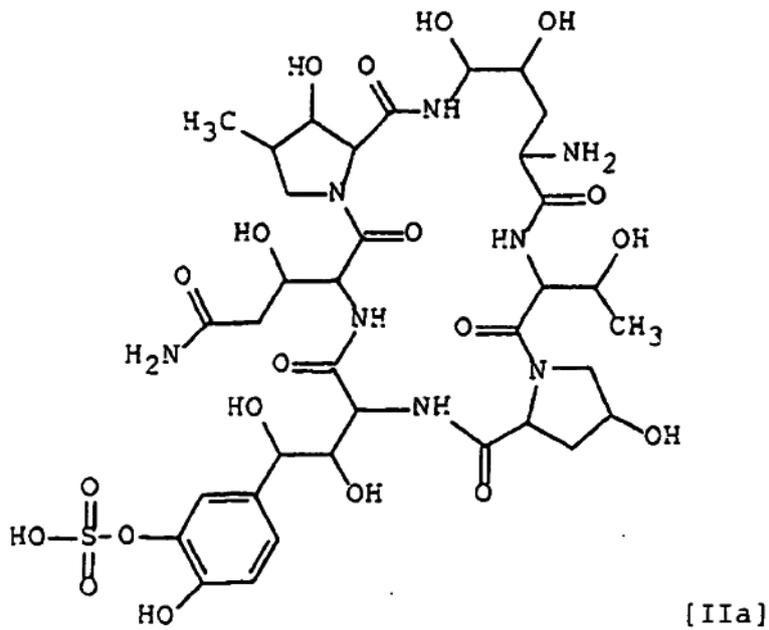
5 R⁴ es hidrógeno o hidroxilo,

R⁵ es hidrógeno o hidroxisulfonilo y

R⁶ es hidrógeno o carbamilo.]

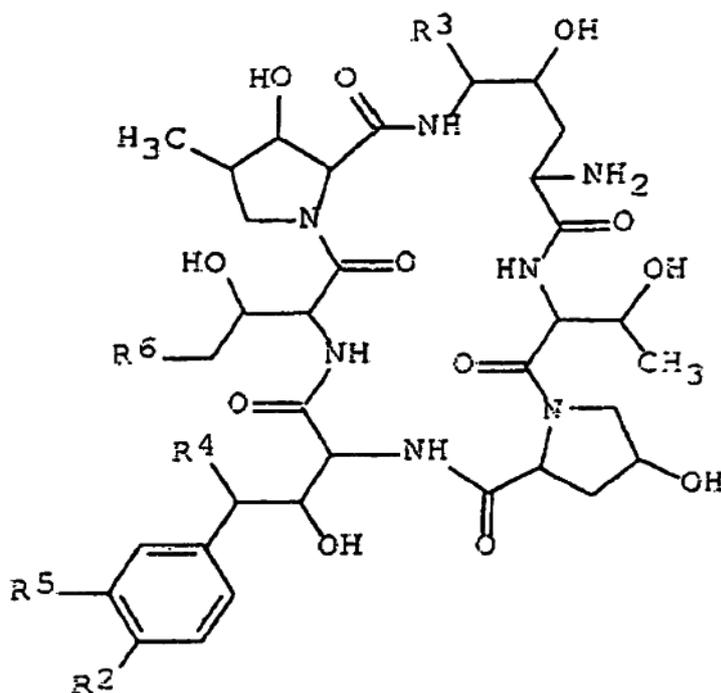
10

La nueva acilasa de lipopéptidos cíclicos de la presente invención es una acilasa procedente de una cepa de microorganismo del género Streptomyces, la cual es capaz de desacilar el grupo "acilamino" como cadena lateral de tal compuesto lipopeptídico cíclico para dar un grupo "amino". Específicamente, es una acilasa la cual desacila la cadena lateral palmitoilo de la sustancia FR901379 o de una sal de la misma o la cadena lateral acilo de un análogo de tal sustancia FR901379 de fórmula general [I] o de una sal del mismo para producir específicamente un compuesto de la siguiente fórmula química [IIa] (sustancia FR179642) o una sal del mismo:



15

o un análogo de FR179642 de la siguiente fórmula general [II], incluida la sustancia FR179642, o una sal del mismo:



[II]

[en la que R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son los mismos grupos que los que se han definido respectivamente con anterioridad en la presente memoria.]

5 Las sales preferidas de los compuestos [I] y [II] son mono- o disales no tóxicas de las clases convencionales. Así, son de mencionar sales metálicas, tales como sales de metales alcalinos (por ejemplo, sal sódica, sal potásica, etc.), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sal cálcica, sal de magnesio, etc.), sal de amonio, sales con bases orgánicas (por ejemplo, sal de trimetilamina, sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de dicitlohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina, etc.), sales de adición de ácidos orgánicas (por ejemplo, formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, tartrato, metanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, etc.), sales de adición de ácidos inorgánicas (por ejemplo, hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, fosfato, etc.) y sales con aminoácidos (por ejemplo, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, etc.).

El "alquilo inferior" preferido es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado de 1 a 6 átomo(s) de carbono, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc.-butilo, pentilo, isopentilo y hexilo. De ellos, se prefieren los grupos alquilo de 1 a 4 átomo(s) de carbono, y se prefiere especialmente metilo.

15 El "alquilo superior" preferido incluye grupos alquilo de cadena lineal o ramificados de 7 a 20 átomos de carbono, tales como heptilo, octilo, 3,5-dimetiloctilo, 3,7-dimetiloctilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo. El "alcoxi inferior" preferido incluye grupos de cadena lineal o ramificados, tales como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, terc.-butoxi, pentiloxi, terc.-pentiloxi, neopentiloxi, hexiloxi e isohexiloxi.

20 El "alcoxi superior" preferido incluye grupos de cadena lineal o ramificados, tales como heptiloxi, octiloxi, 3,5-dimetiloctiloxi, 3,7-dimetiloctiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, hexadeciloxi, heptadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi y eicosiloxi.

El "arilo" preferido incluye fenilo que presenta opcionalmente alquilo inferior (por ejemplo, fenilo, mesitilo, toliilo, etc.), naftilo y antrilo y similares.

