

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 528**

51 Int. Cl.:

C07D 405/14 (2006.01)

C12P 17/16 (2006.01)

C12P 19/46 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 31/4025 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2009 E 09843667 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2423319**

54 Título: **Amicolamicina, método para su producción y su utilización**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2014

73 Titular/es:

**MICROBIAL CHEMISTRY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
3-14-23, Kamiosaki, Shinagawa-ku
Tokyo 141-0021, JP**

72 Inventor/es:

**IGARASHI, MASAYUKI;
SAWA, RYUICHI y
HOMMA, YOSHIKO**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 525 528 T3

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

DESCRIPCIÓN

Amicolamicina, método para su producción y su utilización

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un nuevo compuesto que tiene una excelente actividad antibacteriana contra gran variedad de bacterias patógenas, tales como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico, a un método para producir el nuevo compuesto, al uso del nuevo compuesto y a un nuevo microorganismo que produce el nuevo compuesto.

Estado de la técnica

10 En general las enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas se tratan con terapias químicas, incluyendo la administración de medicamentos tales como antibióticos. Sin embargo, convencionalmente, el uso frecuente de estos medicamentos permite que las bacterias patógenas adquieran capacidad para neutralizar dichos medicamentos, lo que lleva a la aparición de bacterias resistentes frente a las que los medicamentos son ineficaces. En realidad, muchas bacterias resistentes a medicamentos resultan problemáticas principalmente en los centros médicos.

15 Por ejemplo, un problema clínicamente importante es que el *Staphylococcus aureus*, conocido como una bacteria que provoca enfermedades supurativas, neumonía e intoxicación alimentaria, adquiere una multirresistencia a la metilicina o a otros antibióticos convirtiéndose en *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (methicilline resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA). Actualmente se utiliza vancomicina, teicoplanina, arbekacina, linezolid, etc. como medicamentos terapéuticos típicos contra el MRSA. Sin embargo, generalmente resulta difícil eliminar por completo el MRSA. En particular se debería tener cuidado con el uso de vancomicina, ya que se ha informado sobre la aparición de
20 *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* - VRSA) (véase NPL 1).

Con el fin de superar estos problemas relacionados con bacterias resistentes a medicamentos, existe la necesidad de desarrollar un nuevo compuesto que tenga un esqueleto químico estructural diferente del de los antibióticos convencionales y que además tenga una excelente actividad antibacteriana.

25 Además, las enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas pueden resultar muy problemáticas no sólo en humanos, sino también en animales no humanos. Por ejemplo, se espera que la neumonía en ganado doméstico, tal como el ganado bovino o porcino, pueda ser prevenida o tratada eficazmente en la industria pecuaria. Por tanto, actualmente existe una gran demanda en cuanto al desarrollo de un nuevo compuesto que tenga una excelente actividad antibacteriana contra bacterias que provocan neumonía en el ganado doméstico.

30 Lista de referencias

Literatura no correspondiente a patentes

NPL 1: Sievert DM, y col.: *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin - Estados Unidos, 2002. MMWR 5 de julio de 2002; 51: 565-567.

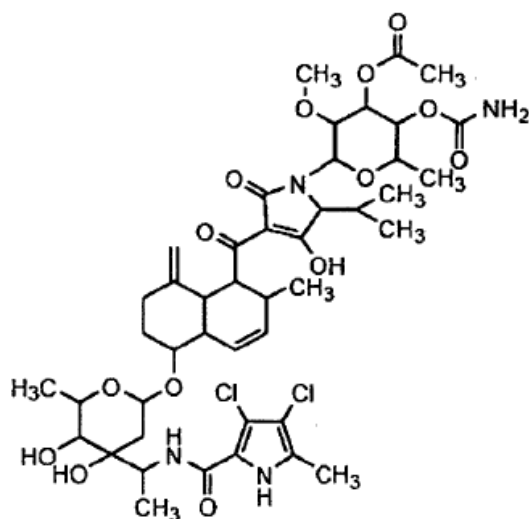
Sumario de la invención

35 La presente invención pretende resolver los problemas existentes arriba mencionados y lograr los siguientes objetos. Esto es, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo compuesto con una excelente actividad antibacteriana contra una gran variedad de bacterias patógenas, tales como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico, tautómeros del mismo o sales del nuevo compuesto o de sus tautómeros; un método para producirlos; un nuevo microorganismo que produce el nuevo compuesto, tautómeros del
40 mismo o sales del nuevo compuesto o de sus tautómeros; y un agente antibacteriano que contiene el nuevo compuesto, tautómeros del mismo o sales del nuevo compuesto o de sus tautómeros.

45 Con el fin de resolver los problemas existentes, los presentes inventores han llevado a cabo extensos estudios para lograr aislar como un nuevo microorganismo una cepa bacteriana perteneciente al género *Amycolatopsis*, y han descubierto que esta cepa bacteriana produce un antibiótico con un nuevo esqueleto estructural. Los presentes inventores han descubierto que este antibiótico tiene una excelente actividad antibacteriana contra gran variedad de bacterias patógenas, tales como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico, y también han confirmado que este antibiótico es un compuesto nuevo mediante análisis de su estructura química. La presente invención se ha realizado en base a estos resultados. En particular, los presentes inventores han llamado a este nuevo compuesto "amicolamicina".

50 La presente invención se basa en los resultados arriba mencionados obtenidos por los presentes inventores. Los medios para resolver los problemas arriba mencionados son los siguientes:

1) Un compuesto que tiene una estructura representada por la siguiente Fórmula Estructural (1), tautómeros del mismo o sales del compuesto o de sus tautómeros.



Fórmula Estructural (1)

- 2) Un método para producir el compuesto, sus tautómeros o sales de acuerdo con 1), que incluye: cultivar un microorganismo perteneciente al género *Amycolatopsis* capaz de producir el compuesto, tautómeros o sales de acuerdo con 1), y
- 5 aislar el compuesto, tautómeros o sales de acuerdo con 1) a partir del cultivo obtenido en el paso anterior.
- 3) El método de acuerdo con 2), donde el microorganismo es un microorganismo de la cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-fF5 depositada bajo el número de acceso FERM P-21465.
- 4) Un microorganismo, perteneciendo éste al género *Amycolatopsis* y capaz de producir el compuesto, tautómeros o sales de acuerdo con 1), siendo un microorganismo de la cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-fF5 depositada bajo el
- 10 número de acceso FERM P-21465.
- 5) Un agente antibacteriano que incluye el compuesto, tautómeros o sales de acuerdo con 1) que sirve como principio activo.

La presente invención puede proporcionar un nuevo compuesto que tiene una excelente actividad antibacteriana contra gran variedad de bacterias patógenas, tales como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan

15 neumonía en ganado doméstico, tautómeros del mismo, o sales del nuevo compuesto o de sus tautómeros; un método para producir el nuevo compuesto, tautómeros del mismo o sales del nuevo compuesto o de sus tautómeros; un nuevo microorganismo que produce el nuevo compuesto, tautómeros del mismo o sales del nuevo compuesto o de sus tautómeros; y un agente antibacteriano que contiene el nuevo compuesto, tautómeros del mismo o sales del nuevo

20 compuesto o de sus tautómeros. Todo ello puede resolver los problemas arriba mencionados y lograr los objetos citados.

