

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 515**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 11786658 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2578597**

54 Título: **Nuevo compuesto péptido cíclico, método para producirlo, agente anti-infeccioso, fracción que contiene antibiótico, antibiótico, método para producir antibiótico, microorganismo productor de antibiótico y antibiótico producido mediante el mismo**

30 Prioridad:

25.05.2010 JP 2010119140
25.05.2010 JP 2010119139
25.05.2010 JP 2010119138

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2015

73 Titular/es:

GENOME PHARMACEUTICALS INSTITUTE CO., LTD. (50.0%)
102 Next Building, 3-24-17 Hongo, Bunkyo-ku Tokyo 113-0033, JP y
THE UNIVERSITY OF TOKYO (50.0%)

72 Inventor/es:

SEKIMIZU, KAZUHISA;
HAMAMOTO, HIROSHI y
MURAKAMI, KAZUHISA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 546 515 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo compuesto péptido cíclico, método para producirlo, agente anti-infeccioso, fracción que contiene antibiótico, antibiótico, método para producir antibiótico, microorganismo productor de antibiótico y antibiótico producido mediante el mismo

5 **Campo Técnico**

La presente invención se refiere a un compuesto que tiene una estructura química; un método para fabricar dicho compuesto; un fármaco terapéutico anti-infeccioso que contiene dicho compuesto y un microorganismo que produce dicho compuesto.

10 Además, la presente invención se refiere a una fracción que contiene una sustancia antibiótica fraccionada a partir de un cultivo producido a partir de un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter*; un método para producir dicha sustancia antibiótica; una sustancia antibiótica obtenida mediante dicho método y, adicionalmente, métodos de uso y métodos de producción de una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana al mismo tiempo que no muestra un efecto terapéutico y de una sustancia antibiótica que muestra tanto una actividad antibacteriana como un efecto terapéutico, en que estas sustancias antibióticas se obtienen a partir de dicha fracción.

15 Todavía adicionalmente, la presente invención se refiere a un microorganismo que produce una sustancia antibiótica; un método para fabricar una sustancia antibiótica cultivando dicho microorganismo y dicha sustancia antibiótica.

Antecedentes de la técnica

20 Una sustancia antibiótica es indispensable para reprimir un microorganismo y para curar una enfermedad infecciosa. Sin embargo, el uso excesivo de una sustancia antibiótica produce una bacteria resistente a la misma, dando lugar a la producción de una bacteria resistente a múltiples fármacos que tiene resistencias a muchos fármacos y, por tanto, se convierte en un problema clínico grave. Especialmente el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (en lo sucesivo abreviado como MRSA) aparece a menudo en un recinto clínico y, por tanto, se convierte en un problema social. Además, el *Enterococcus* que tiene resistencia a vancomicina que es usado a menudo como un fármaco terapéutico final para MRSA (en lo sucesivo dicho *Enterococcus* resistente a vancomicina es abreviado como VRE) ha sido apartado de un recinto clínico en este país y, por tanto, es altamente deseado un nuevo fármaco terapéutico para una bacteria resistente a múltiples fármacos.

25 Especialmente, el surgimiento de VRE que muestra resistencia a vancomicina, el fármaco eficaz para MRSA, se considera que es un problema grave. Esto se supone porque el propio *Enterococcus* reside siempre en el tracto intestinal por lo que puede ser generado un portador potencial de la bacteria fácilmente con lo que es transmitido un gen de resistencia al mismo a otra bacteria debido al largo tiempo de residencia en el cuerpo del paciente, y esto a su vez conduce a un aumento de un riesgo de generar *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA) y así sucesivamente.

30 Aparte del problema del surgimiento de una bacteria resistente, una sustancia antibiótica que tiene un efecto terapéutico sustancialmente alto al mismo tiempo que tiene una seguridad superior a la vancomicina y así sucesivamente es altamente y, por tanto, está en progreso una investigación para obtener una sustancia antibiótica que no solamente sea eficaz para MRSA y VRE sino que tenga también una seguridad superior con menos efectos secundarios, etc. en comparación con los fármacos existentes.

35 En lo que se refiere al nuevo fármaco terapéutico así, se conoce el linezolid, una nueva sustancia antibiótica obtenida mediante un método de síntesis química total. Además, se han llevado a cabo muchas investigaciones para descubrir una nueva sustancia antibiótica que muestre eficacia para las bacterias resistentes a múltiples fármacos que anteceden a partir de sustancias antibióticas que se producen mediante diversos microorganismos (documentos de patentes 1 a 3). Entre estos documentos, en los documentos de patentes 1 y 2, se describe un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter* que produce una sustancia antibiótica que muestra eficacia para las bacterias resistentes a múltiples fármacos que anteceden y un método para producir la sustancia antibiótica usando este microorganismo.

40 Para conseguir el objetivo que antecede, se lleva a cabo ampliamente no solamente la creación de una sustancia antibiótica que tiene una estructura química y una exploración sintética de mejora, etc., de sustancias antibióticas existentes, sino también la exploración de un microorganismo capaz de producir una sustancia antibiótica útil que no ha sido expuesta con anterioridad. Esto es porque una sustancia antibiótica producida mediante un microorganismo es una sustancia natural producida en un cuerpo vivo, de forma que la sustancia se supone que es mucho más segura para cuerpo vivo en comparación con una sustancia químicamente sintetizada.

45 En lo que se refiere al microorganismo que produce una nueva sustancia antibiótica, se han expuesto ya muchos tipos de microorganismos, y el microorganismo perteneciente a un género *Lysobacter* de *Xanthomonadaceae*, que es usado en la presente invención, se ha expuesto como tal microorganismo en los documentos de patentes 1, 2, 5, etc. Entre estos documentos, en los documentos de patentes 2 y 5, se describe un microorganismo que produce una

sustancia antibiótica que tiene una actividad antibacteriana para las bacterias resistentes a múltiples fármacos que anteceden y un procedimiento para producir la sustancia antibiótica usando dicho microorganismo.

5 Se desea intensamente proporcionar una sustancia antibiótica que tiene no solamente una actividad antibiótica para *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (en lo sucesivo abreviado como MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (en lo sucesivo abreviado como VRE), que sean especialmente problemáticos en recintos clínicos entre las bacterias resistentes a múltiples fármacos, pero que muestren también un excelente efecto terapéutico. Sin embargo, la mayoría de las sustancias antibióticas que han sido expuestas hasta ahora que son eficaces para las bacterias resistentes a múltiples fármacos son las que muestran una actividad antibacteriana solamente para MRSA; no hay muchos informes sobre la sustancia antibiótica que muestre también una actividad antibacteriana para VRE al mismo tiempo. Como un ejemplo de la sustancia antibiótica eficaz tanto para MRSA como para VRE, se describe una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana in vitro para las dos bacterias resistentes a múltiples fármacos que anteceden (en lo sucesivo, actividad antibacteriana significa "actividad antibacteriana mostrada in vitro" salvo que se indique otra cosa) entre las sustancias antibióticas expuestas en el documento de patente 3.

15 Además, se describe un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter* y una nueva sustancia antibiótica producida y fabricada a partir del mismo en los documentos de patentes 1 y 2; se describe un nuevo microorganismo perteneciente al género *Flavobacterium* y una nueva sustancia antibiótica producida y fabricada a partir del mismo en el documento de patente 6 y se describe un microorganismo perteneciente al género *Streptomyces* y una nueva sustancia antibiótica producida y fabricada a partir del mismo en el documento de patente 7.

20 Por otra parte, los inventores de la presente invención construyeron el "modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda" (documento de patente 4) usando, como animal experimental, un gusano de seda (una larva de *Bombyx mori*), en que el modelo se usó eficazmente para explorar una sustancia antibiótica y, seguidamente, se llevó a cabo la investigación en el mismo.

Documento de Patente 1: Patente Japonesa N° 3339235

25 Documento de Patente 2: Patente Japonesa N° 4054576

Documento de Patente 3: Patente Japonesa N° 4057426

Documento de Patente 4: Patente Japonesa puesta a disposición p N° 2007-327964

Documento de Patente 5: Publicación de Solicitud de Patente examinada Japonesa N° H06-99444

Documento de Patente 6: Publicación puesta a disposición pública de la Patente Japonesa N° 2003-113192

30 Documento de Patente 7: Publicación puesta a disposición pública de la Patente Japonesa N° 2007-131552

Descripción de la Invención

Problemas que van a ser resueltos por la invención

35 En los documentos de patente 2 y 3, se describe una sustancia antibiótica que muestra eficacia no solamente para MRSA sino también para VRE. Sin embargo, en muchos informes previos, solamente ha sido descrita la eficacia para MRSA como se expone en el documento de patente 1 y, por tanto, la situación actual es que casi no hay ningún informe sobre una sustancia antibiótica que muestre eficacia para VRE. Consecuentemente, considerando un posible surgimiento de una bacteria resistente, es necesario aumentar las opciones de una sustancia antibiótica que tenga las siguientes características: que muestre eficacia no solamente para MRSA sino también para VRE, que tenga una estructura química diferente de las sustancias antibióticas existentes mostradas en el documento de patente 2, documento de patente 3, etc.; y que se espere que tenga un mecanismo de acción para una bacteria resistente diferente de los fármacos terapéuticos existentes.

45 Además, en la mayoría de los ejemplos previamente expuestos, se selecciona una sustancia antibiótica basándose principalmente en la actividad antibacteriana in vitro evaluada con la concentración inhibidora mínima (en lo sucesivo, abreviada a veces como "MIC") pero como no hay casi ningún ejemplo en el que se seleccione una sustancia antibiótica mediante una evaluación que incluya un efecto terapéutico in vivo, continúa habiendo una carencia final de un efecto terapéutico por lo que hay una gran dificultad para su realización práctica.

Como se expuso anteriormente, un primer problema que va a ser resuelto mediante la presente invención es proporcionar un compuesto que tenga una estructura química diferente de los fármacos previos y, además, que proporcione un compuesto que sea también eficaz para una bacteria resistente a múltiples fármacos.

50 Además, el objetivo de la misma incluye proporcionar "un compuesto que tenga un efecto terapéutico elevado" que ha tenido ya una gran dificultad para su realización práctica rebajada mediante la selección de un compuesto previsto a partir de muchos compuestos candidatos basado no solamente en una actividad antibacteriana sino también en una evaluación que incluye un efecto terapéutico.

Además, como se mencionó anteriormente, hay muchas sustancias antibióticas dirigidas a diana a una bacteria resistente a múltiples fármacos, pero no hay tantas sustancias antibióticas que muestren claramente eficacia para VRE, siendo la sustancia antibiótica realizada en la práctica que se conoce que es eficaz para VRE escasamente linezolid, que es una sustancia antibiótica basada en oxazolidinona. Sin embargo, linezolid es una sustancia antibiótica sintética creada mediante una síntesis química total y, teniendo en cuenta un problema de seguridad para un cuerpo vivo y el posible surgimiento de una bacteria resistente a un fármaco existente, ha habido una necesidad de aumentar adicionalmente opciones para la sustancia antibiótica que es útil para una bacteria resistente a múltiples fármacos para VRE.

Por otra parte, si una sustancia antibiótica que muestra eficacia para VRE puede ser obtenida a partir de una sustancia producida a partir de un microorganismo, hay una elevada posibilidad de rebajar una gran dificultad necesaria para desarrollar y fabricar un fármaco en comparación con un compuesto mediante un método de síntesis química total. Esto es porque al menos su fabricación se puede hacer mediante cultivo, sugiriendo que su fabricación se puede hacer con un coste inferior y mayor seguridad en comparación con un método de síntesis química que requiere productos químicos, como un catalizador especial, y una elevada temperatura y elevada presión.