25 El resto "acilo" preferido en la expresión grupo "acilamino" o "acilo" incluye acilo alifático, acilo aromático, acilo heterocíclico, acilo alifático sustituido con arilo y acilo alifático sustituido con heterociclo derivado de ácidos carboxílicos, ácidos carbónicos, ácidos carbámicos y ácidos sulfónicos.

30 El "acilo" preferido incluye alcanóilo inferior (por ejemplo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, valerilo, hexanoílo, pivaloílo, etc.) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como arilo (por ejemplo, fenilo, naftilo, antrilo, etc.), los cuales pueden presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como halógeno (por ejemplo, fluor, cloro, bromo, yodo, etc.), hidroxilo, tal alcoxi superior, tal arilo, etc.; tal alcoxi inferior; amino; amino protegido [preferentemente acilamino, tal como alcoxi(inferior)carbonilamino (por ejemplo, metoxicarbonilamino, etoxicarbonilamino, propoxicarbonilamino,

- 5 butoxicarbonilamino, terc.-butoxicarbonilamino, pentiloxicarbonilamino, hexiloxicarbonilamino, etc.), etc.]; dialquil(inferior)amino (por ejemplo, dimetilamino, N-metiletilamino, dietilamino, N-propilbutilamino, dipentilamino, dihexilamino, etc.); alcoxi(inferior)imino (por ejemplo, metoxiimino, etoxiimino, propoxiimino, butoxiimino, terc.-butoxiimino, pentiloxiimino, hexiloxiimino, etc.); aralcoxi(inferior)imino (por ejemplo, benciloxiimino, fenetiloxiimino, benzhidriloxiimino, etc.), tal como fenilalcoxi(inferior)imino el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho alcoxi superior; heterociclitio (preferentemente piridiltio) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como alquilo superior (por ejemplo, heptilo, octilo, 2-etilhexilo, nonilo, decilo, 3,7-dimetiloctilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, 3-metil-10-etildodecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, etc.); y un grupo heterocíclico (por ejemplo, tienilo, imidazolilo, pirazolilo, furilo, tetrazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, etc.) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como amino, tal amino protegido, tal alquilo superior y similares; alcanóilo superior (por ejemplo, heptanoóilo, octanoóilo, nonanoóilo, decanoóilo, undecanoóilo, lauroóilo, tridecanoóilo, miristoóilo, pentadecanoóilo, palmitoóilo, 10, 12-dimetiltetradecanoóilo, heptadecanoóilo, estearoóilo, nonadecanoóilo, eicosanoóilo, etc.);
- 10
- 15 alquenoóilo inferior (por ejemplo, acrilóilo, metacrilóilo, crotonoóilo, 3-pentenoóilo, 5-hexenoóilo, etc.) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho arilo, que presentan opcionalmente uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho alcoxi superior, etc.;
- alquenoóilo superior (por ejemplo, 4-heptenoóilo, 3-octenoóilo, 3,6-decadienoóilo, 3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienóilo, 4,10-heptadecadienoóilo, etc.);
- 20 alcoxi(inferior)carbonilo (por ejemplo, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxi-carbonilo, butoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo, pentiloxicarbonilo, hexiloxicarbonilo, etc.);
- alcoxi(superior)carbonilo (por ejemplo, heptiloxicarbonilo, octiloxicarbonilo, 2-etilhexiloxicarbonilo, noniloxicarbonilo, deciloxicarbonilo, 3,7-dimetiloxiloxicarbonilo, undeciloxicarbonilo, dodeciloxicarbonilo, trideciloxicarbonilo, tetradeciloxicarbonilo, pentadeciloxicarbonilo, 3-metil-10-etildodeciloxicarbonilo, hexadeciloxicarbonilo, heptadeciloxicarbonilo, octadeciloxicarbonilo, nonadeciloxicarbonilo, eicosiloxi-carbonilo, etc.);
- 25 ariloxicarbonilo (por ejemplo, fenoxicarbonilo, naftiloxicarbonilo, etc.);
- arilgloxiloóilo (por ejemplo, fenilgloxiloóilo, naftilgloxiloóilo, etc.);
- aralcoxi(inferior)carbonilo el cual puede presentar uno o más sustituyente(s) adecuado(s), por ejemplo fenilalcoxi(inferior)carbonilo, el cual puede presentar nitro o alcoxi inferior (por ejemplo, benciloxicarbonilo, fenetiloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, etc.);
- 30 alquil(inferior)sulfonilo (por ejemplo, metilsulfonilo, etilsulfonilo, propilsulfonilo, isopropilsulfonilo, pentilsulfonilo, butilsulfonilo, etc.);
- arilsulfonilo (por ejemplo, fenilsulfonilo, naftilsulfonilo, etc.) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho alquilo inferior, dicho alcoxi superior y similares;
- 35 aralquil(inferior)sulfonilo (por ejemplo, bencilsulfonilo, fenetilsulfonilo, benzhidrilsulfonilo, etc.), por ejemplo fenilalquil(inferior)sulfonilo; y
- aróilo (por ejemplo, benzoóilo, naftoóilo, antrilcarbonilo, etc.) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 5) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho halógeno; alquilo inferior (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, terc.-butilo, pentilo, hexilo, etc.); tal alquilo superior; alcoxi inferior (por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, terc.-butoxi, pentiloxi, hexiloxi, etc.) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 10) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho alcoxi inferior, dicho halógeno, dicho arilo y similares; alcoxi superior (por ejemplo, heptiloxi, octiloxi, 2-etilhexiloxi, noniloxi, deciloxi, 3,7-dimetiloxiloxi, undeciloxi, dodeciloxi, tricediloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, 3-metil-10-etildodeciloxi, hexadeciloxi, heptadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, etc.) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 17) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho halógeno y similares; alqueniloxi superior (por ejemplo, 3-hepteniloxi, 7-octeniloxi, 2,6-octadieniloxi, 5-noneniloxi, 1-deceniloxi, 3,7-dimetil-6-octeniloxi, 3,7-dimetil-2,6-octadieniloxi, 8-undeceniloxi, 3,6,8-dodecatrieniloxi, 5-trideceniloxi, 7-tetradeceniloxi, 1,8-pentadecadieniloxi, 15-hexadeceniloxi, 11-heptadeceniloxi, 7-octadeceniloxi, 10-nonadeceniloxi, 18-eicoseniloxi, etc.); carboxi; dicho arilo el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho alcoxi superior y similares; y ariloxi (por ejemplo, fenoxi, naftiloxi, antriloxi, etc.) el cual puede presentar uno o más (preferentemente 1 a 3) sustituyente(s) adecuado(s), tales como dicho alcoxi inferior y dicho alcoxi superior.
- 40
- 45
- 50

De los ejemplos anteriores de "acilo", se prefiere un grupo alcanóilo superior, y se prefiere especialmente palmitoóilo.