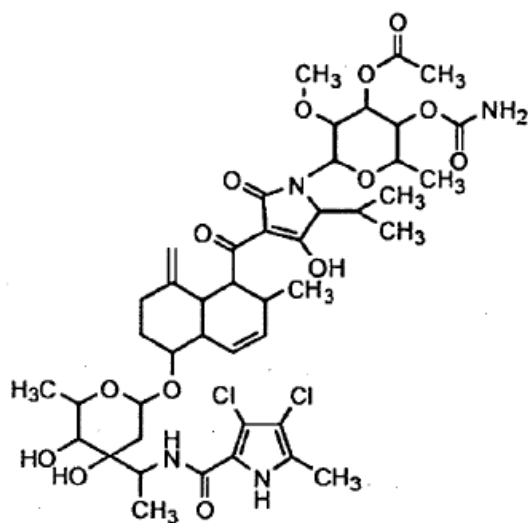
Breve descripción de las figuras

- Fig. 1: gráfico del espectro de absorción infrarrojo de la amicolamicina medido por el método de tableta KBr, el eje vertical representa la transmitancia (%) y el eje horizontal el número de onda (cm^{-1}).
- Fig. 2: gráfico del espectro de absorción UV de la amicolamicina medido en metanol, el eje vertical representa la absorbancia (Abs) y el eje horizontal la longitud de onda (nm).
- Fig. 3: gráfico del espectro de resonancia magnética nuclear ^1H de la amicolamicina medido en metanol deuterado a 30°C y 600 MHz, la unidad del eje horizontal es ppm.
- Fig. 4: gráfico del espectro RMN- ^{13}C de la amicolamicina medido en metanol deuterado a 30°C y 150 MHz, la
- 25 unidad del eje horizontal es ppm.

Descripción de realizaciones

Compuestos, tautómeros de los mismos o sales del compuesto o de los tautómeros

Un compuesto de la presente invención tiene una estructura expresada mediante la siguiente Fórmula Estructural (1). El compuesto con la siguiente Fórmula Estructural (1) es un compuesto nuevo separado por los presentes inventores (denominado en adelante "amicolamicina").



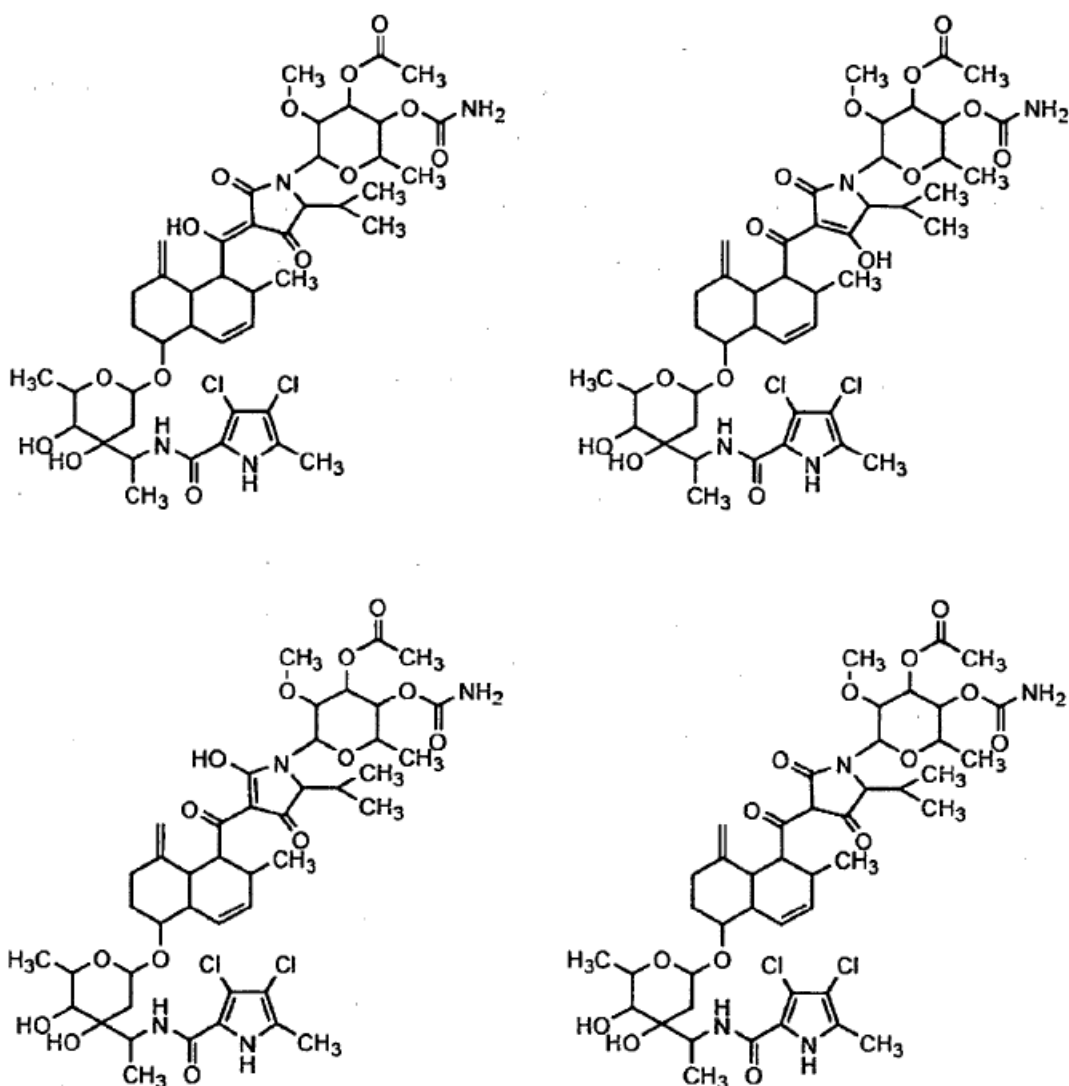
Fórmula Estructural (1)

Las propiedades fisicoquímicas del compuesto de la Fórmula Estructural (1) arriba mostrada (es decir, la amicolamicina) son las siguientes:

1. Aspecto: polvo blanco.
2. Fórmula molecular: $C_{44}H_{60}Cl_2N_4O_{14}$
3. Espectrometría de masas de alta resolución (HRESIMS: modo de ión negativo):
Calculado: m/z 937,3386 (M-H)⁻
Hallado: m/z 937,3405 (como $C_{44}H_{59}Cl_2N_4O_{14}$)
4. Rotación específica $[\alpha]_D^{23} = -21,6^\circ$ (c 0,5, metanol)
5. Espectro de absorción infrarrojo como muestra la Fig. 1.
6. Espectro de absorción UV como muestra la Fig. 2.
7. Espectro de resonancia magnética nuclear 1H (RMN) medido en metanol deuterado a 30°C y 600 MHz como muestra la Fig. 3.
8. Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C (RMN) medido en metanol deuterado a 30°C y 150 MHz como muestra la Fig. 4.
9. Cromatografía de capa fina utilizando gel de sílice 60F₂₅₄ (producto de Merck Co.) y un disolvente de desarrollo de cloroformo:metanol (9:1 en volumen), valor R_f 0,31.

Diversos métodos de análisis apropiadamente seleccionados permiten determinar si un compuesto tiene una estructura expresada por la Fórmula Estructural (1). Esta determinación se puede llevar a cabo midiendo el espectro de resonancia magnética nuclear 1H , el espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C , el espectro de absorción infrarrojo o el espectro de masas arriba mencionados.

En particular, la amicolamicina tiene tautomerismo y, en consecuencia, incluye los tautómeros de la misma. Ejemplos no limitativos de tautómeros de amicolamicina incluyen aquellos con las siguientes cuatro Fórmulas Estructurales. La amicolamicina puede presentar varios patrones estructurales diferentes y no se considera que exista en un estado fijo determinado.