En lo que se refiere a la sustancia antibiótica que es producida mediante un microorganismo y muestra eficacia para VRE como se mencionó anteriormente, se describe una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana para MRSA y VRE entre las sustancias antibióticas descritas en el documento de patente 2 que antecede. Sin embargo, no ha habido todavía ninguna descripción sobre si muestra un efecto terapéutico in vivo para una enfermedad infecciosa o no (en lo que sigue, la expresión "efecto terapéutico" es usada para referirse a un efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa confirmado con un sistema de evaluación in vivo, salvo que se indique otra cosa). Esto es porque ha sido evaluada una eficacia terapéutica de una sustancia antibiótica suponiendo que la magnitud de una actividad antibacteriana evaluada mediante la concentración inhibitoria mínima (en lo sucesivo, abreviada a veces como "MIC") refleja una magnitud de un efecto terapéutico de esta sustancia antibiótica. Es decir, presumiblemente porque no hay elección sino que depender de la MIC, ya que no hay un método conveniente para evaluar el "efecto terapéutico". Sin embargo, mediante la investigación de los presente inventores, como se menciona con posterioridad, se confirmó que la "magnitud de una actividad antibacteriana de una sustancia antibiótica evaluada mediante la MIC no refleja necesariamente la "magnitud de un efecto terapéutico" de dicha sustancia antibiótica.

Dicho de otro modo, casi todas las sustancias antibióticas previamente descritas fueron seleccionadas mediante la evaluación de una actividad antibacteriana basada en la MIC, exponiendo así solamente la "magnitud de la actividad antibacteriana" sin exponer no obstante la "magnitud de un efecto terapéutico".

Consecuentemente, para proporcionar una fracción que contenga una sustancia antibiótica producida por un microorganismo "en lo que sigue, esto se describe como "fracción que contiene sustancia antibiótica") y una sustancia antibiótica obtenida a partir de dicha fracción, es importante seleccionarlas evaluando no solamente sus actividades antibacterianas mostradas, sino también sus efectos terapéuticos y, por tanto, un problema que debe ser resuelto por la presente invención es proporcionar una fracción que contiene sustancia antibiótica que tiene una elevada utilidad no conocida con anterioridad, que se selecciona como se mencionó anteriormente y una sustancia antibiótica obtenida a partir de esta fracción.

Entonces, los inventores de la presente invención pensaron que resolviendo el problema que antecede, no solamente se pueden seleccionar una fracción que contiene sustancia antibiótica y una sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma que muestra actividad antibacteriana y efecto terapéutico, sino también se pueden seleccionar una fracción que contiene sustancia antibiótica y una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana pero no muestra un efecto terapéutico. Además, los inventores pensaron que, incluso aunque es natural que la primera es altamente eficaz como un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa, la fracción que contiene sustancia antibiótica etc. de la última, que no suscitaban atención con anterioridad, tienen propiedades adecuadamente usadas como un agente de protección microbiana porque no son usadas como un fármaco terapéutico cuando son usadas como un agente de protección microbiana, por lo que no hay sustancialmente necesidad de considerar el surgimiento de una bacteria resistente a múltiples fármacos.

A saber, un segundo problema que va a ser resuelto mediante la presente invención es proporcionar: una fracción que contiene una sustancia antibiótica que es producida mediante un microorganismo y tiene una eficacia no conocida con anterioridad; una sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma; un procedimiento de fabricación de la misma y, adicionalmente, una fracción que contiene sustancia antibiótica y una sustancia antibiótica que se seleccionan evaluando la fracción que contiene sustancia antibiótica y la sustancia antibiótica no solamente en una actividad antibacteriana, sino también en si existe o no un efecto terapéutico. Además, el objeto de la misma incluye proporcionar una fracción que contiene sustancia antibiótica y una sustancia antibiótica que muestra un efecto terapéutico para una bacteria resistente a múltiples fármacos. De forma adicional, el objeto de la misma incluye proporcionar un agente de protección microbiana que contiene la fracción que contiene sustancia antibiótica o la sustancia antibiótica como se mencionó anteriormente.

Por otra parte, se espera que una sustancia antibiótica obtenida a partir de sustancias producidas a partir de un

microorganismo tenga una seguridad superior para un cuerpo vivo en comparación con una sustancia sintética, sugiriendo que una sustancia antibiótica así puede disminuir el desarrollo de etapas para hacer que sea un fármaco médico. Por ejemplo, el procedimiento de fabricación anteriormente mencionado tiene una ventaja en cuanto pueden ser usadas materias primas son más benignas para un cuerpo vivo que las de un procedimiento de síntesis química y, además, puede ser usado un procedimiento más conveniente y seguro en el mismo porque pueden ser usadas condiciones de fabricación de temperatura y presión casi ambientales. Consecuentemente, esto tiene una capacidad potencial superior para disminuir las etapas de desarrollo para un fármaco médico en comparación con una sustancia antibiótica creada mediante una síntesis química.

Sin embargo, en cuanto al microorganismo que produce una sustancia antibiótica que muestra no solamente eficacia para MRSA sino también actividad antibacteriana para VRE, fue necesaria una investigación adicional considerando materias como un efecto terapéutico en un recinto clínico práctico y el surgimiento de una bacteria resistente, incluso aunque hay un ejemplo como se describe en el documento de patente 2. Dicho de otro modo, ha habido un deseo: descubrir un microorganismo que tenga características para producir una sustancia antibiótica que tenga una actividad antibacteriana no solamente para MRSA sino también para VRE y que muestre realmente un efecto terapéutico; y proporcionar una sustancia antibiótica que muestre una eficacia para MRSA y VRE usando este microorganismo y un método para fabricar el mismo.

Además, con el fin de obtener ampliamente una sustancia antibiótica independientemente de si existe o no una actividad antibacteriana para MRSA, VRE, etc., hay un deseo de proporcionar un microorganismo.

La presente invención se realizó considerando la situación anteriormente mencionada y, por tanto, un tercer problema para ser resuelto mediante la presente invención es proporcionar un microorganismo que pueda producir una sustancia antibiótica y proporcionar un microorganismo que pueda ser usado en un método para fabricar una sustancia antibiótica, especialmente para proporcionar un nuevo microorganismo capaz de producir una sustancia antibiótica que sea eficaz para bacterias resistentes a múltiples fármacos, al menos para MRSA y VRE.

Medios para resolver los problemas

En la situación anteriormente mencionada, con el fin de obtener un nuevo microorganismo capaz de producir una sustancia antibiótica, una fracción que contiene una sustancia antibiótica obtenida a partir de este microorganismo y una sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma, los inventores de la presente invención llevaron a cabo una investigación sobre un método para evaluar la fracción que contiene sustancia antibiótica obtenida a partir de la materia sobrenadante de cultivo de dicho microorganismo y la sustancia antibiótica obtenida a partir de esta fracción mediante tratamientos de separación y purificación. Como consecuencia, cuando se seleccionó un microorganismo y un método para la separación y purificación de una sustancia antibiótica contenida en una materia sobrenadante de un cultivo, los inventores de la presente invención estimaron en una evaluación mediante MIC para *Staphylococcus aureus* como para una actividad antibacteriana de cada muestra con evaluación concurrente en cuanto a un efecto terapéutico de la misma. Seguidamente, se llevó a cabo una investigación para obtener una cepa de microorganismo previsto y la fracción que contiene sustancia antibiótica que tiene una elevada eficacia, como se mencionó anteriormente, usando, como el método para evaluar la magnitud de un efecto terapéutico de cada muestra, “el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* de gusano de seda” mencionado en el documento de patente 4 que usa como animal experimental, un gusano de seda.

Como consecuencia, de las 14346 cepas de bacteria de terrenos separadas de los terrenos tomados de diversas partes de esta nación, 3487 cepas se encontró que mostraban una actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* en una materia sobrenadante de un cultivo de la misma; y cuando se estudió un efecto terapéutico de la materia sobrenadante del cultivo de estas bacterias mediante el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de seda que antecede, el número de microorganismos que mostraba un efecto terapéutico se redujo a 45 cepas. A partir de este resultado, se confirmó que la actividad antibacteriana evaluada mediante MIC no garantiza necesariamente un “efecto terapéutico” de la sustancia antibiótica evaluada para una enfermedad infecciosa impuesta por la bacteria relacionada con MIC.

Seguidamente, cuando se estudiaron los espectros antibacterianos de la fracción que contiene sustancia antibiótica obtenida a partir de una materia sobrenadante de un cultivo de las 45 cepas que anteceden, se encontró que un microorganismo que mostraba una actividad antibacteriana para una bacteria resistente a múltiples fármacos tanto de MRSA como de VRE estaba incluido en estas 45 cepas y, además, se encontró que una sustancia antibiótica que mostraba un efecto terapéutico en el mismo nivel o superior en comparación con vancomicina en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* de ratón estaba incluida en la fracción que contiene sustancia antibiótica que fue fraccionada a partir de un cultivo de dicho microorganismo. Cuando la sustancia antibiótica que antecede que mostraba un efecto terapéutico elevado fue estudiada en detalle en cuanto a la estructura química y demás, se confirmó que esta sustancia antibiótica era una sustancia antibiótica.

Además, cuando se estudiaron los espectros antibacterianos de otras fracciones que contienen sustancias antibióticas y sustancias antibióticas contenidas en dichas fracciones, resultó claro que los espectros antibacterianos de las otras fracciones que contienen sustancias antibióticas eran iguales que los de dicha sustancia antibiótica y que la estructura química de las mismas era la de un compuesto relacionado de dicha sustancia antibiótica y, por

tanto, se confirmó que la fracción que contiene una sustancia antibiótica distinta de dicha sustancia antibiótica en la fase de fraccionamiento final era también una fracción altamente eficaz.

5 Además, se confirmó que el efecto terapéutico (ED_{50} : cantidad de eficacia de 50%) mostrado en la fracción que contiene dicha sustancia antibiótica estaba concentrado en 300 veces en relación con la de la fracción inicialmente obtenida en su procedimiento de purificación, mientras que su actividad antibacteriana (MIC) estaba concentrada solo en 5 veces.

10 Este hecho sugiere que la fracción que contiene sustancia antibiótica en la fase temprana del procedimiento de purificación obtenido mediante el procedimiento de fraccionamiento mencionado con posterioridad contiene, con una relación elevada, una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana comparativamente elevada pero que a penas muestra un efecto terapéutico. Consecuentemente, se consideró que estas sustancias antibióticas contenidas en la fracción que contiene sustancia antibiótica en la fase temprana del procedimiento de purificación era difícil de ser usada como un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa.

15 Sin embargo, desde un punto de vista diferente, el mostrar una elevada actividad antibacteriana mientras que no se muestra un efecto terapéutico puede ser inversamente valorado como que esto es adecuado para un agente antibacteriano como un agente de protección microbiana porque la sustancia antibiótica así no es sustancialmente usada como un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa. Esto es porque esta sustancia antibiótica no es usada como un fármaco terapéutico por lo que no hay necesidad de prestar atención al surgimiento de una bacteria resistente a múltiples fármacos que es preocupante cuando se usa como un agente antibacteriano. Además, esta es retirada de la fracción en la fase tardía del procedimiento de purificación, por lo que se confirmó
20 que no hay un parecido químico estructural para la sustancia antibiótica y, por tanto, no hay necesidad tampoco de prestar atención al surgimiento de una bacteria resistente a múltiples fármacos mediante una reacción cruzada con una sustancia antibiótica seleccionada como un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa.