Para el resto "acilo" preferido en la expresión "aciloxi" se puede hacer referencia al grupo "acilo" antes mencionado.

El grupo "aciloxi" preferido incluye alcanoiloxi inferior (por ejemplo, formiloxi, acetiloxi, propioniloxi, butiriloxi, isobutiriloxi, valeriloxi, hexanoiloxi, pivaloiloxi, etc.) o fosfonoxi.

La nueva acilasa de lipopéptidos cíclicos de la invención se produce cultivando una cepa de microorganismo productora de acilasa que pertenece al género Streptomyces, a saber, Streptomyces sp. nº 6907 (FERM BP-5809), en un medio de cultivo.

5 En general, esta nueva acilasa se puede producir cultivando dicha cepa de microorganismo productora de la nueva acilasa en un medio acuoso que contiene fuentes de carbono asimilable y de nitrógeno digerible, preferentemente en condiciones aerobias, por ejemplo mediante cultivo agitado y cultivo sumergido.

La fuente de carbono preferida para el medio incluye diversos carbohidratos, tales como glucosa, xilosa, galactosa, glicerina, almidón, dextrina y similares. Como otras fuentes de carbono son de mencionar maltosa, ramnosa, rafinosa, arabinosa, manosa, salicina, succinato sódico y similares.

10 La fuente de nitrógeno preferida incluye extracto de levadura, peptona, harina de gluten, harina de algodón, harina de soja, licor de maíz fermentado, levadura seca, gérmenes de trigo, harina de plumas, harina de cacahuete y similares, así como compuestos nitrogenados inorgánicos u orgánicos, tales como sales de amonio (por ejemplo, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, etc.), urea y aminoácidos.

15 Aunque aquellas fuentes de carbono y de nitrógeno se utilizan preferentemente en combinaciones adecuadas, también se pueden utilizar materiales de baja pureza, siempre que contengan cantidades adecuadas de factores de crecimiento y cantidades razonables de nutrientes inorgánicos, y no siempre es necesario utilizarlos en forma pura. Opcionalmente, el medio se puede suplementar con carbonato sódico o carbonato potásico, fosfato sódico o fosfato potásico, cloruro sódico o cloruro potásico, yoduro sódico o yoduro potásico y sales inorgánicas, tales como sales de magnesio, sales de cobre y sales de cobalto. En particular, cuando el medio de cultivo produce una espuma copiosa, se puede añadir, según sea necesario, un agente antiespumante, tal como parafina líquida, aceite graso, aceite vegetal, aceite mineral y silicona.

20 Para la producción en masa de la nueva acilasa se prefiere el procedimiento del cultivo aerobio sumergido. Para la producción a menor escala se realiza un cultivo agitado o cultivo de superficie en un matraz o una botella. Para el cultivo en tanques de gran capacidad, el tanque de fermentación preferentemente se inocula con un cultivo de semillas para evitar un retraso en el crecimiento en la línea de producción para la nueva acilasa. Así, preferentemente se inocula primero una cantidad relativamente pequeña de medio de cultivo con las esporas o el micelio de la cepa y se incuba para preparar un cultivo de semillas el cual se transfiere después, en condiciones asépticas, a un tanque de fermentación de gran capacidad. El medio para este cultivo de semillas puede ser sustancialmente el mismo que el medio de producción para la nueva acilasa o diferente del medio de producción.

25 La agitación y aireación del sistema de fermentación se puede llevar a cabo de varias maneras. Por ejemplo, la agitación se puede efectuar utilizando una hélice u otro dispositivo de agitación similar, girando o sacudiendo el fermentador, por medio de una bomba apropiada o pasando aire estéril a través del medio. La aireación se puede lograr soplando aire estéril por el sistema de fermentación.

30 La fermentación se lleva a cabo generalmente en el intervalo de temperaturas de aproximadamente 20 a 32 °C, preferentemente de 25 a 30 °C, y en el intervalo de pH de 6 a 8 durante aproximadamente 50 a 150 horas. Esas condiciones se pueden modificar de acuerdo con otras condiciones de cultivo y escalas de fermentación.

35 La nueva acilasa así producida se puede recuperar del caldo de fermentación mediante técnicas que se utilizan de forma rutinaria para la recuperación de otras sustancias bioactivas conocidas. La nueva acilasa elaborada se encuentra tanto en el micelio crecido como en el filtrado. Por lo tanto, la nueva acilasa se puede separar de la torta micelial y del filtrado disponible después de la filtración o centrifugación del caldo y purificar mediante los procedimientos convencionales, tales como concentración a presión reducida, liofilización, extracción con un disolvente común, ajuste de pH, tratamiento con una resina convencional (por ejemplo, resina de intercambio aniónico, resina de intercambio catiónico, resina adsorbente no iónica, etc.), tratamiento con un adsorbente común, tal como carbón activo, ácido silícico, gel de sílice, celulosa, alúmina, cristalización y recristalización.

40 Los ejemplos siguientes ilustran con más detalle la acilasa producida por Streptomyces sp. nº 6907 (FERM BP-5809) y de ningún modo deben interpretarse como que definen el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Producción de la acilasa originaria de Streptomyces sp. nº 6907 (FERM BP-5809)

45 Se cargó un matraz cónico de 100 ml de capacidad con 30 ml de un medio de semillas que contenía 6 % de almidón soluble, 4 % de harina de soja desgrasada y 0,5 % de carbonato y se esterilizó a 120 °C durante 20 minutos. El matraz esterilizado se inoculó después con 1 a 2 asa(s) bacteriológica(s) de un cultivo de agar inclinado de Streptomyces sp. nº 6907 (FERM BP-5809) y se incubó bajo agitación a 30 °C durante 3 días para proporcionar un cultivo de semillas.