5 Los espectros de la amicolicina obtenidos mediante análisis espectral de resonancia magnética nuclear ^1H , análisis espectral de resonancia magnética nuclear ^{13}C , etc. pueden ser algo diferentes a los mostrados en las Fig. 3 y 4. En este contexto, los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que el compuesto de Fórmula Estructural (1) puede presentar en realidad varios patrones estructurales diferentes y no existe en un estado fijo determinado. Por consiguiente, aunque un compuesto muestre un espectro de resonancia magnética nuclear ^1H algo diferente al de la Fig. 3, un espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C algo diferente al de la Fig. 4 y otros espectros algo diferentes, los expertos en la técnica podrán identificar fácilmente el compuesto como amicolicina.

10 Además, la amicolicina puede estar en forma de sal. La sal no está sometida a ninguna limitación particular y se puede seleccionar apropiadamente en función del objetivo previsto. Ejemplos de sales incluyen sales formadas con metales alcalinos, como sodio y potasio; sales formadas con metales alcalinotérreos, como calcio y magnesio; y sales formadas con aminas orgánicas, como metilamina, etilamina y dietanolamina.

15 La amicolicina, los tautómeros de la misma o las sales de la amicolicina o de los tautómeros se pueden producir a partir de las bacterias que producen la amicolicina o se pueden obtener por síntesis química. Entre éstos, la amicolicina, los tautómeros de la misma o las sales de la amicolicina o de los tautómeros se obtienen preferentemente mediante el método de la presente invención descrito más abajo para producir el compuesto, tautómeros del mismo, o sales del compuesto o de sus tautómeros.

20 Como muestran los Ejemplos de Ensayo 1 a 4 descritos más abajo, la amicolicina, los tautómeros de la misma o las sales de la amicolicina o de los tautómeros tienen en cada caso una excelente actividad antibacteriana contra gran variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas, tales como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico. Por consiguiente, la amicolicina, los tautómeros de la misma, o las sales de la amicolicina o de los tautómeros pueden ser utilizados en cada caso de forma adecuada, por ejemplo, como un principio activo del agente antibacteriano de la presente invención descrito más abajo.

Método para producir el compuesto, tautómeros del mismo o sales del compuesto o de los tautómeros

5 Un método para producir el compuesto de la presente invención, es decir, amicolamicina, tautómeros del mismo o sales del compuesto o de los tautómeros, incluye: cultivar un microorganismo perteneciente al género *Amycolatopsis* capaz de producir amicolamicina, tautómeros o sales de amicolamicina o de los tautómeros; y aislar la amicolamicina, sus tautómeros o sales de la amicolamicina o de los tautómeros a partir de un cultivo obtenido en el paso anterior. En particular, la amicolamicina obtenida a través del cultivo del microorganismo se puede denominar en adelante como "amicolamicina antibiótica".

10 La amicolamicina antibiótica se produce tal como se describe a continuación. Específicamente, los microorganismos que producen la amicolamicina antibiótica (en adelante se pueden designar simplemente como "microorganismos productores de amicolamicina") se inoculan en un medio nutriente y se cultivan a una temperatura adecuada para producir la amicolamicina antibiótica, obteniéndose un cultivo que contiene la amicolamicina antibiótica.

15 El medio nutriente utilizado para el cultivo arriba descrito es un medio nutriente que puede ser utilizado para cultivar actinomicetos. Ejemplos de fuentes de nutrientes añadidas al medio nutriente incluyen fuentes de nitrógeno, como harina de soja, disponible en el mercado, peptona, extracto de levadura, extracto de carne, licor de maíz y sulfato de amonio; carbohidratos, como pasta de tomate, glicerina, almidón, glucosa, galactosa y dextrina; y fuentes de carbono, como grasas. Además se pueden añadir al medio antes de su uso sales inorgánicas tales como cloruro de sodio y carbonato de calcio. En caso necesario también se puede añadir al medio antes de su uso trazas de una sal metálica. Se puede utilizar cualquier material de cultivo conocido, siempre que el material pueda ser utilizado por los microorganismos productores de amicolamicina para promover la producción de amicolamicina antibiótica.

20 Para la producción de la amicolamicina antibiótica se utiliza el microorganismo perteneciente al género *Amycolatopsis* capaz de producir amicolamicina antibiótica. Específicamente se ha determinado que un microorganismo de la cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-fF5 aislada por los presentes inventores (FERM P-21465, cuyos detalles se describen más abajo en la sección "Microorganismos" de la presente invención) puede producir la amicolamicina antibiótica. También es posible aislar otras cepas capaces de producir la amicolamicina antibiótica del mundo natural mediante un método rutinario para aislar bacterias que producen antibióticos. En particular, a través de tratamientos de mutación, como exposición a radiación, el microorganismo de la cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-fF5 y otros microorganismos capaces de producir amicolamicina antibiótica pueden mutar para que tengan mayor capacidad de producción de amicolamicina antibiótica. Además, la amicolamicina antibiótica se puede producir por técnicas de ingeniería genética.

30 El cultivo de siembra utilizado para producir la amicolamicina antibiótica puede ser, por ejemplo, el cultivo de crecimiento obtenido mediante cultivo de agar inclinado de las bacterias productoras de amicolamicina sobre un medio de agar. Para la producción de la amicolamicina antibiótica es preferible cultivar las bacterias productoras de amicolamicina bajo condiciones aeróbicas en un medio apropiado. Además, para aislar el compuesto objetivo del cultivo resultante se puede utilizar un método rutinario. La temperatura de cultivo no está sometida a ninguna limitación particular y se puede determinar en función del tipo de microorganismos productores de amicolamicina, siempre que no se inhiba esencialmente el crecimiento de los microorganismos productores de amicolamicina y que los microorganismos productores de amicolamicina puedan producir la amicolamicina antibiótica. La temperatura de cultivo oscila preferentemente entre 25°C y 35°C.

35 Por ejemplo, la producción de amicolamicina antibiótica por la cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-fF5 es máxima durante 3 a 9 días. En general es preferible que la producción de la amicolamicina antibiótica se lleve a cabo hasta que el medio muestre suficiente actividad antibacteriana. Los cambios con el tiempo del título de la amicolamicina antibiótica en el cultivo se pueden medir, por ejemplo, mediante HPLC o con un método de placa cilíndrica utilizando *Staphylococcus aureus* u otras bacterias como bacterias de ensayo.

45 En el método de producción arriba indicado, la amicolamicina antibiótica se aísla del cultivo obtenido. El método de aislamiento puede utilizar apropiadamente un método empleado para recuperar metabolitos producidos por microorganismos. Ejemplos de métodos de aislamiento para la amicolamicina antibiótica incluyen métodos de extracción con disolventes inmiscibles con agua, métodos donde se utilizan las diferencias de afinidad de adsorción con diversos adsorbentes, filtración en gel, cromatografía utilizando distribución en contracorriente y combinaciones de los mismos. Los microorganismos separados se tratan con un método de extracción utilizando un disolvente orgánico apropiado o un método de elución a través de la disrupción de microorganismos, pudiéndose recuperar la amicolamicina antibiótica mediante extracción de los microorganismos y aislamiento/purificación tal como se describe más arriba.

50 El método de producción se puede realizar tal como se describe más arriba para producir la amicolamicina antibiótica o tautómeros de la misma.