25 Dicho de otro modo, la fracción que contiene sustancia antibiótica que tiene una elevada actividad antibacteriana pero un bajo efecto terapéutico obtenida a partir de una fracción en la fase temprana del procedimiento de purificación y la sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma son altamente útiles cuando son usadas como un agente de protección microbiana.

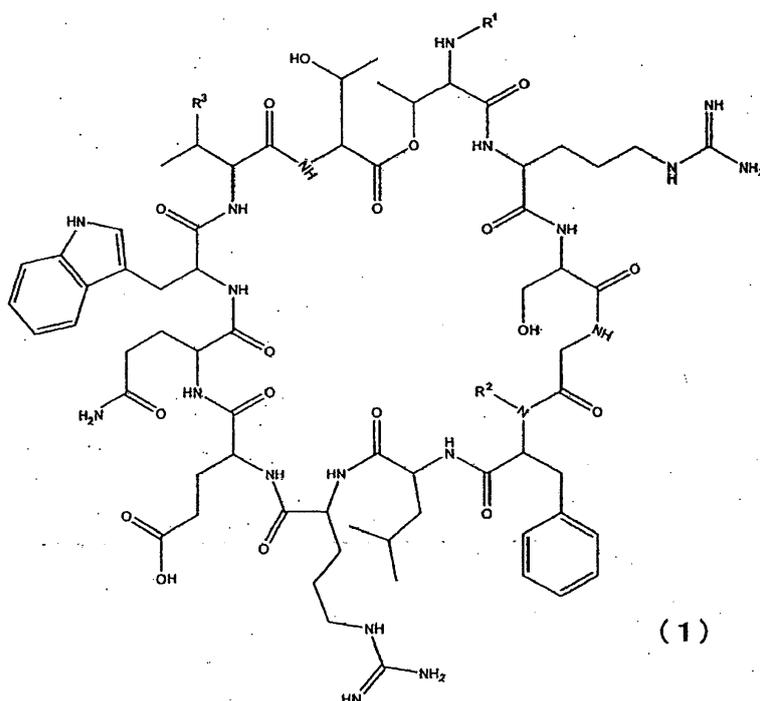
30 Además, se encontró que el microorganismo que produjo la fracción que contiene sustancia antibiótica y la sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana para MRSA y VRE, como se mencionó anteriormente, era un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter* (en lo sucesivo, mostrado como "RH2180-5") a partir de los resultados del análisis de caracterización del mismo, análisis de la secuencia de bases de su 16S rRNA, etc., y también a partir de la sustancia producida y, adicionalmente, se encontró que la fracción que contiene sustancia antibiótica y la sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma en la presente invención se obtuvieron a partir del microorganismo; basándose en estos descubrimientos se pudo realizar la presente invención.

35 Además, cuando la sustancia antibiótica que mostraba un efecto terapéutico elevado en el "modelo de infección de *Staphylococcus aureus* de ratón" se estudió en detalle en cuanto a su estructura química y demás, se confirmó que esta sustancia antibiótica es un compuesto péptido cíclico que tiene una estructura química. Además, se confirmó que, además de la sustancia anteriormente mencionada, los compuestos péptidos cíclicos relacionados con la misma que tienen una estructura química similar a la que antecede están contenidos en la materia sobrenadante del cultivo y que estos muestran también un espectro antibacteriano similar al del compuesto que antecede.

40 A saber, la presente invención proporciona lo siguiente:

<1>

Un compuesto péptido cíclico mostrado por la siguiente fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(1)

en la que R¹ representa un grupo acilo que tiene 7, 8 o 9 átomos de carbono y contiene opcionalmente un grupo sustituyente; R² representa un grupo metilo o un átomo de hidrógeno y R³ representa un grupo etilo o un grupo metilo.

5 <2>

El compuesto péptido cíclico de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según <1> en que el grupo sustituyente de R¹ en la fórmula anterior (1) es un grupo hidroxilo.

<3>

10 El compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según <1> en el que R¹ en la fórmula (1) anterior es un grupo 3-hidroxi-5-metil-hexanoilo, un grupo 3-hidroxi-6-metil-heptanoilo o un grupo 3-hidroxi-7-metil-octanoilo.

<4>

El compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según <1> en el que en la fórmula (1) anterior R¹ es un grupo 3-hidroxi-5-metil-hexanoilo, R² es un grupo metilo y R³ es un grupo etilo.

<5>

15 El compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según <1> en el que, en la fórmula (1) anterior, R¹ es un grupo 3-hidroxi-7-metil-octanoilo, R² es un grupo metilo y R³ es un grupo etilo.

<6>

20 El compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de <1> a <5>, en el que el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable se obtiene a partir de un cultivo que es producido mediante el cultivo de la cepa RH2180-5, que pertenece al género *Lysobacter* con el n° de acceso NITE BP-870 en la institución de Depósito NITE Patent Microorganisms Depository (NPMD) de la entidad Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (NITE), o su cepa mutante capaz de producir un compuesto análogo al compuesto producido a partir de la cepa que antecede.

<7>

25 Un método para fabricar el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de <1> a <6>, caracterizado porque el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable es fabricado a partir de un cultivo que es producido cultivando la cepa RH2180-5, que es capaz de producir el compuesto péptido cíclico según cualquiera de <1> a <6> o pertenece al género *Lysobacter* con el n° de acceso NITE BP-870 en la institución NITE Patent Microorganisms Depository (NPMD) de la entidad Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (NITE), o su cepa mutante capaz de producir un compuesto análogo al compuesto producido a partir de la cepa que antecede.

30

<8>

Un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa, en que el fármaco terapéutico contiene el compuesto péptido cíclico o sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de <1> a <6> junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 <9>

Una fracción que contiene una sustancia antibiótica caracterizada porque la fracción que contiene una sustancia antibiótica es obtenida fraccionando un cultivo que es producido cultivando un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter* con el nº de acceso NITE BP-870 y contiene el compuesto péptido cíclico o sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de <1> a <6>.

10 <10>

La fracción que contiene una sustancia antibiótica según <9> en que la fracción que contiene una sustancia antibiótica es una fracción que contiene una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana.

<11>

15 La fracción que contiene una sustancia antibiótica según <9> o >10> en que la fracción que contiene una sustancia antibiótica muestra una actividad antibacteriana al menos para *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE).

<12>

20 La fracción que contiene una sustancia antibiótica según cualquiera de <9> a <11>, en que la fracción que contiene una sustancia antibiótica es una fracción que contiene una sustancia antibiótica que muestra un efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa debida al menos a *Staphylococcus aureus*.

<13>

25 La fracción que contiene una sustancia antibiótica según <12>, en que la fracción que contiene una sustancia antibiótica contiene una sustancia antibiótica que muestra un efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa debida al menos a *Staphylococcus aureus* siendo el efecto terapéutico de la misma igual o mayor en comparación con vancomicina.

<14>

La fracción que contiene una sustancia antibiótica según <9> o <10>, en que la fracción que contiene una sustancia antibiótica contiene una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana pero no muestra sustancialmente un efecto terapéutico.

30 <15>

La fracción que contiene una sustancia antibiótica según <14>, en que la sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana pero que no muestra sustancialmente un efecto terapéutico es usada como un agente de protección microbiana.

<16>

35 Un método para fabricar una sustancia antibiótica, caracterizado porque una cualquiera de una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana y una sustancia antibiótica que muestra un efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa o ambas cosas es separada y purificada a partir de un cultivo que es producido cultivando un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter* con el nº de acceso NITE BP-870 y contiene el compuesto péptido cíclico o sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de <1> a <6>.

40 <17>

El método para fabricación de una sustancia antibiótica según <16>, en que la sustancia antibiótica muestra una actividad antibacteriana al menos para *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VER).

<18>

45 El método para la fabricación de una sustancia antibiótica según <16> o <17>, en que la sustancia antibiótica muestra un efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa al menos debida a *Staphylococcus aureus*.

en la que R¹ representa un grupo acilo que tiene 7, 8 ó 9 átomos de carbono y contiene un grupo hidroxilo; R² representa un grupo metilo o un átomo de hidrógeno y R³ representa un grupo etilo o un grupo metilo.

<26>

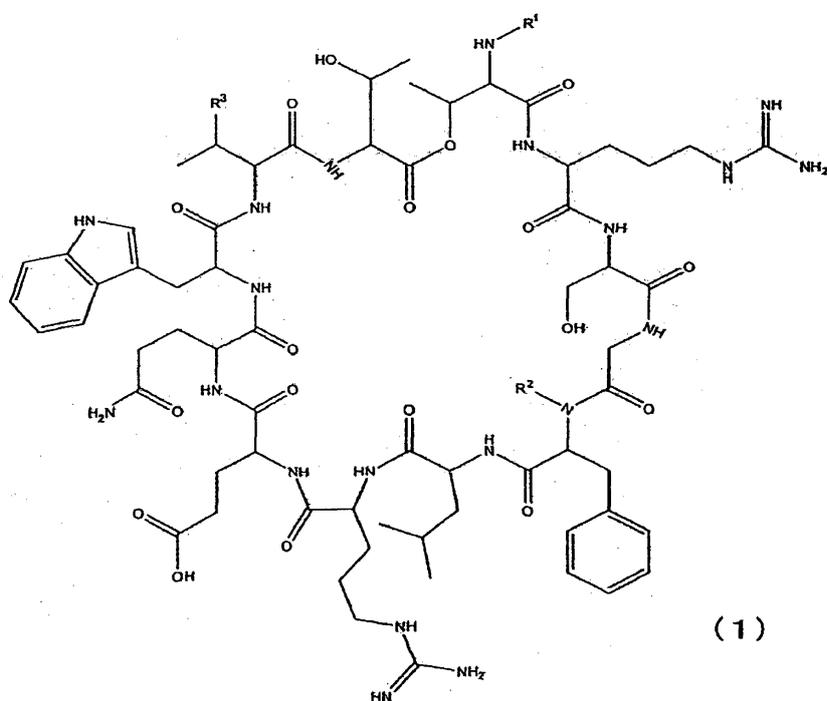
- 5 Un agente de protección microbiana, caracterizado porque el agente de protección microbiana contiene la fracción que contiene una sustancia antibiótica según <9> o <10>.

<27>

Un agente de protección microbiana, caracterizado porque el agente de protección microbiana contiene la sustancia antibiótica según <20>.

<28>

- 10 Un microorganismo, en que el microorganismo pertenece a un género *Lysobacter* con el n° de acceso NITE BP-870 o es un microorganismo natural o artificialmente mutado del mismo, y es capaz de producir un compuesto mostrado en la siguiente fórmula (1) o una sal del mismo.



- 15 (En la fórmula (1), R¹ representa un grupo acilo que tiene 7, 8 ó 9 átomos de carbono y contiene un grupo hidroxilo; R² representa un grupo metilo o un átomo de hidrógeno y R³ representa un grupo etilo o un grupo metilo.

<29>

El microorganismo según <28>, en que la sustancia antibiótica tiene una actividad antibacteriana al menos para *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE).

<30>

- 20 El microorganismo según <28> o <29>, en que el microorganismo tiene la secuencia de bases de la región de 16S rRNA mostrada por la secuencia n° 1 en el gráfico de secuencias.

<31>

- 25 Un compuesto péptido cíclico o sal farmacéuticamente aceptable del mismo determinado en 1 a 6, o un agente que comprende dicho compuesto péptido cíclico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para ser usado en el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

Ventajas

Según la presente invención, se proporciona un compuesto que tiene una estructura química que es eficaz para una enfermedad infecciosa, etc. Además, se proporciona un compuesto que tiene una estructura química o una sal del mismo que muestra eficacia para muchas bacterias resistentes a múltiples fármacos como MRSA y VRE, un método

para fabricarlos y un microorganismo que produce estos compuestos.