50 Entretanto, se ajustó a pH 6,5 un medio de producción que contenía 4 % de sacarosa, 1 % de harina de cacahuete, 1 % de levadura seca y 0,5 % de carbonato cálcico y se cargó un matraz cónico de 500 ml de capacidad con 100 ml del medio de producción y se esterilizó a 120 °C durante 20 minutos. El matraz esterilizado se inoculó con 2 ml del cultivo

de semillas anterior y se incubó bajo agitación a 30 °C durante 4 días para proporcionar un caldo de fermentación.

Ahora se describe en detalle el procedimiento de desacilación de la cadena lateral acilo del compuesto lipopeptídico cíclico antifúngico (por ejemplo, FR901379 o su análogo) con la nueva acilasa de lipopéptidos cíclicos de la invención.

El procedimiento de desacilación de la invención se puede realizar de la siguiente manera.

5 Se inocula un medio de producción adecuado con una cepa de microorganismo perteneciente al género Streptomyces y capaz de producir la nueva acilasa y el medio inoculado se incuba durante unos días entre aproximadamente 25 y 35 °C para proporcionar un caldo de fermentación. Este caldo de fermentación se añade al compuesto lipopeptídico cíclico sustrato, tal como la sustancia FR901379, y la mezcla se incuba entre 45 y 60 °C y a un pH de aproximadamente 6,0 a 9. Después, el péptido cíclico, tal como la sustancia FR179642, se detecta y se separa por cromatografía líquida de alta
10 resolución (HPLC).

Los ejemplos siguientes pretenden ilustrar en detalle el procedimiento de desacilación de la invención y de ningún modo deben interpretarse como que definen el alcance de la invención.

Ejemplo 2-1

15 A 700 µl del caldo de fermentación de Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809) obtenido en el ejemplo 1 se añadieron 100 µl de una solución acuosa de la sustancia FR901379 (100 mg/ml) (10 mg como sustancia FR901379; 8,35 µmoles) junto con 100 µl de metanol y 100 µl de tampón (tampón de dihidrogenofosfato potásico/hidrogenofosfato disódico 0,5 M, pH 6,0) y la reacción transcurrió a 30 °C durante 30 minutos. Después se detuvo la reacción con ácido acético al 4 % y, tras añadir 2 ml de metanol, la mezcla se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 µm) para
20 eliminar las proteínas macromoleculares y otras fracciones y se sometió a HPLC, y la actividad acilasa de la sustancia esquelética FR179642 producida se monitorizó y ensayó a 210 nm.

La sustancia FR179642 se eluyó a una velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando un detector UV de longitud de onda variable (Shimadzu SPD-10A), una bomba (Shimadzu LC-10AD) y un integrador (Shimadzu C-R6A) como instrumentos, LiChrospher 100RP-18(e) (d.i. 250 mm x 4 mm, diámetro de partícula 5 µm (E. Merck)) como fase estacionaria y acetonitrilo al 3 %/dihidrogenofosfato de amonio al 0,5 % como fase móvil. El tiempo de retención de la sustancia
25 FR179642 ascendió a aproximadamente 6,3 minutos. El rendimiento de la sustancia FR179642, calculado a partir de los datos de HPLC, ascendió a 560 µg (0,60 µmoles). El valor de Km, determinado mediante el método de Lineweaver-Burk, era de 257 µM y la Vmax ascendió a 14,3 U/mg de proteína.

Ejemplo 2-2

30 A 100 µl del caldo de fermentación de Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809) obtenido en el ejemplo 1 se añadieron 100 µl de una solución de aculeacina A en dimetilsulfóxido (100 mg/ml) (10 mg como aculeacina A; 9,65 µmoles) junto con 500 µl de tampón de dihidrogenofosfato potásico/hidrogenofosfato disódico 500 mM (pH 7,0) el cual contenía KCl 1,2 M y con 300 µl de agua, y la reacción transcurrió a 40 °C durante 15 minutos. Después se detuvo la reacción con 1 ml de ácido acético al 4 % y, tras la adición de 2 ml de metanol, la mezcla se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 µm) para eliminar las proteínas macromoleculares y otras fracciones y se sometió a HPLC, y la
35 actividad acilasa de la sustancia nuclear aculeacina A producida se monitorizó a 210 nm y se determinó. La sustancia nuclear aculeacina A se eluyó a una velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando un detector UV de longitud de onda variable (Shimadzu SPD-10A), una bomba (Shimadzu LC-10AD) y un integrador (Shimadzu C-R6A) como instrumentos, LiChrospher 100RP-18(e) (d.i. 250 mm x 4 mm, diámetro de partícula 5 µm (E. Merck)) como fase estacionaria y acetonitrilo al 4 %/dihidrogenofosfato de amonio al 1 % como fase móvil. El tiempo de retención de la sustancia nuclear aculeacina A ascendió a aproximadamente 8,7 minutos. El rendimiento de la sustancia nuclear aculeacina A, calculado a partir de los datos de HPLC, ascendió a 370 µg (0,47 µmoles). El valor de Km, determinado mediante el método de Lineweaver-Burk, era de 279 µM y la Vmax ascendió a 16,8 U/mg de proteína.

Ejemplo 2-3

45 A 100 µl del caldo de fermentación de Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809) obtenido en el ejemplo 1 se añadieron 100 µl de una solución de equinocandina B en dimetilsulfóxido (100 mg/ml) (10 mg como equinocandina B; 9,43 µmoles) junto con 500 µl de tampón de dihidrogenofosfato potásico/hidrogenofosfato disódico 500 mM (pH 7,0) el cual contenía KCl 1,2 M y con 300 µl de agua, y la reacción transcurrió a 40 °C durante 15 minutos. Después se detuvo la reacción con 1 ml de ácido acético al 4 % y, tras la adición de 2 ml de metanol, la mezcla se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 µm) para eliminar las proteínas macromoleculares y otras fracciones y se sometió a HPLC, y la
50 actividad acilasa de la sustancia nuclear equinocandina B producida se monitorizó y ensayó a 210 nm. La sustancia nuclear equinocandina B se eluyó a una velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando un detector UV de longitud de onda variable (Shimadzu SPD-10A), una bomba (Shimadzu LC-10AD) y un integrador (Shimadzu C-R6A) como instrumentos, LiChrospher 100RP-18(e) (d.i. 250 mm x 4 mm, diámetro de partícula 5 µm (E. Merck)) como fase estacionaria y acetonitrilo al 4 %/dihidrogenofosfato de amonio al 1 % como fase móvil. El tiempo de retención de la sustancia nuclear equinocandina B ascendió a aproximadamente 8,7 minutos. El rendimiento de la sustancia nuclear equinocandina B, calculado a partir de los datos de HPLC, ascendió a 90 µg (0,11 µmoles). El valor de Km, determinado mediante el método de Lineweaver-Burk, era de 146 µM y la Vmax ascendió a 7,85 U/mg de proteína.