55 Dado que la amicolamicina o sus tautómeros son en cada caso compuestos ácidos, las sales de la amicolamicina o de los tautómeros se pueden producir en general mediante métodos conocidos, utilizando, por ejemplo, diversos metales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo metales alcalinos) o bases orgánicas (por ejemplo sales de amonio cuaternario).

Microorganismo

5 Un microorganismo de la presente invención pertenece al género *Amycolatopsis* y es capaz de producir el compuesto de la presente invención arriba descrito, esto es amicolamicina, tautómeros de la misma o sales de amicolamicina o de los tautómeros. El microorganismo no está sometido a ninguna limitación particular y se puede elegir apropiadamente en función del objetivo previsto, siempre que pertenezca al género *Amycolatopsis* y sea capaz de producir la amicolamicina, tautómeros de la misma o sales de la amicolamicina o de los tautómeros y, por consiguiente, que pueda ser utilizado como microorganismo productor de amicolamicina en el método de producción arriba descrito para el compuesto de la presente invención, sus tautómeros o las sales del compuesto o de los tautómeros.

10 En particular, preferentemente se utilizan actinomicetos aislados del suelo de Sendai-shi Miyagi, que han recibido el número de acceso cepa MK575-fF5 en mayo de 1996 por el centro de investigación de química microbiana de la Microbial Chemistry Research Foundation. Las características micológicas de la cepa MK575-fF5 son las siguientes.

1. Morfología

15 Lashifas sustrato están muy ramificadas en forma de zigzag y están divididas. Las hifas aéreas se desarrollan en algunos casos o no en otros casos. Cuando las hifas aéreas se desarrollan, son relativamente largas y lineales o irregularmente curvadas, y además están divididas en esporas cilíndricas. La superficie es suave y el tamaño es de aproximadamente 0,4 µm a 0,6 µm x 0,8 µm a 2,2 µm. Además, las hifas aéreas pueden estar enredadas entre sí presentando una forma esférica. No se observan espirales, cordones micelares, esporangios ni esporas móviles.

2. Condiciones de crecimiento en diversos medios

20 Los patrones en manta relativos a colores se basan en el manual de armonía de colores de la Container Corporation of America.

- 1) Medio de agar de malta-levadura (medio ISP 2, cultivo a 27°C)

Esta cepa se desarrolla en amarillo claro [2 gc, Bamboo] y forma ligerashifas aéreas blancas en algunos casos o no las forma en otros casos. No se producen colorantes solubles.

- 25 2) Medio de agar de harina de avena (medio ISP 3, cultivo a 27°C)

Esta cepa se desarrolla en amarillo claro [2 gc, Bamboo] y forma ligerashifas aéreas blancas en algunos casos o no las forma en otros casos. No se producen colorantes solubles.

- 3) Medio de agar de sal inorgánica-almidón (medio ISO 4, cultivo a 27°C)

30 Esta cepa se desarrolla en amarillo claro [2ea, Lt Wheat] a amarillo mate [3 nc, Ámbar] y forma ligerashifas aéreas blancas en algunos casos. No se producen colorantes solubles.

- 4) Medio de agar de asparagina-glicerina (medio ISP 5, cultivo a 27°C)

Esta cepa se desarrolla en naranja amarillento mate [3 lc, Amber] y forma hifas aéreas de color naranja claro [4ea, Light Apricot] en algunos casos o no las forma en otros casos. No se producen colorantes solubles.

- 5) Medio de agar de tirosina (medio ISP 7, cultivo a 27°C)

35 Esta cepa se desarrolla en amarillo claro [3 ca, Pearl Pink] a naranja amarillento mate [3 lc, Amber] y forma hifas aéreas de color naranja claro [4ca, Fresh Pink] en algunos casos o no las forma en otros casos. No se producen colorantes solubles.

- 6) Medio de agar de nitrato-sacarosa (cultivo a 27°C)

40 Esta cepa se desarrolla en incoloro a naranja amarillento claro [3 ea, Lt Melon Yellow] y forma ligeras hifas aéreas blancas en algunos casos o no las forma en otros casos. No se producen colorantes solubles.

3. Propiedades fisiológicas

1. Intervalo de temperatura de crecimiento

45 Esta cepa se cultivó en un medio de agar de ácido aspártico-glucosa (glucosa: 1,0%, ácido L-aspártico: 0,05%, hidrogenofosfato dipotásico: 0,05%, agar de cadena: 3,0%, pH 7,0) a una temperatura de 10°C, 20°C, 24°C, 27°C, 30°C, 37°C, 45°C o 50°C. Como resultado, la cepa no se desarrolló a 10°C, 45°C o 50°C, sino que se desarrolló a una temperatura de 20°C a 37°C. La temperatura de crecimiento óptima es de aproximadamente 30°C.

2. Hidrólisis de almidón (medio de agar de sal inorgánica-almidón, medio ISP 4, cultivo a 27°C)

Negativo el día 21 desde el comienzo del cultivo.

3. Producción de colorante de tipo melanina (caldo de levadura-tripton, medio ISP 1; medio de agar de peptona-levadura-hierro, medio ISP 6; medio de agar de tirosina, medio ISP 7; cultivo a 27°C para cada medio).

Negativo en cada medio.

5 4. Disponibilidad de fuente de carbono (medio de agar Pridham-Godleeve, medio ISP 9; cultivo a 27°C)

Esta cepa se desarrolla utilizando D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-fructosa, sacarosa, inositol, ramnosa, rafinosa y D-manitol.

5. Reacción de reducción de nitrato (agua de peptona con contenido de 0,1% nitrato de potasio, medio o ISP 8, cultivo a 27°C)

10 Positivo.

4. Componentes microbianos

1. Composición de la pared celular

La pared celular contiene ácido meso-2,6-diaminopimélico.

2. Reducción de azúcar en cada microorganismo

15 Cada microorganismo contiene arabinosa y galactosa (Tipo A).

3. Isoprenoide quinona

Contiene MK-9 (H₄) y una pequeña cantidad de MK-10 (H₄) como menaquinona principal.

4. Fosfolípido

20 Tipo PII (contiene fosfatidiletanolamina, pero no incluye fosfatidilcolina ni fosfolípidos con contenido de glucosamina desconocidos).

5. Ácido micólico

No contiene.

5. Análisis del gen 16S ARNr

25 Se determinó una secuencia parcial de nucleótidos (1.455 nt) del gen 16S ARNr y se examinó en cuanto a la homología en referencia a la base de datos de secuencias de nucleótidos internacional (GenBank/DDBJ/EMBL). Como resultado se comprobó que la secuencia de nucleótidos de la cepa MK575-fF5 tiene una gran homología con las de los genes 16S ARNr de actinomicetos pertenecientes al género *Amycolatopsis*; esto es *Amycolatopsis kentuckyensis* (99,1%), *Amycolatopsis rifamycinica* (99,03%), *Amycolatopsis mediterranei* (98,9%), *Amycolatopsis balhimycetica* (98,82%), etc. Obsérvese que los valores entre paréntesis corresponden a la homología entre las secuencias de nucleótidos.

30 En resumen, las hifas sustrato de la cepa MK575-fF5 están en forma de zigzag y divididas. Las hifas aéreas son lineales o están curvadas de forma irregular y están divididas en esporas cilíndricas. No se observan espirales, cordones micelares, esporangios ni esporas móviles. La cepa MK575-fF5 se desarrolla en incoloro a naranja amarillento en diversos medios. En algunos casos se forman hifas aéreas de color blanco a naranja claro o en otros casos no se forman. No se producen colorantes solubles. La temperatura de crecimiento óptima es de aproximadamente 30°C. La cepa es negativa en términos de producción de colorantes similares a la melanina y la hidrólisis de almidón, pero es positiva en términos de la reacción de reducción de nitrato.