Además, según la presente invención, se proporciona una fracción que contiene una sustancia antibiótica útil producida a partir del microorganismo y su sustancia antibiótica. Entre estas sustancias antibióticas, hay algunas que muestran una actividad antibacteriana no solamente para MRSA sino también para VRE y hay algunas que muestran un elevado efecto terapéutico para *Staphylococcus aureus*. Consecuentemente, la presente invención tiene un efecto de ser capaz de proporcionar una fracción que contiene una sustancia antibiótica extremadamente útil y su sustancia antibiótica.

Además, según la presente invención, se proporciona un microorganismo capaz de producir las sustancias antibióticas anteriores que tienen una actividad antibacteriana. Especialmente entre las sustancias antibióticas producidas por el microorganismo de la presente invención, existe una sustancia antibiótica que se confirma que tiene una actividad antibacteriana para MRSA y VRE con un elevado efecto terapéutico y, por tanto, la presente invención tiene un efecto de ser capaz de proporcionar un microorganismo capaz de producir una sustancia antibiótica que tiene una elevada eficacia para una bacteria resistente a múltiples fármacos.

Breve descripción de los dibujos.

15 [Fig. 1]

La Fig. 1 es un gráfico que muestra un resultado del fraccionamiento de la fracción que contiene una sustancia antibiótica que muestra un efecto antibiótico, obtenida a partir de un cultivo de RH2180-5 usando una columna ODS. El eje vertical muestra la resistencia a la absorción y el eje horizontal muestra el tiempo de elución (minutos). Los números anteriormente indicados por encima de cada una de las columnas de los picos que se muestran en marcos separados muestran pesos moleculares de las respectivas sustancias de los picos.

[Fig. 2]

La Fig. 2 muestra el resultado del análisis de la composición de aminoácidos de la sustancia del pico 5 RH2180-5.

[Fig. 3]

25 La Fig. 3 muestra gráficos de resultados de análisis de la sustancia del pico 5 RH2180-5 mediante $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$. El eje vertical muestra la resistencia de la señal y el eje horizontal muestra el desplazamiento químico (ppm).

[Fig. 4]

La Fig. 4 muestra un gráfico del resultado de análisis MS-MS de la sustancia del pico 5 RH2180-5 mediante TOF-MS (TOF: tiempo de vuelo).

[Fig. 5]

30 La Fig. 5 muestra gráficos de los resultados de análisis MS-MS de la sustancia del pico 1 RH2180-5 y la sustancia del pico 2 RH2180-5 mediante TOF-MS (TOF: tiempo de vuelo).

[Fig. 6]

La Fig. 6 muestra los gráficos de los resultados del análisis MS-MS de la sustancia del pico 3 RH2180-5 y la sustancia del pico 4 RH2180-5 mediante TOF-MS (TOF: tiempo de vuelo).

35 [Fig. 7]

La Fig. 7 muestra los gráficos de los resultados del análisis MS-MS de la sustancia del pico 6 RH2180-5 y la sustancia del pico 7 RH2180-5 mediante TOF-MS (TOF: tiempo de vuelo).

[Fig. 8]

40 La Fig. 8 muestra los gráficos de los resultados del análisis MS-MS de la sustancia del pico 8 RH2180-5 y la sustancia del pico 9 RH2180-5 mediante TOF-MS (TOF: tiempo de vuelo).

[Fig. 9]

La Fig. 9 muestra una estructura química de la sustancia del pico 5 RH2180-5 obtenida a partir de los respectivos análisis de resultados.

[Fig. 10]

45 La Fig. 10 muestra una estructura química de la sustancia del pico 5 RH2180-5 obtenida a partir de los respectivos resultados de análisis, con las cuales se muestran claramente las conformaciones tridimensionales de aminoácidos.

[Fig. 11]

La Fig. 11 es un gráfico que muestra la actividad bacteriolítica de la sustancia del pico 5 RH-2180-5.

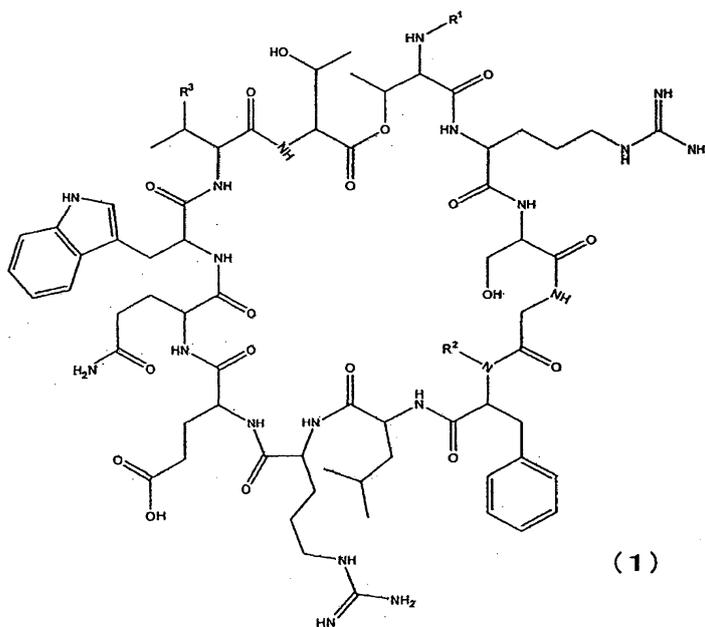
Mejores modos para llevar a cabo la invención

En lo que sigue, se explicará la presente invención; pero la presente invención no está limitada a las realizaciones específicas descritas con posterioridad y puede ser arbitrariamente modificada dentro de su alcance técnico.

Compuesto péptido cíclico de la presente invención

La presente invención se refiere a un compuesto caracterizado por la siguiente fórmula (1) que tiene una constitución básica de una estructura de péptido cíclico de 37 miembros, mientras que ha sido confirmada una pluralidad de compuestos con diferentes grupos de R^1 a R^3 . Estos han sido aislados a partir de una fracción pico separada mediante la fase de purificación final con RP-HPLC, que se explicará con posterioridad, a partir de un cultivo de una cepa de microorganismo *Lysobacter sp* RH2180-5 que se encontró por los inventores de la presente invención y se explicará con posterioridad; pero un método para obtener "el compuesto péptido cíclico mostrado por la siguiente fórmula (1) o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo" de la presente invención no está limitado al método que antecede, por lo que son independientes del método para su fabricación y, por tanto, no están limitados a los producidos a partir de un microorganismo.

Igualmente, cada uno de los compuestos purificados y aislados es mostrado por el nombre de la cepa del microorganismo asociada al nombre del pico en cuanto corto; a saber, por ejemplo, el compuesto a partir del pico 1 tiene el nombre de "sustancia del pico 1 RH2180-5" o simplemente "P1":



en la que R^1 representa un grupo acilo que tiene 7, 8 o 9 átomos de carbono y que contiene opcionalmente un grupo sustituyente; R^2 representa un grupo metilo o un átomo de hidrógeno y R^3 representa un grupo etilo o un grupo metilo.

En la fórmula (1) anterior, R^1 representa un grupo acilo que tiene 7, 8 o 9 átomos de carbono y que contiene opcionalmente un grupo sustituyente. El número de átomos de carbono en el grupo acilo incluye el número del átomo de carbono en $[C=O]$ (un átomo de carbono). "Grupo acilo que tiene 7, 8 o 9 átomos de carbono" excluido el grupo sustituyente está mostrado por " $R'-C(=O)-$ ", en el que R' representa un grupo alquilo que tiene 6, 7, o 8 átomos de carbono. R' puede ser lineal o ramificado, pero preferentemente ramificado. La parte ramificada es preferentemente un grupo metilo; y es particularmente preferido que el grupo terminal opuesto a $[C=O]$ de R' sea $[CH_3(CH_2)CH-]$, aunque no está particularmente restringido. Cuando R' , a saber R^1 , es ramificado, el número de átomos de carbono en el R^1 que antecede (7, 8, o 9) incluye el número de átomos de carbono en la parte ramificada. Igualmente, el grupo sustituyente de R^1 en la fórmula (1) anterior en la sustancia del pico 1 RH2180-5 respecto a la sustancia del pico 9 RH2180-5 mostrado en la siguiente Tabla 1 es un grupo hidroxilo.

Específicamente, R^1 en la fórmula (1) anterior es preferentemente un grupo 3-hidroxi-5-metil-hexanoilo, un grupo 3-hidroxi-6-metil-heptanoilo, o un grupo 3-hidroxi-7-metil-octanoilo.

En “el compuesto péptido cíclico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo” mostrado mediante la fórmula (1), es preferido que R¹ sea un grupo 3-hidroxi-5-metil-hexanoilo, R² un grupo metilo, y R³ un grupo etilo y que R¹ sea un grupo 3-hidroxi-7-metil-octanoilo, R² un grupo metilo, y R³ un grupo etilo.

5 Las relaciones entre R¹, R², y R³ mostradas en la fórmula (1) y las respectivas sustancias se muestran en la Tabla 1. Entre ellas, las estructuras de R¹, R², y R³ en la sustancia del pico 5 RH2180-5 y la sustancia del pico 9 RH2180-5 han sido estabilizadas, pero las estructuras de R¹ en las sustancias obtenidas a partir de otros picos no han sido completamente establecidas y, por tanto, las fórmulas estructurales R¹ en la Tabla 1 son principalmente de los resultados de análisis con una espectrometría de masas exacta y a partir de sus vías de biosíntesis. A partir del resultado del estudio de los espectros antibacterianos de las respectivas sustancias de los picos mencionadas con posterioridad, se confirma claramente la tendencia de que una diferencia en R¹ no plantea un efecto significativo para su espectro antibacteriano. Consecuentemente, estas cadenas laterales pueden ser al menos un grupo acilo que contiene opcionalmente un grupo sustituyente o, preferentemente, un grupo acilo que tiene 7 a 9 átomos de carbono y que contiene, opcionalmente, un grupo sustituyente.

Tabla 1

Pico nº.	Espectrometría de masas de alta resolución	R ¹	R ²	R ³
P1	1603,8612	CH ₃ (CH ₃)CHCH ₂ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-5-metilhexanoilo	H	CH ₃ CH ₂
P2	1603, 8598	CH ₃ (CH ₃)CHCH ₂ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-5-metilhexanoilo	CH ₃	CH ₃
P3	1631,8909	CH ₃ (CH ₃)CH(CH ₂) ₃ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-7-metiloctanoilo	H	CH ₃ CH ₂
P4	1631,8917	CH ₃ (CH ₃)CH(CH ₂) ₃ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-7-metiloctanoilo	H	CH ₃ CH ₂
P5	1617,8755	CH ₃ (CH ₃)CHCH ₂ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-5-metilhexanoilo	CH ₃	CH ₃ CH ₂
P 6	1631,8893	CH ₃ (CH ₃)CH(CH ₂) ₂ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-6-metilheptanoilo	CH ₃	CH ₃ CH ₂
P 7	1631,8920	CH ₃ (CH ₃)CH(CH ₂) ₂ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-6-metilheptanoilo	CH ₃	CH ₃ CH ₂
P 8	1645,9068	CH ₃ (CH ₃)CH(CH ₂) ₃ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-7-metiloctanoilo	CH ₃	CH ₃ CH ₂
P9	1645,9074	CH ₃ (CH ₃)CH(CH ₂) ₃ CHOHCH ₂ CO 3-hidroxi-7-metiloctanoilo	CH ₃	CH ₃ CH ₂

15

En la Tabla 1, se muestra la “Espectrometría de masas de alta resolución” mediante HR TOF MS m/z(M+H)⁺.