A continuación se caracteriza el proceso de desacilación de la cadena lateral acilo de un compuesto lipopeptídico cíclico antifúngico (por ejemplo, la sustancia FR901379) mediante la acilasa procedente de la cepa de microorganismo productora de la nueva acilasa perteneciente al género Streptomyces de acuerdo con la presente invención.

- 5 Los datos mostrados se generaron mediante el procedimiento experimental descrito en el ejemplo 2, pero variando el tipo de tampón (se utilizaron tampón de citrato sódico 0,5 M, tampón de dihidrogenofosfato potásico/hidrogenofosfato disódico 0,5 M y tampón Tris-HCl en diferentes combinaciones), la temperatura de reacción y el nivel de adición de metanol. Cada actividad acilasa se muestra a la concentración (medida por HPLC) de la sustancia FR179642 alcanzada al completar la reacción.

pH de reacción óptimo

10 Ensayo 1

pH óptimo para la acilasa producida por Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809)

pH	Concentración de la sustancia FR179642 al completar la reacción (µg/ml)
3	0
4	190
5	280
6	300
7	470
8	800
9	1.000

Los resultados anteriores indican que la reacción transcurre en condiciones débilmente ácidas y por encima (aproximadamente pH 4) y que la velocidad de reacción aumenta a medida que sube el pH.

15 Temperatura de reacción óptima

Ensayo 2

Temperatura óptima para la acilasa producida por Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809)

Temperatura	Concentración de la sustancia FR179642 al completar la reacción (µg/ml)
25	600
30	710
40	3.010
50	4.620
60	1.660
70	130

Los resultados anteriores indican que la temperatura de reacción óptima se encuentra entre 40 y 60 °C.

20 Efecto del metanol añadido al sistema de reacción

Ensayo 3

El efecto del metanol en la reacción utilizando la acilasa producida por Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809)

Concentración de metanol (%)	Concentración de la sustancia FR179642 al completar la reacción (µg/ml)
0	330
5	580
10	710
15	630
20	530
30	140
40	130
50	90

- 25 Los resultados anteriores indican que la actividad aumenta entre 1,6 veces y 2,2 veces en presencia de 5 a 20 % de metanol.

Ahora se describe en detalle la acilasa de lipopéptidos cíclicos obtenida cultivando una cepa de microorganismo productora de acilasa del género Streptomyces.

- **Características de la acilasa producida por Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809)**

1) Actividad:

Esta enzima cataliza la desacilación del resto acilo lipídico del compuesto lipopeptídico cíclico representado por la sustancia FR901379 y los análogos de FR901379, tales como equinocandina B y aculeacina A.

5 2) pH óptimo: pH 8 a 9

3) Temperatura óptima para la actividad: aproximadamente 50 °C

4) Inhibición, activación y estabilización:

Metanol: La enzima es activada de forma dependiente de la concentración hasta un 10 % en la mezcla de reacción y es inhibida a concentraciones mayores.

10 5) Peso molecular:

La SDS-PAGE de la enzima purificada proporcionó dos bandas.

Péptido grande: 61 kD

Péptido pequeño: 19 kD

6) Estructura cristalina:

15 Había poca cantidad de la proteína purificada y no era cristalina.

7) Análisis de aminoácidos:

Secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal

Péptido grande:

**Ser-Asn-Ala-Val-Ala-Phe-Asp-Gly-Ser-Thr-Thr-Val-
Asn-Gly-Arg-Gly-Leu-Leu-Leu-Gly-...**

20 Péptido pequeño:

**Gly-Ser-Gly-Leu-Ser-Ala-Val-Ile-Arg-Tyr-Thr-Glu-
Tyr-Gly-Ile-Pro-His-His-Val-Ala-...**

8) Especificidad por el sustrato

La enzima actúa de catalizador para FR901379, equinocandina B y aculeacina A. Sin embargo, no actúa sobre FR901469.

25 Los ejemplos siguientes ilustran con más detalle la acilasa de la invención, pero de ningún modo deben interpretarse como que definen el alcance de la invención.

Purificación de la acilasa:

Ejemplo 3

30 El caldo de fermentación de Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809) obtenido en el ejemplo 1 se extrajo con KCl 1,5 M bajo agitación a baja temperatura y el filtrado separado con papel de filtro n° 2 se desalinizó con una membrana UF (Asahi Chemical Industries; AIP-1010) [tampón Tris-HCl 20 mM (pH 9) sustituido] y se pasó a través de una columna HP-20. El efluente se aplicó en una columna DEAD-Toyopearl (forma Cl⁻) y la elución se llevó a cabo con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 9) suplementado con NaCl 0,3 M. En la fracción activa resultante se disolvió un equivalente 0,5 M de (NH₄)₂SO₄ y la solución se aplicó en una columna fenil-Toyopearl, realizándose después la elución con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8) suplementado con NaCl 0,1 M. La fracción activa resultante se desalinizó y concentró con una membrana DF (Asahi Chemical Industries; SIP-0013) [tampón Tris-HCl 20 mM (pH 9) sustituido] y se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna YMC-Diol (fase móvil: tampón NaCl 0,2 M-dihidrogenofosfato