40 En lo que respecta a los componentes microbianos de la cepa MK575-fF5, los hidrolizados de cada microorganismo contienen ácido meso-2,6-diaminopimélico, arabinosa y galactosa, la pared celular es de tipo IV y los azúcares reductores de cada microorganismo son de tipo A. Además, no está presente ácido micólico y el fosfolípido es de tipo PII (contiene fosfatidiletanolamina, pero no incluye fosfatidilcolina ni fosfolípidos con contenido de glucosamina desconocidos) y la menaquinona principal es MK-9(H₄).

Mediante comparación de la secuencia de nucleótidos parcial del gen 16S ARNr con datos correspondientes de cepas bacterianas conocidas se comprobó que la secuencia de nucleótidos presenta una alta homología con las de actinomicetos pertenecientes al género *Amycolatopsis*.

45 En conclusión, se consideró que la cepa MK575-fF5 pertenece al género *Amycolatopsis* (International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 36, pp. 29-37, 1986). La cepa MK575-fF5 se denominó cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-fF5. En particular se solicitó el depósito de la cepa MK575-fF5 en el National Institute of Advanced Industrial Science

and Technology, International Patent Organism Depository y fue aceptada como FERM P-21465 el 12 de diciembre de 2007.

Agente antibacteriano

5 Un agente antibacteriano de la presente invención contiene como principio activo el compuesto de la presente invención arriba descrito, esto es amicolamicina, tautómeros de la misma o sales de la amicolamicina o de los tautómeros; y, en caso necesario, también contiene otros ingredientes.

10 La cantidad de amicolamicina, tautómeros de la misma o sales de la amicolamicina o de los tautómeros contenida en el agente antibacteriano no está sometida a ninguna limitación particular y se puede elegir apropiadamente en función del objetivo previsto. El agente antibacteriano puede consistir en la propia amicolamicina, los propios tautómeros de la misma o las propias sales de la amicolamicina o de los tautómeros.

15 El resto de los ingredientes no están sometidos a ninguna limitación particular y se pueden elegir apropiadamente en función del objetivo previsto, por ejemplo de entre vehículos farmacológicamente apropiados. Ejemplos de estos otros ingredientes incluyen etanol, agua y almidón. La cantidad de los otros ingredientes incluidos en el agente antibacteriano no está sometida a ninguna limitación particular y se puede elegir apropiadamente en función del objetivo previsto de modo que no influya negativamente en los efectos de la amicolamicina, los tautómeros de la misma o las sales de la amicolamicina o de los tautómeros.

La forma de dosificación del agente antibacteriano no está sometida a ninguna limitación particular y se puede elegir apropiadamente en función del objetivo previsto. Ejemplos de formas de dosificación incluyen polvo, cápsulas, pastillas y líquidos. El agente antibacteriano se puede obtener de forma rutinaria en cada una de estas formas de dosificación.

20 El método de administración del agente antibacteriano no está sometido a ninguna limitación particular y se puede elegir apropiadamente, por ejemplo dependiendo de la forma de dosificación del agente antibacteriano. El agente antibacteriano se puede administrar vía oral o parenteral.

25 La dosis del agente antibacteriano no está sometida a ninguna limitación particular y se puede determinar apropiadamente teniendo en cuenta los diversos factores individuales en cuestión, por ejemplo edad, peso corporal, constitución, síntomas y el uso concomitante de un medicamento que contiene otros principios activos.

Las especies animales a las que se puede administrar el agente antibacteriano no están sometidas a ninguna limitación particular y se pueden elegir apropiadamente en función del objetivo previsto. Ejemplos de las mismas incluyen humanos, monos, cerdos, bovinos, ovejas, cabras, perros, gatos, ratones, ratas y aves.

30 Como muestran los Ejemplos de Ensayo 1 a 4 descritos más abajo, dado que el agente antibacteriano contiene como principio activo amicolamicina, tautómeros de la misma o sales de la amicolamicina o de los tautómeros, tiene una excelente actividad antibacteriana contra una gran variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas, tales como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico. Por consiguiente, el agente antibacteriano puede ser utilizado adecuadamente para la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas, como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan
35 neumonía en ganado doméstico, tal como muestran los Ejemplos de Ensayo 1 a 4 descritos más abajo. El agente antibacteriano puede ser utilizado solo o en combinación con un medicamento que contenga otros principios activos. Además, el agente antibacteriano se puede incorporar antes de su uso en un medicamento que contenga otros principios activos.

Ejemplos

40 La presente invención se describe a continuación de forma detallada por medio de Ejemplos y Ejemplos de Ensayo. En los Ejemplos y Ejemplos de Ensayo, la unidad "%" significa "% en masa" a no ser que se especifique de otra manera.

Ejemplo 1: Producción de amicolamicina

45 En un medio de agar inclinado se cultivaron células de la cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-fF5 (depositada como FERM P-21465). Por separado, un medio líquido que contenía un 2% de galactosa, un 2% de dextrina, un 1% de glicerina, un 1% de Bacto Soytone (producto de Difco Co., Ltd.), un 0,5% de licor de maíz, un 0,2% de sulfato de amonio y un 0,2% de carbonato de calcio (habiéndose ajustado el pH del medio líquido a 7,4) se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 500 ml de modo que cada matraz Erlenmeyer contenía 110 ml del medio líquido, y después se esterilizó de forma rutinaria a 120°C durante 20 minutos. Las células cultivadas tal como se indica más arriba se inocularon en el medio líquido. Después, las células se sometieron a cultivo agitado mediante rotación a 30°C durante 4 días, para así obtener
50 líquidos de cultivo simiente.

En un depósito de cultivo de 200 l se preparó un medio (100 l) que tenía la siguiente composición: un 0,5% de glicerina, un 0,5% de dextrina, un 0,25% de Bacto Soytone (producto de Difco Co., Ltd.), un 0,075% de extracto de levadura (producto de NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.), un 0,05% de sulfato de amonio y un 0,05% de carbonato de calcio (habiéndose ajustado el pH del medio líquido a 7,4), y después se esterilizó para obtener un medio de producción.

Un 2 por ciento en volumen de cada cultivo de simiente se inoculó en el medio de producción y después se cultivó en el depósito durante cuatro días bajo las siguientes condiciones: 27°C, 200 rpm, caudal de aire: 100 l/min.