Método para la preparación de compuestos péptidos cíclicos de la presente invención

El método para la preparación de compuestos péptidos cíclicos o sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención no está particularmente restringido; estos compuestos y sus sales pueden ser los producidos a partir de un microorganismo o químicamente sintetizados o producidos mediante la combinación de los mismos.

20

Método para el aislamiento y purificación de compuestos péptidos cíclicos de la presente invención

El método para el aislamiento y purificación de compuestos péptidos cíclicos de la presente invención se selecciona con referencia al efecto terapéutico en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de seda; pero no está limitado a este método. Cualquier método generalmente usado como un método para la purificación de un compuesto previsto a partir de un cultivo de un microorganismo puede ser usado combinándolos apropiadamente.

El ejemplo específico del método incluye la extracción mediante disolvente, disolución u otra fase disolvente, precipitación en agua, cromatografía o mediante una columna ODS, etc., y fraccionamiento usando RP-HPLC con una columna ODS, etc. Los disolventes para la extracción y para la disolución de otra fase disolvente no están particularmente restringidos; pero el ejemplo preferido de los mismos incluye un disolvente soluble en agua como acetona; un disolvente hidrófilo como butanol, un disolvente mismo de los mismos; un disolvente mixto de agua y un disolvente hidrófilo y un disolvente mixto de agua y un disolvente soluble en agua. Puede ser usada una columna rellena con un material portador modificado con un grupo octilo o un grupo butilo o con un material portador polímero de un tipo de poliestireno o similar, en lugar de la columna ODS.

Igualmente, los métodos para el aislamiento y purificación anteriormente mencionados son meros ejemplos y, por tanto, puede ser obtenido cualquier método para el aislamiento y purificación con la condición de que se pueda obtener un compuesto péptido de la presente invención con dichos métodos.

Análisis estructural de compuestos péptidos cíclicos aislados y purificados de la presente invención

Cuando se usan los métodos para la purificación anteriormente mencionados, pueden ser finalmente obtenidos 9 compuestos mediante fraccionamiento con RP-HPLC para proporcionar al menos 9 picos a partir de un cultivo de RH2180-5 (Fig. 1). Estos pertenecen a un grupo de compuestos en una fracción única en una fase preliminar del aislamiento y purificación mediante RP-HPLC. Además, debido a la semejanza en el modelo de absorción UV, pertenecen a un grupo de compuestos similares.

Entre estos picos, se explicará un análisis estructural de una muestra purificada obtenida mediante RP-HPLC a partir del pico 5, que es un pico principal en el mismo. El análisis estructural de la misma se puede hacer mediante una combinación apropiada de métodos de análisis estructurales existentes; pero los siguientes métodos de análisis pueden ser eficaces. A saber, el análisis estructural de la misma se puede hacer mediante una espectrometría de masas exacta para la medición de pesos moleculares, análisis de aminoácidos después de un tratamiento de hidrólisis ácida (Fig. 2), análisis mediante $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 3), y análisis de TOF-MS (TOF: Tiempo de Vuelo) (los resultados del análisis TOF-MS del pico 5 se muestran en la Fig. 4, picos 1 y 2 en la Fig. 5, picos 3 y 4 en la Fig. 6, picos 6 y 7 en la Fig. 7 y picos 8 y 9 en la Fig. 8). Además, el análisis se puede hacer con un espectro UV (Fig. 1) y un espectro de absorción de infrarrojos (IR).

Como consecuencia del análisis con los métodos de análisis estructural anteriormente mencionados, se encontró que la sustancia obtenida a partir del pico 5 tenía un peso molecular de 1616,9 mediante la espectrometría de masas exacta $[(\text{M}+\text{H})^+]$ de $m/z=1617,8755$ mediante ESI-TOF-MS] y dos moléculas como para cada uno de Thr, Glu, Glu, y Arg y una molécula como para cada uno de Ser, Gly, y Ile fueron detectadas mediante análisis de aminoácidos (Fig. 2). Seguidamente, se encontró que la sustancia finalmente obtenida a partir del pico 5 es un compuesto que tiene una constitución de péptidos cíclicos mostrada por la fórmula (1) en la que R^1 es un grupo 3-hidroxi-5-metil-hexanoilo, R^2 es un grupo metilo, y R^3 es un grupo etilo. A este compuesto se le dio el nombre de "Sustancia del pico 5 RH2180-5" (en lo que sigue, a veces mostrada mediante "P5" para abreviar).

Análogamente a lo que antecede, se confirmó que la sustancia obtenida a partir del pico 9 es un compuesto que tiene un número de átomos de carbono de R^1 en la sustancia del pico 5 RH2180-5 prolongada mediante dos y, seguidamente, a la sustancia se le dio el nombre de "Sustancia del pico 9 RH2180-5" (en lo que sigue, mostrada a veces mediante "P9" para abreviar). Además, se encontró que las sustancias obtenidas a partir de otros picos son los compuestos que tienen la misma estructura de péptidos cíclicos como una constitución principal; análogamente a lo que antecede, se les proporcionó los nombres de "RH2180-5" unidos con el número de pico n (en lo que sigue, a veces mostrada mediante "Pn" para abreviar).

Propiedades físicas y químicas del compuesto péptido cíclico Sustancia del pico 5 RH2180-5 de la presente invención

Entre los compuestos que tienen una estructura de péptido cíclico de la presente invención como se mencionó con anterioridad, las propiedades físicas y químicas de la sustancia del pico 5 RH2180-5 son como siguen:

(1) Espectrometría de masas de alta resolución HR TOF MS m/z $(\text{M}+\text{H})^+$: 1617,8755

Análisis TOF MS (TOF: Tiempo de Vuelo): Fig. 4

(2) $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$: Fig. 3

(3) Solubilidad en disolventes:

Soluble en agua, etanol, metanol y acetonitrilo. Insoluble en cloroformo

(4) Apariencia: polvo blanco

Método para fabricar compuestos péptidos cíclicos de la presente invención usando un microorganismo

- 5 Los nuevos compuestos péptidos cíclicos o sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden ser los obtenidos mediante síntesis química de los obtenidos cultivando un microorganismo capaz de producirlos y, por tanto, el método para su fabricación no está particularmente restringido. Sin embargo, es preferible que se fabriquen a partir de un cultivo que produzca cultivando la cepa RH2180-5, que pertenece al género *Lysobacter* con nº de acceso NITE BP-870 de la entidad de depósito NITE Patent Microorganisms Depositary (NPMD) de la entidad Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (NITE) o mediante el cultivo de su cepa mutante capaz de producir un compuesto similar al compuesto producido a partir de la cepa que antecede.

- 10 Dicho de otro modo, la presente invención es el compuesto péptido cíclico mostrado por la fórmula (1) anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo fabricado a partir de un cultivo que es producido cultivando la cepa RH2180-5, que pertenece al género *Lysobacter* con nº de acceso NITE BP-870 de la entidad de depósito NITE Patent Microorganisms Depositary (NPMD) de la entidad Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (NITE) o cultivando su cepa mutante capaz de producir un compuesto similar al compuesto producido a partir de la cepa que antecede.

Fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención

- 15 Adicionalmente, la presente invención es una fracción que contiene sustancia antibiótica caracterizada porque la fracción que contiene sustancia antibiótica es obtenida mediante fraccionamiento de un cultivo que es producido cultivando un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter* con nº de acceso NITE BP-870 que tiene la secuencia de bases de la región de 16S rRNA mostrada por la secuencia nº 1 en el gráfico de secuencias y contiene el compuesto péptido cíclico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 25 Igualmente, como característica general de una bacteria, las propiedades de su cepa tienden a ser mutadas fácilmente y, por tanto, hay una posibilidad de que las propiedades de RH2180-5 no permanezcan como se mostraban anteriormente. Sin embargo, incluso un microorganismo mutado a partir de RH2180-5 (nº de acceso NITE BP-870) está incluido en RH2180-5 (nº de acceso NITE BP-870) en la medida en que el microorganismo así mutado es un microorganismo perteneciente a un género *Lysobacter* y es capaz de producir la fracción que contiene sustancia antibiótica.

- 30 No hace falta decir que la mutación anteriormente mencionada incluye tanto mutación natural como mutación artificial.

- 35 La fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención significa una fracción obtenida aplicando el mismo tipo de fraccionamiento a un cultivo que es producido cultivando el RH2180-5 que antecede. En este caso, el término "cultivo" significa cualquier materia sobrenadante de cultivo, estructura microbiana, estructura triturada de un microorganismo cultivado, etc. Procedimiento de "fraccionamiento" incluye todo tratamiento habitualmente aplicado a un cultivo con el objetivo de separar y purificar una sustancia prevista, como extracción, precipitación, separación mediante membrana, disolución en otra fase disolvente y cromatograma.

- 40 En cuanto al uso de la fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención, si una sustancia antibiótica contenida en la misma muestra una actividad antibacteriana y tiene también un efecto terapéutico, esta fracción puede ser usada para fabricar un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa, y si una sustancia antibiótica contenida en la misma muestra una actividad antibacteriana pero no muestra un efecto terapéutico, esta fracción puede ser usada para fabricar un agente de protección microbiana. La fracción que contiene sustancia antibiótica que contiene una sustancia antibiótica que muestra una actividad bacteriana pero que no muestra sustancialmente un efecto terapéutico es una realización de la presente invención.

- 45 El método de uso de la misma como un agente de protección microbiana no está particularmente restringido y, por ejemplo, puede ser mencionado un método en el que dicha fracción es revestida, impregnada o humedecida sobre la superficie de un material, una herramienta o similar que es necesario que sea antibacteriana. Más específicamente, puede ser adecuadamente usado, por ejemplo, uniendo o aplicando como humedecimiento una gamuza médica, vendaje y similar, o en forma de un ingrediente antibacteriana en un adhesivo usado en diversas láminas adhesivas para la piel como un parche adhesivo o como un ingrediente antibacteriana en una crema tópica. Es preferible que, en la fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención, una sustancia antibiótica contenida en la misma que muestra una actividad antibacteriana pero no muestra sustancialmente un efecto terapéutico sea usada como un agente de protección microbiana (la sustancia antibiótica es preferentemente una cualquiera para ser usada como un agente de protección microbiana y que tenga propiedades para ser usada como un agente de protección microbiana o ambas cosas).

Habitualmente, una sustancia antibiótica es difícil de ser usada como un agente de protección microbiana porque es necesario prestar atención al surgimiento de una bacteria resistente a múltiples fármacos; pero la fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención que no muestra un efecto terapéutico y la sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma puede ser usada como un agente de protección microbiana sin estas preocupaciones. Cuando se usa como un agente de protección microbiana, la fracción que contiene sustancia antibiótica puede ser usada como tal, o solamente después de la concentración de dicha fracción; o alternativamente, puede ser usada una sustancia antibiótica después de ser separada y purificada. Estos tratamientos pueden ser seleccionados de acuerdo con sus usos respectivos.

Como se mencionó anteriormente, la fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención puede ser obtenida mediante fraccionamiento de un cultivo que es obtenido cultivando RH2180-5, independientemente de si existe o no un efecto terapéutico.

El microorganismo que produce la fracción que contiene sustancia antibiótica y la sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma en la presente invención se selecciona a partir de muchos microorganismos separados de terrenos de Okinawa evaluando una actividad antibacteriana con MIC y un efecto terapéutico con un método que usa el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda descrito en el documento de patente 4.