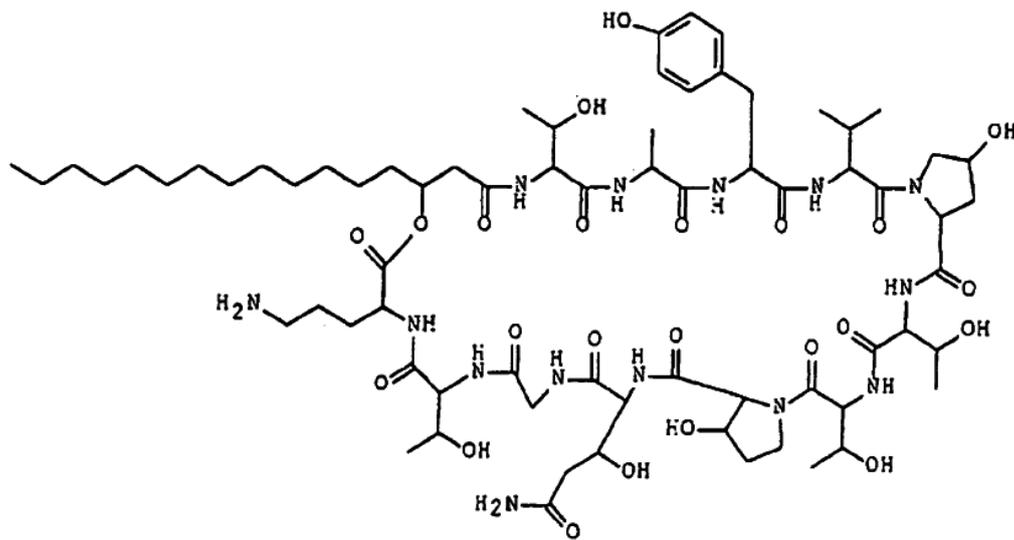
35

5

potásico/hidrogenofosfato disódico 0,1 M, pH 7,0). La fracción activa se purificó adicionalmente mediante cromatografía preparativa en una columna de fase inversa Cosmosil 5C4-AR-300 [fase móvil: (solución A) ácido trifluoroacético al 0,5 %, (solución B) ácido trifluoroacético al 0,5 %/acetonitrilo al 80 %, A:B = 60:40 -> 40:60 (gradiente lineal)], obteniéndose dos bandas. La acilasa así purificada se sometió a SDS-PAGE; de esta manera se obtuvieron dos péptidos diferentes con masas moleculares de 61 kD y 19kD, respectivamente.

Especificidad por el sustrato:

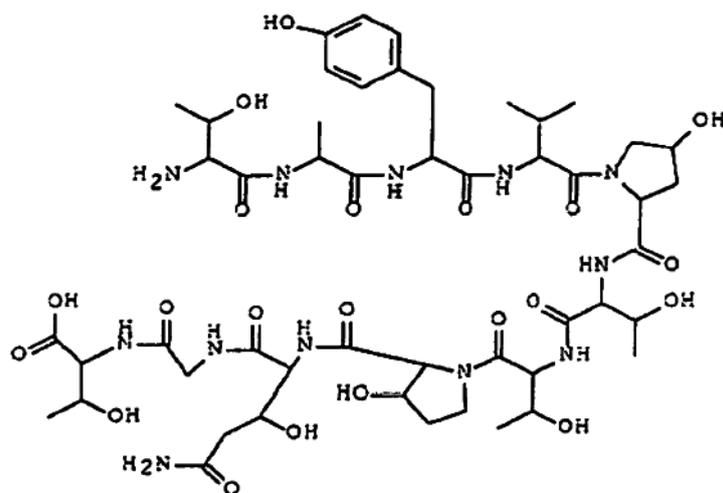
La sustancia FR901469 es una sustancia conocida (descrita en la patente WO 92/19648) que posee actividad antifúngica cuando es producida por la cepa de hongo nº 11243 (FERM BP-3373). Es un compuesto con la siguiente fórmula química [III]:



[III]

10

La acilasa procedente de *Actinoplanes utahensis* (descrita en la patente japonesa Kokai Tokkyo Koho H4-228072), la cual posee actividad de desacilación igual que la nueva acilasa de acuerdo con la presente invención, ejerce una acción catalítica sobre dicha sustancia FR901469 y su sal para producir la sustancia FR181131 (descrita en la patente WO 96/30399) con la siguiente fórmula química [IV]:



[IV]

15

Por el contrario, la nueva acilasa de la presente invención no ejerce ninguna acción catalítica sobre dicha sustancia FR901469 y su sal.

A continuación se presentan ejemplos de la invención.

Ejemplo 4-1

5 A 20 ml de un caldo de fermentación de Actinoplanes utahensis IF013244 preparado mediante el procedimiento descrito en J. Antibiotics, vol. 41, pág. 1085-1092 ('88) se añadió 1 ml de una solución acuosa de la sustancia FR901469 (200 mg/ml) (0,2 g tal como sustancia FR901469; 130 μ moles) junto con 2,9 g de hidrogenofosfato disódico y 60 ml de agua, y la reacción transcurrió a 60 °C durante 24 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 μ m) para eliminar las proteínas de alto peso molecular y otras fracciones, se purificó mediante HPLC monitorizando la sustancia FR181131 a 210 nm y se determinó la actividad acilasa. La sustancia FR181131 se eluyó a una velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando un detector UV de longitud de onda variable (Shimadzu SPD-10A), una bomba (Shimadzu LC-10AD) y un integrador (Shimadzu C-R6A) tal como instrumentos, YMC AM303 (d.i. 250 mm x 4 mm, diámetro de partícula 5 μ m) tal como fase estacionaria y acetonitrilo al 12,5 %/dihidrogenofosfato de amonio al 0,5 % tal como fase móvil. El tiempo de retención de la sustancia FR181131 ascendió a aproximadamente 7,3 minutos. El rendimiento de la sustancia FR181131, calculado a partir de los datos de HPLC, ascendió a 80 mg (68 μ moles).