5 El cultivo así obtenido se centrifugó para separarlo en 80 l del filtrado de cultivo y 2,5 kg de los microorganismos. A continuación se añadieron 12 l de metanol a los microorganismos y la mezcla resultante se agitó a fondo. Después se extrajo amicolamicina de los microorganismos con metanol y luego se retiró el metanol bajo presión reducida, obteniéndose así 2 l de un extracto de microorganismos que contenía amicolamicina. Después se añadieron 6 l de acetato de etilo al extracto de microorganismos (2 l) y la mezcla resultante se agitó a fondo para extraer la amicolamicina con acetato de etilo. La mezcla resultante tratada con 6 l de acetato de etilo se secó con sulfato de sodio anhidro y después se concentró y secó bajo presión reducida, obteniéndose así 18 g de un producto crudo que contenía amicolamicina. Luego se añadió hexano (200 ml) a 18 g del producto crudo que contenía amicolamicina y los ingredientes solubles en hexano se retiraron, de este modo se obtuvieron 3,3 g de una fracción insoluble en hexano que contenía amicolamicina. La fracción insoluble en hexano (3,3 g) que contenía amicolamicina se disolvió en metanol y la solución resultante se separó por cromatografía con una columna Sephadex LH-20 (diámetro interior: 28 mm x longitud: 10 450 mm, producto de Pharmacia Biotech Inc.). La solución se fraccionó cada 8 g (una fracción) y, como resultado, las fracciones activas se eluyeron como fracciones 12 a 15. Las fracciones se recogieron y se concentraron y secaron bajo presión reducida para obtener 1.584 mg de un producto crudo que contenía amicolamicina. El producto crudo así obtenido (1.584 mg) se disolvió en una pequeña cantidad de metanol y a la solución resultante se le añadieron 50 ml de gel de sílice (producto de Merck Co.). Después, el disolvente se concentró y secó bajo presión reducida. El gel de sílice se aplicó a una columna de gel de sílice (diámetro interior: 32 mm x longitud: 175 mm, producto de Merck Co.) para 20 realizar una cromatografía. Los disolventes de desarrollo utilizados secuencialmente fueron cloroformo:metanol:agua = 100:0:0 (200 ml), 95:5:0 (450 ml), 1:95:5:0,25 (450 ml) y 1:90:10:0,5 (450 ml). La cromatografía se fraccionó cada 18 g (una fracción) y, como resultado, se eluyó amicolamicina como fracciones 76 a 103. Las fracciones se recogieron y se concentraron y secaron bajo presión reducida para obtener 827 mg de amicolamicina pura.

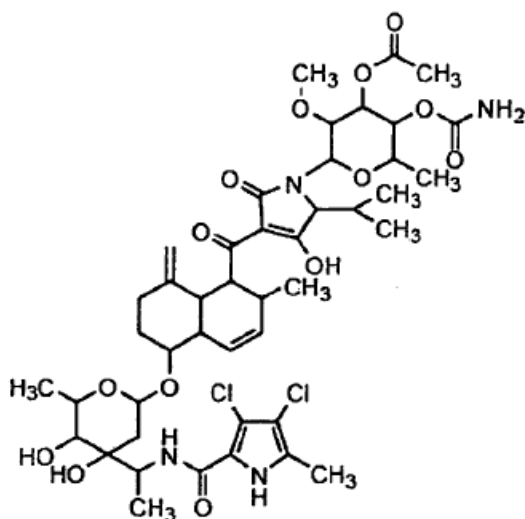
25 Mediante el análisis de las propiedades fisicoquímicas de la amicolamicina obtenida se comprobó que ésta tenía las propiedades fisicoquímicas indicadas más abajo. A partir de las propiedades fisicoquímicas se confirmó que la amicolamicina era un nuevo compuesto que presentaba una estructura expresada por la siguiente Fórmula Estructural (1). Además se comprobó que esta amicolamicina tiene tautomerismo.

1. Aspecto: polvo blanco.
2. Fórmula molecular: $C_{44}H_{60}Cl_2N_4O_{14}$
- 30 3. Espectrometría de masas de alta resolución (HRESIMS: modo de ión negativo)

Calculado: m/z 937,3386 (M-H)⁻

Hallado: m/z 937,3405 (como $C_{44}H_{59}Cl_2N_4O_{14}$)

4. Rotación específica $[\alpha]_D^{23} = -21,6^\circ$ (c 0,5, metanol)
5. Espectro de absorción infrarrojo como muestra la Fig. 1.
- 35 6. Espectro de absorción UV como muestra la Fig. 2.
7. Espectro de resonancia magnética nuclear 1H (RMN) medido en metanol deuterado a 30°C y 600 MHz como muestra la Fig. 3.
8. Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C (RMN) medido en metanol deuterado a 30°C y 150 MHz como muestra la Fig. 4.
- 40 9. Cromatografía de capa fina utilizando gel de sílice 60F254 (producto de Merck Co.) y un disolvente de desarrollo de cloroformo:metanol (9:1 en volumen), Rf 0,31.



Fórmula Estructural (1)

Además, la amicolamicina obtenida se midió en cuanto a la actividad antibacteriana en los siguientes Ejemplos de Ensayo 1 a 4.

Ejemplo de Ensayo 1

- 5 De acuerdo con el método estándar de la Sociedad Japonesa de Quimioterapia, la amicolamicina se midió en cuanto al espectro antimicrobiano contra diversos microorganismos, incluyendo bacterias resistentes a medicamentos (por ejemplo bacterias resistentes a la metilina y bacterias resistentes a la vancomicina) en el medio de agar de Muller Hinton mediante el método de dilución múltiple. La Tabla 1 muestra las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) medidas.

10 Ejemplo de Ensayo 2

- De acuerdo con el método estándar de la Sociedad Japonesa de Quimioterapia, la amicolamicina se midió en cuanto al espectro antimicrobiano contra diversos microorganismos, incluyendo bacterias resistentes a medicamentos (por ejemplo neumococos resistentes a la penicilina, neumococos resistentes a los macrólidos y gripe resistente a la penicilina) en el medio de agar de Muller Hinton complementado con sangre de oveja (5% en volumen) mediante el método de dilución múltiple en una atmósfera de un 5% en volumen de CO₂. La Tabla 2 muestra las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) medidas.

Ejemplo de Ensayo 3

- 20 De acuerdo con el método estándar de la Sociedad Japonesa de Quimioterapia, la amicolamicina se midió en cuanto al espectro antimicrobiano contra bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico en el medio de agar de infusión de cerebro y corazón mediante el método de dilución múltiple. La Tabla 3 muestra las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) medidas.

Ejemplo de Ensayo 4

- 25 De acuerdo con el método estándar de la Sociedad Japonesa de Quimioterapia, la amicolamicina se midió en cuanto al espectro antimicrobiano contra bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico diferentes de las incluidas en la Tabla 3 en el medio de agar de Muller Hinton complementado con enriquecimiento de Fields (5% en volumen) mediante el método de dilución múltiple en una atmósfera de un 5% en volumen de CO₂. La Tabla 4 muestra las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) medidas.

Tabla 1

Cepas de microorganismos analizadas	CIM (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	0,39
<i>S.aureus</i> Smith	0,39
<i>S.aureus</i> MS9610	0,39
<i>S.aureus</i> MRSANo.5	0,39
<i>S.aureus</i> MRSANo.17	0,39

<i>S.aureus</i> MS16526 (MRSA)	0,39
<i>S.aureus</i> TY-04282 (MRSA)	0,39
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	0,2
<i>Ent.faecalis</i> NCTC12201 (VRE)	0,1
<i>Ent.faecalis</i> NCTC12203 (VRE)	0,2
<i>Ent.faecium</i> JCM5804	0,78
<i>Ent.faecium</i> NCTC112202 (VRE)	0,78
<i>Ent.faecium</i> NCTC112204 (VRE)	0,78
<i>Escherichiacoli</i> NIHJ	12,5
<i>E.coli</i> K-12	12,5
<i>Klebsiellapneumoniae</i> PC1602	6,25
MRSA: <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	
VRE: <i>Enterococcus</i> resistente a la vancomicina	

Tabla 2CIM (µg/ml)