Con respecto al microorganismo RH2180-5 de la presente invención

En lo que sigue, se explicará en detalle el microorganismo RH2180-5 de la presente invención. El microorganismo que pertenece al género *Lysobacter* y se le proporciona el nombre de "cepa de RH2180-5" (en lo sucesivo, mostrado como "RH2180-5") ha sido recientemente descubierto. Este RH2180-5 fue depositado a nivel nacional el 25 de enero de 2010 en la entidad de depósito NITE Patent Microorganisms Depository (NPMD) de la entidad Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (¿en lo sucesivo, abreviada como? "NITE"), cuya dirección es 2-5-8 Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba #región de Japón#, con el n° de acceso No. "NITE P-870".

El "RH2180-5" fue seguidamente transferido a la entidad internacional de depósito (fecha de transferencia (fecha de depósito internacional): 20 de mayo de 2011) desde la entidad de depósito nacional (fecha de depósito original: 25 de enero de 2010) presentando el impreso de petición de depósito original a la entidad de depósito NITE Patent Microorganisms Depository (NPMD) de la entidad Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (NITE) cuya dirección es 2-5-8 Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba, con la petición de transferencia suministrada con garantía de por vida para el depósito internacional de acuerdo con el Tratado de Budapest; como consecuencia de la aceptación de la petición de transferencia, se le proporcionó el n° de acceso "NITE BP-870".

El microorganismo de la presente invención pertenece al género *Lysobacter* n° de acceso NITE BP-870 o es un microorganismo mutado de forma natural o artificial del mismo y es capaz de producir una sustancia antibiótica que tiene una actividad antibacteriana. Este fue identificado como un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter* a partir de las propiedades y secuencia de la región de 16S rRNA de esta cepa, como se mencionó con anterioridad.

Metodología:

Este RH2180-5 es un bacilo gram-negativo que no tiene ningún flagelo al mismo tiempo que muestra una propiedad de deslizamiento. No se encuentra ninguna fructificación. No se muestra acidófilo.

Situación de crecimiento en un medio de cultivo:

(1) Se forma una colonia amarilla pálida en una placa lisa de caldo de agar. No se encontraron pigmentos de color de difusión.

(2) En un cultivo de punzamiento con un medio de caldo de gelatina, el microorganismo crece en el mismo licuando la gelatina.

Propiedades fisiológicas:

Las propiedades de clasificación fisiológica y química de RH2180-5 son como siguen:

(1) pH de crecimiento (pH de crecimiento óptimo): 5 a 9 (6 a 8)

(2) Temperatura de crecimiento (temperatura óptima de crecimiento): 10 a 40 °C (25 a 30 °C)

(3) Comportamiento respecto al oxígeno: aerobiótico

(4) Ensayo MR (Ensayo de rojo de metilo): -

(5) Ensayo VP (Ensayo de Voges-Proscauer): +

- (6) Formación de pigmentos: +
- (7) Ensayo de Oxidasa: +
- (8) Ensayo de Catalasa: +
- (9) Ensayo de Ureasa: -
- 5 (10) Ensayo de Fosfatasa farmacéuticamente aceptable: +
- (11) Hidrólisis en caseína: +
- (12) Hidrólisis en celulosa: -
- (13) hidrólisis en gelatina: +
- (14) Hidrólisis en almidón: -
- 10 (15) Ensayo de desoxirribonucleasa: +
- (16) Reducción de nitrato: -
- (17) Desnitrificación: -
- (18) Producción de H₂S: -
- (19) Producción de Indol: -
- 15 (20) Utilización de citrato: +
- (21) Ensayo OF: oxidación
- (22) Capacidad de producción de un ácido y un gas a partir de los azúcares siguientes, etc.:
 - L-Arabinosa: -
 - D-Xilosa : -
 - 20 D-Glucosa: +
 - D-Manosa: +
 - D-Fructosa: +
 - D-Galactosa: -
 - D-maltosa: +
 - 25 D-Sacarosa: +
 - D-Lactosa: +
 - D-Trehalosa: +
 - D-Sorbitol: -
 - Glicerol: -
 - 30 Almidón: -

Resultados de análisis biológico molecular:

Los resultados de los análisis de RH2180-5 con respecto a 16S rRNA de acuerdo con las normas de la clasificación sistemática biológica molecular son como siguen.

Secuencia de 16S rRNA

- 35 (12) Resultados de análisis de la secuencia de 16S rRNA

La secuencia de bases de la región de 16S rRNA a partir de la colonia de RH2180-5 fue amplificada mediante una PCR de colonias y seguidamente fue analizada mediante un secuenciador y, como consecuencia, pudo ser obtenida la secuencia de bases de la longitud casi completa de 16S rRNA excepto para algunas bases en el lado terminal 5' y

el lado terminal 3'. Esta secuencia de bases se muestra en la secuencia nº 1 en el gráfico de secuencias. Como la secuencia de bases en la secuencia nº 1 en el gráfico de secuencias no es obtenido a partir de la longitud completa de 16S rRNA, se usa el término "región" de 16S rRNA. Cuando la búsqueda de homología de esta secuencia de bases se ejecutó mediante NCBI BLAST, la secuencia de bases de la región de 16S rRNA de RH2180-5 mostró una

5 tasa de homología de 99% con relación a la secuencia de bases de la cepa DSN2043T de *Lysobacter enzymogenes*, que pertenece a un género *Lysobacter*. Igualmente, no hay ningún informe de que *Lysobacter enzymogenes* produzca una sustancia antibiótica y, por tanto, esto es diferente de RH2180-5.

Haciendo referencia a las propiedades de RH2180-5 como se mencionó anteriormente para la clasificación según ¿la publicación? Bergey's Manual Systematic Bacteriology, Vol. 3, 1989 y la descripción en otras referencias, junto con los resultados del análisis de 16S rRNA, el RH2180-5 se estimó exhaustivamente que era un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter*.

El RH2180-5 se estimó que era una cepa de microorganismo en una consideración exhaustiva de los hechos que incluyen lo siguiente: un microorganismo que tiene la secuencia de bases de la región de 16S rRNA idéntica a la secuencia de bases de la región de 16S rRNA de RH2180-5 no existe; los compuestos producidos a partir de RH2180-5 son compuestos que tienen una constitución básica de una estructura de péptidos cíclicos como se mencionó anteriormente; estos compuestos muestran una actividad antibacteriana no solamente para MRSA sino también VRE y podría ser confirmado un efecto terapéutico de los mismos para una enfermedad infecciosa mediante MRSA; algunas de las sustancia antibiótica producidas a partir RH2180-5 (esto se mencionará con posterioridad) tienen un espectro antibacteriana que muestra una actividad antibacteriana no solamente para MRSA sino también VRE (esto ha sido brevemente expuesto con anterioridad); se muestra un efecto terapéutico superior para una enfermedad infecciosa por *Staphylococcus aureus* en comparación con vancomicina; y se produce una sustancia antibiótica que tiene una elevada utilidad no expuesta con anterioridad.

El RH2180-5 fue depositado a nivel internacional en la entidad de depósito NITE Patent Microorganisms Depository (NPMD) de la entidad Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (NITE) con el nº de acceso NITE BP-870 (fecha de depósito original de 25 de enero de 2010 y fecha de depósito internacional (fecha de transferencia) de 20 de mayo de 2011), por lo que puede ser obtenido de la misma. Igualmente, en cuanto a las características generales de una bacteria, las propiedades de su cepa tienden a ser fácilmente mutadas y, por tanto, hay una posibilidad de que las propiedades fisiológicas de RH2180-5 no permanezcan como se mostraron con anterioridad. Además, no es necesario decir que la "mutación" anteriormente mencionada incluye tanto una mutación natural como una mutación artificial. Incluso un microorganismo mutante de RH2180-5 (nº de acceso NITE BP-870) está incluido en el microorganismo de la presente invención en la medida en que es capaz de producir la sustancia antibiótica. El compuesto péptido cíclico mostrado mediante la fórmula (1) anterior de la presente invención incluye los producidos a partir del microorganismo mutante de RH2180-5 (nº de acceso NITE BP-870). La fracción que contiene la sustancia antibiótica y la sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma de la presente invención pueden ser obtenidas a partir de un cultivo de RH2180-5.

A saber, el microorganismo de la presente invención es un microorganismo que pertenece a un género *Lysobacter* con nº de acceso NITE BP-870 o es un microorganismo mutado de forma natural o artificial del mismo y, además, es capaz de producir una sustancia antibiótica que muestra una actividad antibacteriana. Además, el microorganismo de la presente invención es un microorganismo que tiene la secuencia de bases de la región de 16S rRNA mostrada mediante la secuencia nº 1 en el gráfico de secuencias. Preferentemente, el microorganismo de la presente invención es un microorganismo que es capaz de producir el compuesto mostrado por la fórmula (1) anterior o la sal del mismo.

Más preferentemente, el microorganismo de la presente invención es el microorganismo que antecede, en el que la sustancia antibiótica producida a partir del mismo tiene una actividad antibacteriana para al menos *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE). Dicho de otro modo, el microorganismo NITE BP-870 capaz de producir una sustancia antibiótica que tiene una actividad antibacteriana para al menos MRSA y VRE y el microorganismo mutante a partir de NITE BP-870 están incluidos en el microorganismo más preferido de la presente invención. Además, no hace falta decir que su mutación incluye una mutación natural y una mutación artificial.

50 Método para el cultivo de RH2180-5

En lo que sigue se describirá un método para cultivar RH2180-5. El cultivo de RH2180-5, que produce un compuesto que tiene una estructura de péptidos cíclicos, la fracción que contiene sustancia antibiótica, etc., de la presente invención, se puede hacer de acuerdo con un método general para el cultivo de un microorganismo perteneciente a un género *Lysobacter*. Específicamente, el RH2180-5 es inoculado a un medio de cultivo de fuente nutriente como un medio de cultivo YME, un medio de cultivo SGM, un medio de cultivo CDY y un medio de cultivo YPGM y seguidamente es cultivado bajo un estado aeróbico. En cuanto a la fuente de carbono en el medio de cultivo, son usados compuestos de carbono orgánico como D-Glucosa, D-Fructosa, sacarosa, almidón, dextrina, glicerina, melazas, jarabe de almidón glutinoso y aceite de grasa. En cuanto a la fuente de nitrógeno, pueden ser usados compuestos de nitrógeno orgánicos e inorgánicos como extracto cárnico, caseína, peptona, extracto de levadura, levadura seca, germen, soja en polvo, urea, un aminoácido y una sal de amonio. Además, pueden ser añadidas en

la medida necesaria sales inorgánicas como una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de calcio, una sal de magnesio, una sal de fosfor farmacéuticamente aceptable, una sal de hierro, una sal de cobre, una sal de zinc y una sal de cobalto. Además, es preferible la adición de un acelerador del crecimiento como biotina, vitamina B1, cistina, oleato de metilo y aceite de manteca con el fin de aumentar la cantidad de producción de la sustancia prevista. Además, puede ser añadido un agente antiespumante como aceite de silicona y un tensioactivo.