Ejemplo 4-2

15 A 20 ml del caldo de fermentación de Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809) obtenido en el ejemplo 1 se añadió 1 ml de una solución acuosa de la sustancia FR901469 (200 mg/ml) (0,2 g tal como sustancia FR901469; 130 μ moles) junto con 2,9 g de hidrogenofosfato disódico y 60 ml de agua, y la reacción transcurrió a 60 °C durante 24 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 μ m) para eliminar las proteínas de alto peso molecular y otras fracciones, se purificó mediante HPLC monitorizando la sustancia FR181131 a 210 nm y se determinó la actividad acilasa. La sustancia FR181131 se eluyó a una velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando un detector UV de longitud de onda variable (Shimadzu SPD-10A), una bomba (Shimadzu LC-10AD) y un integrador (Shimadzu C-R6A) tal como instrumentos, AM303 (d.i. 250 mm x 4 mm, diámetro de partícula 5 μ m) tal como fase estacionaria y acetonitrilo al 12,5 %/dihidrogenofosfato de amonio al 0,5 % tal como fase móvil. El tiempo de retención de la sustancia FR181131 ascendió a aproximadamente 7,3 minutos. El rendimiento de la sustancia FR181131, calculado a partir de los datos de HPLC, no superó los 2 mg (1,7 μ moles) (por debajo del límite de detección).

Coleophoma sp. F-11899, el cual produce la sustancia FR901379, y Streptomyces sp. n° 6907 (FERM BP-5809), el cual produce la acilasa de la invención, han sido depositados en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (NIBH, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón).

<u>Microorganismo</u>	<u>N° de acceso</u>
<u>Coleophoma</u> sp. F-11899	FERM BP-2635
<u>Streptomyces</u> sp. n° 6907	FERM BP-5809
Cepa n° 11243	FERM BP-3373

30

REIVINDICACIONES

5 1. Una acilasa de lipopéptidos cíclicos obtenida a partir de una cepa de microorganismo perteneciente al género Streptomyces, en la que la cepa de microorganismo productora de acilasa es Streptomyces sp. nº 6907, depositada en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (NIBH) bajo el número de acceso FERM BP-5809, y la acilasa presenta las características siguientes:

1) Actividad:

Esta enzima cataliza la desacilación del resto acilo lipídico del compuesto lipopeptídico cíclico representado por la sustancia FR901379 y los análogos de FR901379, tales como equinocandina B y aculeacina A.

2) pH óptimo: pH 8 a 9;

10 3) Temperatura óptima para la actividad: aproximadamente 50 °C;

4) Inhibición, activación y estabilización: Metanol: La enzima es activada de forma dependiente de la concentración hasta un 10 % en la mezcla de reacción y es inhibida a concentraciones mayores.

5) Peso molecular:

Péptido grande: 61 kD

15 Péptido pequeño: 19 kD

6) Análisis de aminoácidos:

Secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal

Péptido grande:

Ser-Asn-Ala-Val-Ala-Phe-Asp-Gly-Ser-Thr-Thr-Val-Asn-Gly-Arg-Gly-Leu-Leu-Leu-Gly...

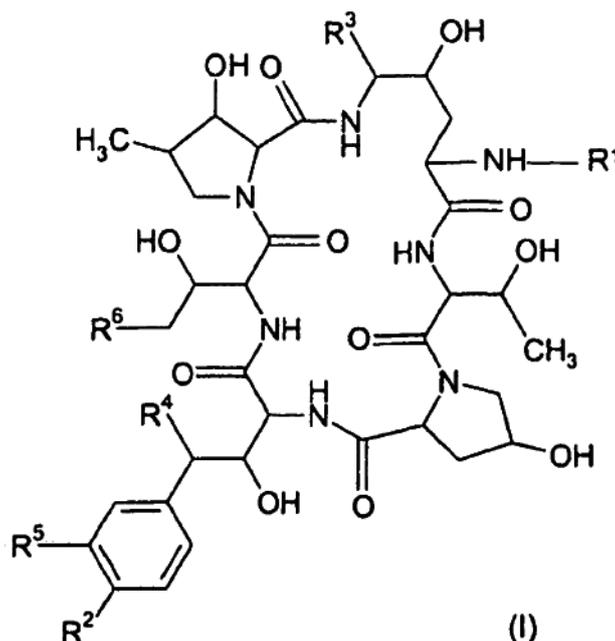
20 Péptido pequeño:

Gly-Ser-Gly-Leu-Ser-Ala-Val-Ile-Arg-Tyr-Thr-Glu-Tyr-Gly-Ile-Pro-His-His-Val-Ala...

7) Especificidad por el sustrato

La enzima actúa de catalizador para FR901379, equinocandina B y aculeacina A, pero no actúa sobre FR901469.

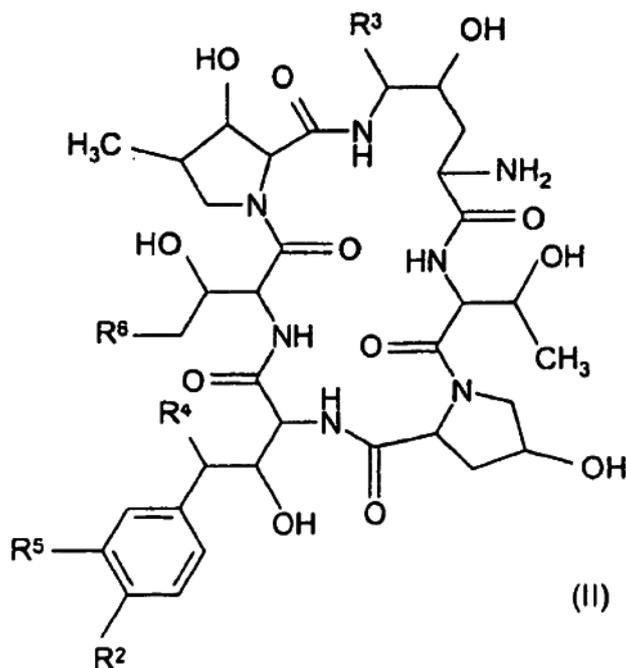
25 2. La acilasa de acuerdo con la reivindicación 1, la cual cataliza la desacilación del grupo acilo R¹ de un compuesto lipopeptídico cíclico con la siguiente fórmula general [I] o una sal del mismo:



en la que

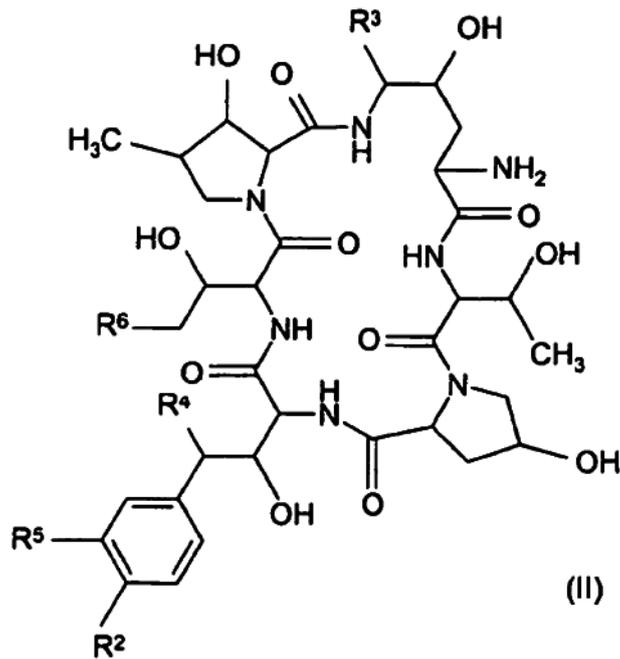
- R¹ es acilo;
 R² es hidroxilo o aciloxi;
 R³ es hidrógeno o hidroxilo;
 R⁴ es hidrógeno o hidroxilo;
 5 R⁵ es hidrógeno o hidroxisulfonilo y
 R⁶ es hidrógeno o carbamilo;

para producir un compuesto peptídico cíclico con la siguiente fórmula general (II) o una sal del mismo:

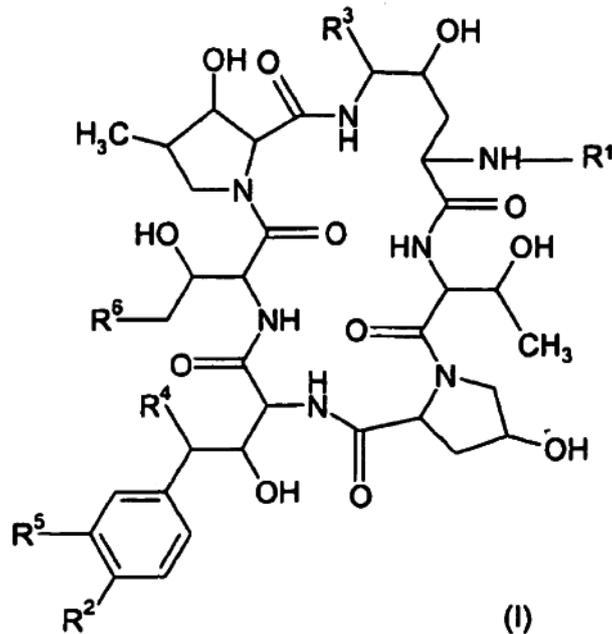


en la que R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son como se han definido anteriormente.

- 10 3. La acilasa de acuerdo con la reivindicación 2, en la que
 R¹ es hidroxisulfonilo y
 R⁶ es carbamilo.
4. *Streptomyces* sp. 6907 depositado en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (NIBH) bajo el número de acceso FERM BP-5809.
- 15 5. Procedimiento para la producción de un compuesto peptídico cíclico o una sal del mismo, el cual comprende poner un compuesto lipopeptídico cíclico o su sal en contacto con una solución enzimática bruta o purificada de una acilasa producida por un microorganismo perteneciente al género *Streptomyces* para desacilar su resto acilo lipídico, en el que la acilasa es la acilasa de la reivindicación 1.
6. Procedimiento para la producción de un compuesto peptídico cíclico con la siguiente fórmula general (II):



en la que R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son los mismos grupos que los que se definen respectivamente más adelante, el cual comprende poner un compuesto lipopeptídico cíclico con la siguiente fórmula general [I]:



- 5 en la que
- R^1 es acilo;
 - R^2 es hidroxilo o aciloxilo;
 - R^3 es hidrógeno o hidroxilo;
 - R^4 es hidrógeno o hidroxilo;
 - 10 R^5 es hidrógeno o hidroxisulfonilo y
 - R^6 es hidrógeno o carbamilo,

o una sal del mismo en un disolvente acuoso en contacto con una solución enzimática bruta o purificada de una acilasa

obtenida mediante el cultivo de una cepa de microorganismo productora de acilasa perteneciente al género Streptomyces, en el que la acilasa es la acilasa de la reivindicación 1.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que

R⁵ es hidroxisulfoniloxy y

R⁶ es carbamoilo.

5

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

5 Documentos de patente indicados en la descripción

- EP 97905455 A [0001]
- WO 9219648 A [0065]
- FR 901379 [0004]
- JP H4228072 B [0066]
- JP H3184921 B [0004] [0021]
- WO 9630399 A [0066]

Documentos de patente citados en la descripción

- **Pridham, T. G. et al.** *Appl. Microbiol.*, 1958, vol. 6, 54 [0016] [0018]
- **Becker, B. ; M. P. Lechevalier ; R. E. Gordon ; H. A. Lechevalier.** Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 1964, vol. 12, 421-423 [0017]
- **Yamaguchi, T.** Comparison of the cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 1965, vol. 89, 444-453 [0017]
- **Shirling, E. B. ; D. Gottlieb.** Cooperative Description of Type Culture of *Streptomyces*. 2. Species descriptions from first study. *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, 1968, vol. 18, 69-189 [0018]
- **Shirling, E. B. ; D. Gottlieb.** Cooperative-Description of Type Culture of *Streptomyces*. 3. Additional species descriptions from first and second studies. *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, 1968, vol. 18, 279-392 [0018]
- **Shirling, E. B. ; D. Gottlieb.** Cooperative Description of Type Culture of *Streptomyces*. 4. Species descriptions from second, third and fourth studies. *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, 1969, vol. 19, 391-512 [0018]
- **Skerman, V. B. ; V. McGowan ; P. H. A. Sneath.** Approved List of Bacterial Names. American Society for Microbiology, 1989 [0018]
- **Moore, W. E. ; E. P. Cato ; L. V. H. Moore.** Index of Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes. American Society for Microbiology, 1992 [0018]
- *J. Antibiotics*, vol. 41, 1085-1092 [0069]