Cepas de microorganismos analizadas	CIM	Cepas de microorganismos analizadas	CIM
<i>Streptococcus pneumoniae</i> S-223	0,39	<i>Haemophilus influenzae</i> IID938	0,78
<i>S.pneumoniae</i> CR-2(PRSP)	0,39	<i>H.influenzae</i> IID985	0,78
<i>S.pneumoniae</i> T037(PRSP)	0,39	<i>H.influenzae</i> IID986	0,78
<i>S.pneumoniae</i> H69(PRSP)	0,39	<i>H.influenzae</i> IID987	0,78
<i>S.pneumoniae</i> KM99(PRSP)	0,39	<i>H.influenzae</i> IID988	0,78
<i>S.pneumoniae</i> JPS326(<i>ermB</i>)	0,39	<i>H.influenzae</i> T196	0,20
<i>S. pneumoniae</i> JPS344 (<i>ermB</i>)	0,20	<i>H. influenzae</i> ME570(BLNAR)	0,78
<i>S. pneumoniae</i> JPS380 (<i>ermB</i>)	0,39	<i>H. influenzae</i> ME587(BLNAR)	0,78
<i>S. pneumoniae</i> JPS399 (<i>ermB</i>)	0,39	<i>H. influenzae</i> ME870(BLNAR)	0,78
<i>S. pneumoniae</i> JPS408 (<i>ermB</i>)	0,39	<i>H. influenzae</i> MT066(BLNAR)	0,78
<i>S. pneumoniae</i> JPS317 (<i>mefA</i>)	0,39	<i>H. influenzae</i> ARD476(BLPAR)	0,78
<i>S. pneumoniae</i> JPS390 (<i>mefA</i>)	0,39		
<i>S. pneumoniae</i> JPS401 (<i>mefA</i>)	0,10		
<i>S. pneumoniae</i> JPS402 (<i>mefA</i>)	0,20		
<i>S. pneumoniae</i> JPS403 (<i>mefA</i>)	0,20		
PRSP: <i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a la penicilina			
<i>ermB</i> : <i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a los macrólidos			
<i>mefA</i> : <i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a los macrólidos			
BLNAR: <i>Haemophilus influenzae</i> resistente a penicilina no productora de beta-lactamasa			
BLPAR: <i>Haemophilus influenzae</i> resistente a la penicilina productora de beta-lactamasa			

Tabla 3

Microorganismos analizados	Cepas	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Mannheimia haemolytica</i>	N791	0,78
<i>M. haemolytica</i>	N811	0,78
<i>Pasteurella multocida</i>	No. 6	1,56
<i>P. multocida</i>	Kobe	0,78
<i>P. multocida</i>	TS-8	0,78
<i>P. multocida</i>	M-17	0,78

Tabla 4

Microorganismos analizados	Cepas	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	NB001	1,56
<i>A. pleuropneumoniae</i>	YN	0,78
<i>A. pleuropneumoniae</i>	SHP-17	1,56
<i>A. pleuropneumoniae</i>	CH-1	1,56
<i>A. pleuropneumoniae</i>	CH-(H4024)	1,56
<i>A. pleuropneumoniae</i>	M-1	0,78
<i>A. pleuropneumoniae</i>	O-223	1,56
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Shop1421	3,13
<i>A. pleuropneumoniae</i>	HPT-1	1,56
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Hi-1	3,13
<i>A. pleuropneumoniae</i>	6H-8	1,56
<i>A. pleuropneumoniae</i>	7H-3	1,56
<i>Histophilus somni</i>	23N2359	0,20

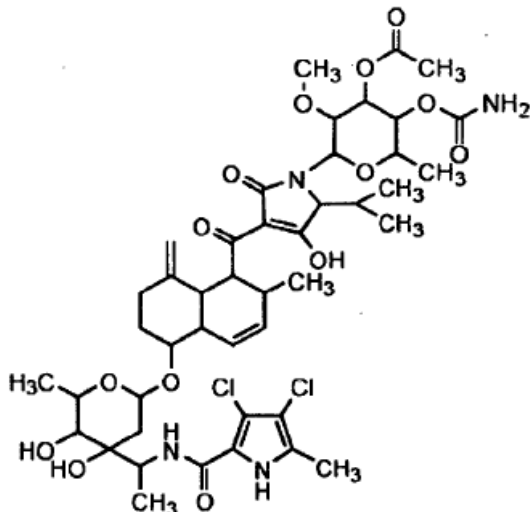
- 5 A partir de los resultados de las Tablas 1 a 4 se comprobó que la amicolamicina tiene una excelente actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico. Entre otros, se ha comprobado que la amicolamicina presenta una actividad antibacteriana particularmente buena contra *Staphylococcus aureus* incluyendo MRSA, *Enterococcus faecalis/faecium* incluyendo VRE, *Streptococcus pneumoniae* incluyendo bacterias resistentes a los macrólidos y bacterias resistentes a la penicilina, *Haemophilus influenzae* incluyendo bacterias resistentes a la penicilina, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*.

Aplicación industrial

- 15 El nuevo compuesto (amicolamicina) de la presente invención, los tautómeros del mismo o las sales del compuesto (amicolamicina) o de los tautómeros tienen una excelente actividad antibacteriana contra gran variedad de bacterias patógenas, como bacterias resistentes a medicamentos y bacterias que provocan neumonía en ganado doméstico y, por consiguiente, pueden ser utilizados adecuadamente como agentes antibacterianos.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene una estructura expresada por la siguiente Fórmula Estructural (1), tautómeros del mismo o sales del compuesto o de los tautómeros.



Fórmula Estructural (1)

- 5 2. Método para producir el compuesto, tautómeros o sales del compuesto o de los tautómeros, que comprende:
- cultivar un microorganismo perteneciente al género *Amycolatopsis* capaz de producir el compuesto, tautómeros o sales según la reivindicación 1, y
- aislar el compuesto, los tautómeros o las sales según la reivindicación 1 a partir de un cultivo obtenido en el paso anterior.
- 10 3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque el microorganismo es un microorganismo de la cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-ff5 depositada bajo el número de acceso FERM P-21465.
4. Microorganismo que pertenece al género *Amycolatopsis* y es capaz de producir el compuesto, los tautómeros o las sales según la reivindicación 1, siendo el microorganismo un microorganismo de la cepa *Amycolatopsis sp.* MK575-ff5 depositada bajo el número de acceso FERM P-21465.
- 15 5. Agente antibacteriano que incluye el compuesto, los tautómeros o las sales según la reivindicación 1, que sirve como principio activo.