En cuanto al estado del cultivo, es preferible que el cultivo se haga bajo un estado aeróbico, como se mencionó anteriormente. En el caso de un cultivo líquido, es preferible cultivar con un método de agitación aireada. En el caso de cultivar a pequeña escala, puede ser usado un cultivo con agitación mediante un matraz. Es posible que el cultivo se haga de 20 a 40 °C, pero es preferido mantener la temperatura de 25 a 35 °C, o más preferentemente a casi 30 °C. En cuanto al pH durante el cultivo, es preferido un pH de 6 a 8, aunque es particularmente preferido un pH de aproximadamente 7. El tiempo de cultivo es variable dependiendo del factor como el medio de cultivo usado y la temperatura de cultivo; pero en el caso de RH2180-5, el tiempo de cultivo está habitualmente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 días, o preferentemente en un tiempo reducido de aproximadamente 3 a 7 días, tiempo durante el cual puede ser asegurada una cantidad suficiente de la sustancia prevista.

Método de purificación de componente antibacterianamente activo

La recuperación de un componente antibacterianamente activo a partir de un cultivo de RH2180-5 se puede hacer mediante un método habitual para la recuperación y purificación de una sustancia fisiológicamente activa a partir del cultivo de un microorganismo. En este caso, el cultivo incluye la materia sobrenadante del cultivo, una estructura microbiana, una estructura triturada de un microorganismo cultivado, etc. Por ejemplo, después de que se forma una suspensión añadiendo un disolvente orgánico apropiado como acetona a un cultivo para un tratamiento de extracción, la estructura microbiana es retirada mediante separación centrífuga, separación de membrana o similar para obtener una materia sobrenadante de extracción, que puede ser seguidamente sometida a tratamientos de aislamiento y purificación. En la medida necesaria, la estructura microbiana residual puede ser adicionalmente sometida a una nueva extracción después de este tratamiento como una trituración por fricción.

Habitualmente, el disolvente de extracción usado en la separación y purificación de una sustancia prevista y el método para la separación y purificación de la misma se selecciona con respecto al grado de concentración de la actividad antibacteriana estimada mediante MIC. En la simple separación y concentración de un componente activo antibacteriana, básicamente no hay problema con esto. Sin embargo, en la separación y purificación de una fracción que contiene sustancia antibiótica y una sustancia antibiótica que se producen a partir de RH2180-5 de la presente invención, la selección de las mediciones que anteceden se hacen con referencia no solamente al resultado de MIC sino también al efecto terapéutico con el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda mostrado en el documento de patente 4. Como consecuencia, la concentración y purificación de "la sustancia antibiótica producida a partir de RH2180-5" se podría conseguir, a pesar de que estas operaciones han sido consideradas difíciles con referencia solamente al resultado de la MIC. Consecuentemente, este asunto se describirá a continuación.

Separación y purificación de sustancias antibiótica haciendo referencia al efecto terapéutico basado en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda

Estrechamiento de cepas eficaces mediante MIC

En la presente invención también se puede hacer una primera selección para afinar cepas eficaces a partir de varias decenas de miles de números extraordinariamente grandes de cepas mediante cualquier método en la medida en que la actividad antibacteriana pueda ser evaluada mediante dicho método y, por tanto, por ejemplo, haciendo referencia a la MIC, se pueden recoger estructuras de ensayo que muestran la actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* en la materia sobrenadante del cultivo de cada cepa. Esto es porque las cepas que no muestran la actividad antibacteriana en absoluto no están dentro del alcance del examen. Puede ser usado cualquier método capaz de evaluar la actividad antibacteriana, pero es preferible un método con el que se recoja una cepa que se reconoce que muestra, con respecto a la MIC, la actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* en la materia sobrenadante de varias cepas de ensayo. Posteriormente, cuando el número de cepas es afinado desde varios miles hasta varios centenares, la evaluación del efecto terapéutico de la fracción que contiene sustancia antibiótica y la sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma pueden ser estudiadas midiendo su ED₅₀, usando el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda.

Las cepas que se reconoce que muestran el efecto terapéutico en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda son adicionalmente sometidas a diversos tratamientos de separación y purificación en los que el efecto terapéutico es evaluado en cada operación usando el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda. Además, el grado de concentración del efecto terapéutico dependiente del tipo y método de las operaciones de separación y purificación administrando la fracción que contiene sustancia antibiótica de cada fase de purificación es confirmado usando el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda. Al hacer esto, se seleccionan el tipo y el método de operaciones de separación y purificación con los que puede ser eficazmente concentrado el "efecto terapéutico".

“Selección de cepa y método para las operaciones de separación y purificación haciendo referencia al efecto terapéutico”, como se mencionó anteriormente usando un animal experimental como un ratón, es prácticamente imposible considerando los problemas de procedimiento, coste y consideraciones éticas y, por tanto, esto se podría conseguir por primera vez utilizando el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda (véase el ejemplo 1).

Los resultados en la Tabla 2 resumen la MIC de la actividad antibacteriana y la ED₅₀ del efecto terapéutico mediante el modelo de infección del gusano de la seda de estructuras de ensayo en cada fase de purificación a partir del RH2180-5 que va a ser purificado. En la Tabla 2, la “unidad” de actividad total se define como la actividad necesaria para un 50% de probabilidad de supervivencia de un peso corporal de un gramo de gusanos de seda infectados con *Staphylococcus aureus*.

Como se muestra en la Tabla 2, de forma muy interesante, resulta claro que dependiendo de las operaciones de aislamiento y purificación, el grado de concentración de la actividad antibacteriana no coincide necesariamente con el grado de concentración del efecto terapéutico. Los resultados de la Tabla 2 muestran que la ED₅₀ se concentró en 300 veces, mientras que la MIC se concentró sólo en 5 veces según los métodos de aislamiento y purificación empleados en la presente invención.

Tabla 2

Purificación haciendo referencia al efecto terapéutico usando el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda

	Actividad Total (unidades)	Rendimiento de recuperación (%)	Peso		ED ₅₀ (µg/g·larva)	MIC (µg/ml)
			(mg)	(%)		
Extracto de acetona	87000	100	8100	(100)	90	25
Extracto de butanol	88000	100	340	(4)	4	0,6
Precipitación en agua	41000	47	80	(1)	1,8	N.D.
Cromatografía de columna ODS	45000	51	22	(0,2)	0,5	N.D.
RP-HPLC						
Pico 5	16000	18	5,3	(0,06)	0,3	5
Pico 9	10000	11	3,5	(0,04)	0,3	5

Purificación a partir de 1200 ml de cultivo N.D.: no determinada

Los resultados de la Tabla 2 muestran que la ED₅₀ es concentrada en 300 veces desde 90 en la fase de extracción en acetona hasta 0,3 en los picos fraccionados de la fase de purificación final mediante RP-HPLC, mientras que la MIC es concentrada en solo 5 veces desde 25 hasta 5 con este método de separación y purificación. Se muestra también que el rendimiento de recuperación del efecto terapéutico alcanza casi un 30% en dos picos con relación a 100% en el extracto de acetona, a pesar del hecho de que su rendimiento de recuperación basado en % en peso es de solamente 0,1%.

Además, se supone que las materias residuales después de la extracción en acetona contienen una cantidad relativamente grande de sustancias antibióticas que muestran la actividad antibacteriana pero que no muestran el efecto terapéutico y, por tanto, pueden ser usadas como la fracción que contiene sustancia antibiótica que muestra la actividad antibacteriana pero no muestra sustancialmente el efecto terapéutico mediante su recuperación y concentración.

El RH2180-5 se descubrió eficazmente usando el método de separación y purificación haciendo referencia al efecto terapéutico basado en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda. Esto es porque si la separación y purificación de una sustancia prevista se hace haciendo referencia solamente a la actividad antibacteriana, que se hizo previamente, el componente antibacterianamente activo que no muestra el efecto terapéutico es concentrado, por lo que se puede suponer a partir de los resultados de la Tabla 2 que hay una elevada posibilidad de perder una sustancia antibiótica que tiene un elevado efecto terapéutico en un cuerpo vivo.

En este caso, la utilidad del RH2180-5 no puede ser confirmada, por lo que es altamente probable que el propio RH2180-5 se haya perdido. Consecuentemente, para proporcionar el microorganismo (RH2180-5), es un punto muy importante en la presente invención que la selección se haga haciendo referencia al efecto terapéutico basado en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda.

5 Evaluación de la actividad antibacteriana mediante la concentración inhibidora mínima MIC

La actividad antibacteriana de la fracción que contiene sustancia antibiótica en cada fase del fraccionamiento a partir de un cultivo producido a partir de RH2180-5 y la de la sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma mediante su separación y purificación puede ser evaluada mediante la MIC. La medición de la MIC se hace mediante un método estándar generalmente reconocido. Por ejemplo, se hace con un método de microdilución del caldo basado en CLSI (anteriormente NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards).

El criterio estándar para la sensibilidad es diferente dependiendo de las cepas y, por tanto, de acuerdo con los criterios estándar estipulados por la CLSI, se hace una clasificación para las respectivas categorías, a saber S para sensible, I para intermedio y R para resistente.

(Con respecto a la fracción que contiene sustancia antibiótica)

15 En este caso, la expresión “fracción que contiene sustancia antibiótica” de la presente invención obtenida mediante fraccionamiento de un cultivo que se produce cultivando RH2180-5 (nº de acceso NITE BP-870) significa cualquiera de las siguientes fracciones; una fracción que contiene una sustancia antibiótica que muestra una cualquiera de la actividad antibacteriana y el efecto terapéutico o ambas cosas y obtenida mediante fraccionamiento de un cultivo de RH2180-5; una fracción obtenida separando y purificando una parte de las sustancias contenidas en la fracción que
20 antecede; una fracción obtenida purificando parcialmente una sustancia antibiótica contenida en la fracción separada y purificada y una fracción que contiene una sustancia antibiótica purificada hasta su estado puro.

Además, el extracto de acetona y el extracto de butanol en la Tabla 2, especialmente el extracto de butanol, se considera que es la fracción que contiene sustancia antibiótica que contiene una gran cantidad de la sustancia antibiótica que muestra la actividad antibacteriana pero que no muestra o que muestra escasamente el efecto
25 terapéutico en comparación con la sustancia antibiótica contenidos en los nueve picos (fracciones que contienen sustancia antibiótica) descritos en la Tabla 4 posteriormente mencionada considerando el bajo grado de concentración de la actividad antibacteriana en los posteriores procedimiento de purificación y el elevado grado de concentración del efecto terapéutico por otra parte. La fracción así habitualmente es considerada de baja utilidad; pero es de elevada utilidad por la razón descrita a continuación y, por tanto, se puede considerar que está incluida
30 en la fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención.

Es decir, cuando la sustancia antibiótica que tiene una elevada actividad antibacteriana es usada como un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa, su uso debe ser estrechamente examinado en cuanto a su necesidad considerando el surgimiento de una bacteria resistente a múltiples fármacos. Por otra parte, cuando esta sustancia antibiótica es usada como un agente antibacteriana como un agente de protección microbiana, es difícil restringir su
35 uso ya que su uso tiende de forma natural al abuso debido a sus realizaciones de uso y, por tanto, no se usa una sustancia antibiótica terapéutico para un agente de protección microbiana incluso aunque tenga una elevada actividad antibacteriana.

Sin embargo, la fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención que contiene una gran cantidad de la sustancia antibiótica que muestra la actividad antibacteriana pero que no muestra o muestra escasamente el efecto terapéutico evaluado mediante el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda u otro modelo infección microbiana y la sustancia antibiótica obtenida a partir de la misma como la sustancia antibiótica que muestra la actividad antibacteriana pero que no muestra o que muestra escasamente el efecto terapéutico,
40 puede ser usada en un uso in vitro como un agente de protección microbiana. Esto es porque estas fracciones que contienen sustancia antibiótica no son usadas como un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa y, por tanto, no hay necesidad de prestar atención al surgimiento de una bacteria resistente a múltiples fármacos. En la presente invención, que muestra la actividad antibacteriana pero “que no muestra sustancialmente el efecto terapéutico” significa que no muestra el efecto terapéutico hasta el grado en que pueda ser usada como un fármaco terapéutico.