FIG. 1

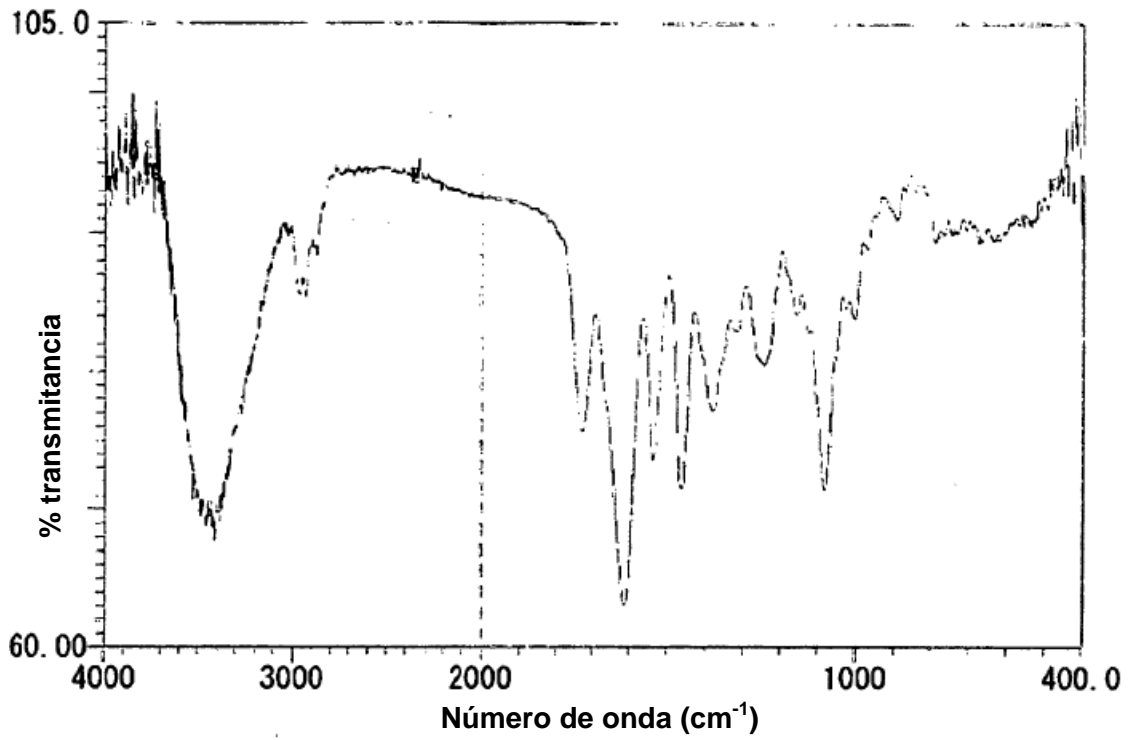


FIG. 2

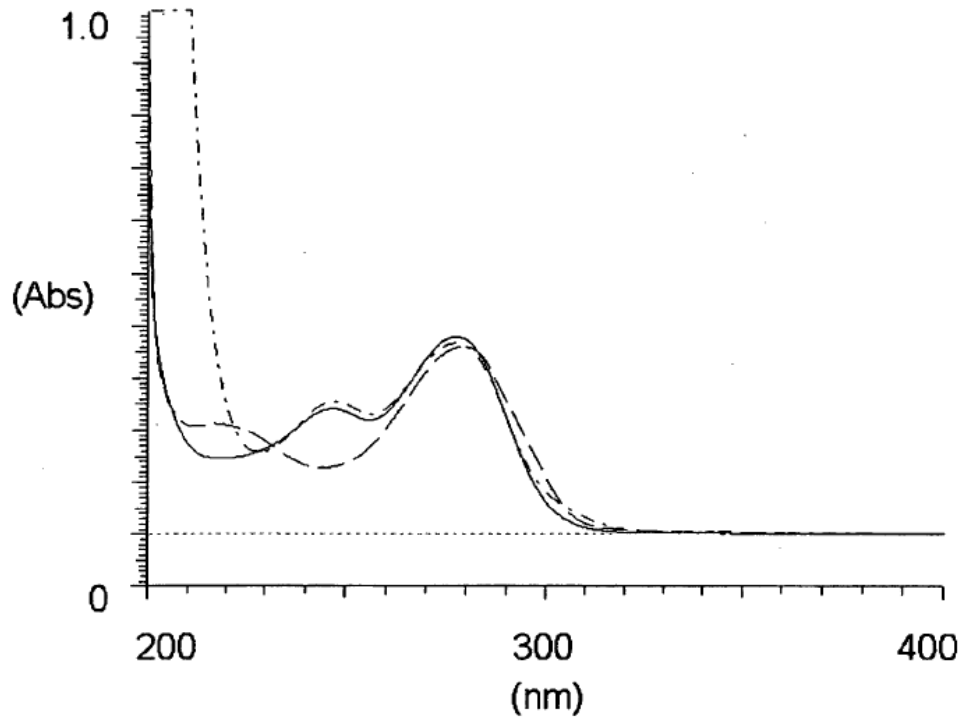


FIG. 3

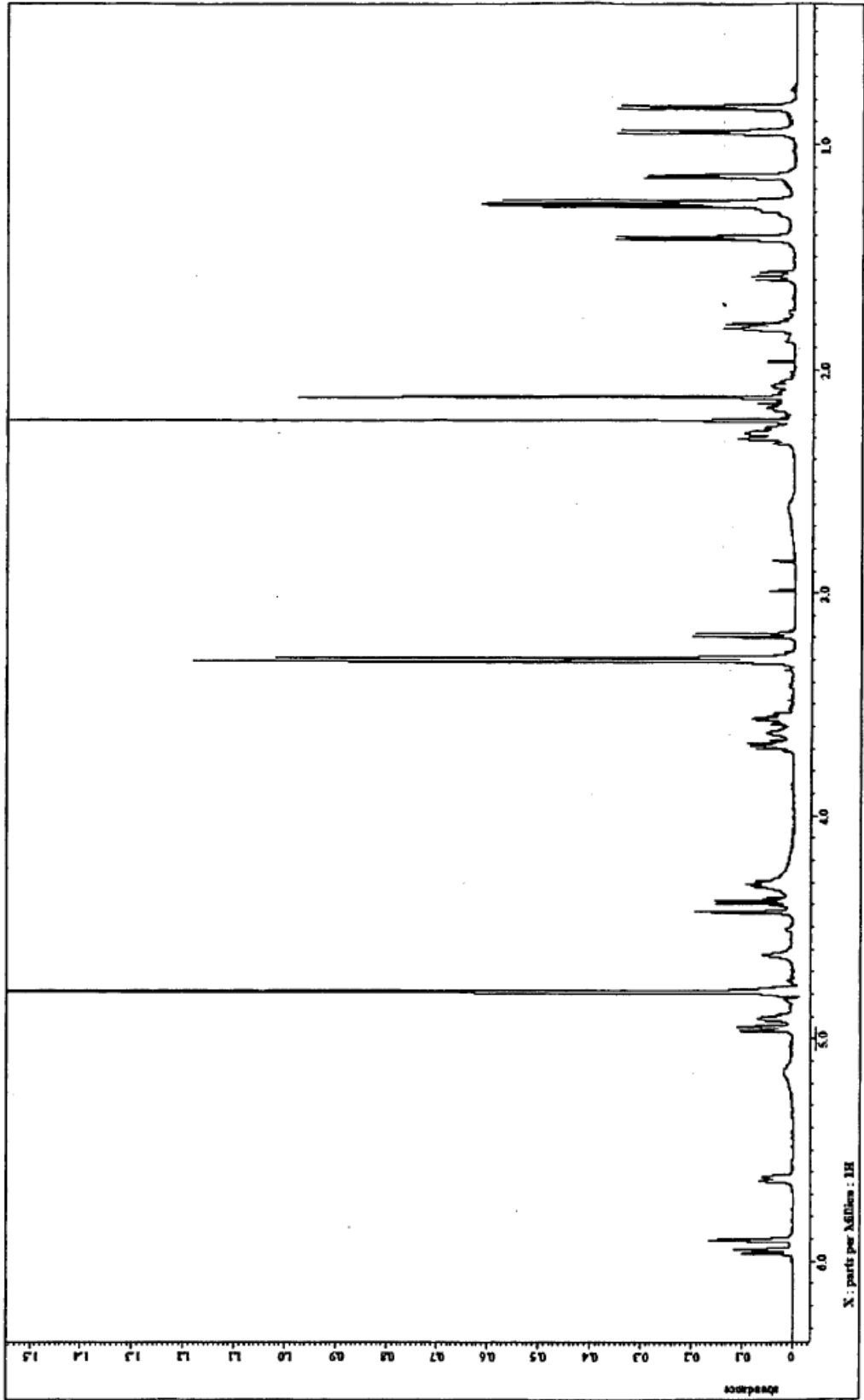


FIG. 4