Para separar y purificar esta sustancia antibiótica que no muestra sustancialmente el efecto terapéutico, se pueden usar los mismos métodos de evaluación que los de la sustancia antibiótica que antecede que muestra el efecto terapéutico, específicamente, se pueden seleccionar métodos con los cuales se pueda seleccionar una sustancia antibiótica que muestra la actividad antibacteriana mediante MIC pero que no muestra o muestra escasamente el efecto terapéutico mediante un modelo de enfermedad infecciosa puede ser separada y purificada. En este caso, la enfermedad infecciosa que antecede no está particularmente restringida; pero análogamente a la sustancia
50 antibiótica que muestra el efecto terapéutico, se puede usar preferentemente el modelo de enfermedad infecciosa que usa un gusano de la seda, como el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda.

Además, la separación y purificación de la sustancia antibiótica que no muestra el efecto terapéutico se puede hacer solamente por sí misma; pero es preferible utilizar los resultados de investigación sobre los métodos de separación y

purificación de la sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico. Es decir, se usa un método para recuperar la sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico para la fracción que contiene sustancia antibiótica y seguidamente se usan los métodos para la concentración, separación y purificación de la sustancia antibiótica que no muestra el efecto terapéutico para su residuo y, al hacer esto, la sustancia antibiótica que muestra la actividad antibiótica pero que no muestra el efecto terapéutico puede ser separada y purificada sin una investigación especial.

Seguidamente, se describirá el método para la separación y purificación de una sustancia antibiótica a partir de la fracción que contiene la sustancia antibiótica haciendo referencia al ejemplo de separación y purificación de la sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico.

(Método para la separación y purificación de una sustancia antibiótica)

Un método para separación y purificación haciendo referencia a la base del efecto terapéutico en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda no está particularmente restringido; y se pueden mencionar métodos como extracción en disolvente del cultivo, disolución en otra fase disolvente, precipitación en agua, cromatografía mediante columna ODS, etc. y fraccionamiento usando RP-HPLC con una columna ODS, etc. Los disolventes para la extracción en disolvente y para la disolución en otra fase disolvente no están particularmente restringidos pero, preferentemente, ejemplos de los mismos incluyen un disolvente soluble en agua como acetona; un disolvente hidrófilo como butanol; un disolvente mixto de los mismos; un disolvente mixto de agua y un disolvente hidrófilo y un disolvente mixto de agua y un disolvente soluble en agua. Se puede usar una columna rellena con un material portador modificado con un grupo octilo o un grupo butilo o una columna rellena con un material portador polímero de un tipo de poliestireno o similar, en lugar de la columna ODS (véase la Tabla 2).

Igualmente, los métodos para el aislamiento y purificación como se mencionaron anteriormente son simples ejemplos y, por tanto, puede ser usado cualquier método de aislamiento y purificación con la condición de que pueda ser finalmente obtenida una fracción que contiene la sustancia antibiótica prevista y la sustancia antibiótica mediante dicho método.

(Análisis estructural de sustancia antibiótica separadas y purificadas)

Mediante RP-HPLC como se mencionó anteriormente, se podrían obtener separadamente compuestos fraccionados en 9 picos (los correspondientes a las fracciones que contienen sustancia antibiótica) a partir del cultivo de RH2180-5 (Fig. 1). Como estos tienen modelos de absorción UV similares, son compuestos similares unos a otros y constituyen un componente antes de la fase de RP-HPLC dependiendo del método de separación y purificación.

En cuanto al método de análisis para las estructuras químicas de las sustancias antibióticas contenidas en estos picos, no hay ninguna restricción particular y, por tanto, puede ser usado un método arbitrario. Por ejemplo, se hizo un análisis estructural de la muestra del pico 5, que es pico principal de los 9 picos purificados mediante RP-HPLC, mediante los siguientes métodos de ensayo.

A saber, como consecuencia de un análisis de las mismas mediante una espectrometría de masas exacta para la medición del peso molecular, un análisis de aminoácidos después de un tratamiento de hidrólisis ácida (Fig. 2), un análisis mediante $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 3), y análisis de TOF-MS (TOF: Tiempo de Vuelo) (Fig. 4), etc., se detectaron dos moléculas como cada una de Thr, Glu, Glu, y Arg y una molécula como cada una de Ser, Gly, e Ile (Fig. 4) y, por tanto, se encontró que era una sustancia antibiótica que tenía una estructura principal mostrada por la Fig. 9 (en lo sucesivo se describe como "sustancia del pico 5 RH2180-5").

(Espectro antibacteriana)

El espectro antibacteriana de la sustancia antibiótica contenida en cada uno de los picos puede ser estudiado mediante MIC como se mencionó anteriormente. Al hacer esto, por ejemplo, la sustancia del pico 5 RH2180-5 mostró actividad antibacteriana para bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, como se muestra en la Tabla 3 del Ejemplo 1. Además, esta sustancia mostró una actividad antibacteriana no solamente para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) sino también a *Enterococcus* resistente a vancomicina (VER) y, por tanto, se confirmó que esta es también eficaz para bacterias resistentes a múltiples fármacos (véase la Tabla 3).

Además, las sustancias antibióticas contenidas en el pico 6 y el pico 9 mostraron también el mismo espectro antibacteriana para MRSA y VER que la sustancia del pico 5 RH2180-5 (véase la Tabla 3).

Se investigó la actividad antibacteriana de las sustancias antibióticas contenidas en el pico 2, pico 3, pico 4, pico 7 y pico 8, excepto para el pico 1, para las bacterias resistentes a múltiples fármacos y para la bacteria que no muestra resistencia química y, como resultado, análogamente a las sustancias antibióticas contenidas en el pico 5, pico 6 y pico 9, las sustancias antibióticas contenidas en estos picos mostraron la misma actividad antibacteriana para las bacterias resistentes a múltiples fármacos y para la bacteria que no muestra resistencia química y, por tanto, se pudo confirmar que no están influenciadas por la resistencia a múltiples fármacos (véase la Tabla 4 del Ejemplo de Ensayo 2).

Consecuentemente, se puede confirmar que la sustancia antibiótica que tiene un efecto terapéutico que está contenida en la fracción que contiene sustancia antibiótica de la presente invención es una sustancia antibiótica caracterizada porque es obtenida a partir de un cultivo de RH2180-5 (nº de acceso NITE BP-870), la sustancia antibiótica producida a partir de dicho microorganismo y tiene una actividad antibacteriana para MRSA y VRE).

5 Efecto terapéutico en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* en ratón

Se confirmó que la sustancia antibiótica producida a partir de RH2180-5 tiene el efecto terapéutico en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda en cada etapa de purificación. En el documento de patente 4, se confirmó que una sustancia que muestra el efecto terapéutico en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda muestra también el efecto terapéutico en el modelo de infección de ratón. Por lo tanto, se hizo una confirmación similar a la sustancia del pico 5 RH2180-5 y, como resultado, la sustancia del pico 5 RH2180-5 mostró el efecto terapéutico en el modelo de infección de ratón también y su valor de ED₅₀ fue de 0,6 mg/kg, que es claramente inferior al 1,6 mg/kg de vancomicina, por lo que se confirmó que tiene un elevado efecto terapéutico (véase la Tabla 5 del Ejemplo de Ensayo 3).

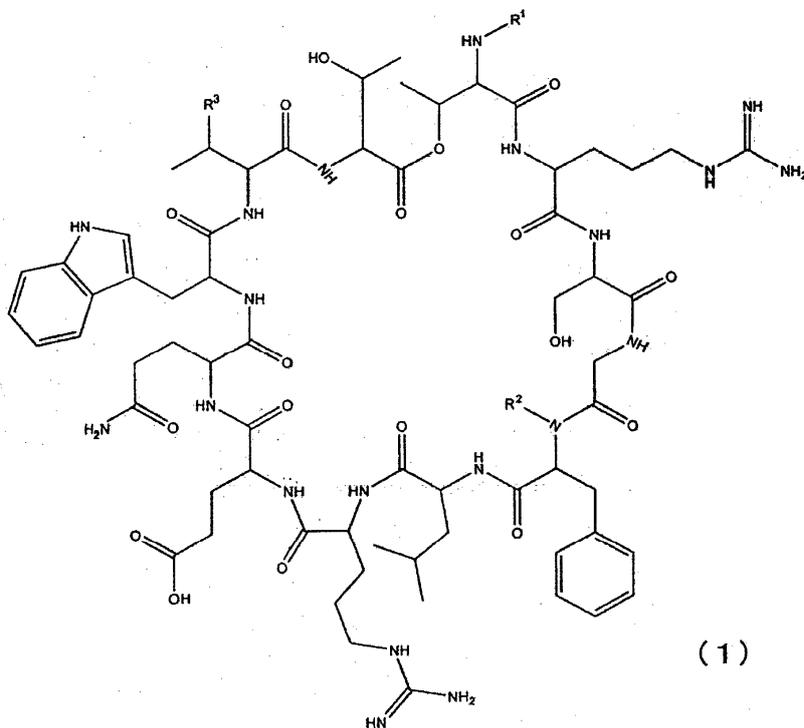
El resultado del ensayo de toxicidad aguda para un ratón mostró que el ratón no murió con una cantidad de dosis de 50 mg/kg y, por tanto, la sustancia del pico 5 RH2180-5 tiene una baja toxicidad.

A partir de los resultados anteriormente mostrados, se pudo confirmar que la sustancia antibiótica del pico 5 RH2180-5 producida a partir de RH2180-5 de la presente invención muestra un valor de ED₅₀ más excelente para *Staphylococcus aureus* en comparación con vancomicina, por lo que muestra un elevado efecto terapéutico al mismo tiempo que tiene excelentes características de mostrar eficacia no solamente para MRSA sino también para VRE, que son gérmenes químicos muy problemáticos.

A saber, la fracción que contiene sustancia antibiótica producida a partir de RH2180-5 de la presente invención contiene una sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa debida al menos a *Staphylococcus aureus* y, además, esta sustancia antibiótica muestra el efecto terapéutico para la enfermedad infecciosa que antecede al mismo nivel o superior en comparación con vancomicina.

Además, las sustancias en otros picos (correspondientes a sustancias antibióticas en las fracciones que contienen sustancias antibióticas) muestran también los espectros antibacteriana (confirmados en el pico 6 y el pico 9) y espectros UV similares a los de la sustancia del pico 5 RH2180-5, sugiriendo que estas son compuestos similares a la sustancia del pico 5 RH2180-5. Consecuentemente, se supone que sus efectos terapéuticos tienden a ser iguales a los de la sustancia del pico 5 RH2180-5.

Análogamente a la muestra purificada a partir del pico 5 mediante RP-HPLC, el análisis estructural de otros picos se hizo con una espectrometría de masas exacta para la medición del peso molecular, análisis de aminoácidos después de un tratamiento de hidrólisis ácida, análisis mediante ¹H-NMR y ¹³C-NMR, análisis de TOF-MS, un espectro UV y un espectro de absorción infrarrojos (IR) y, como resultado, eran los compuestos mostrados mediante la siguiente fórmula (1) y en la Tabla 1.



(En la fórmula (1), R^1 representa un grupo acilo que tiene 7, 8 o 9 átomos de carbono y que contiene un grupo hidroxilo; R^2 representa un grupo metilo o un átomo de hidrógeno y R^3 representa un grupo etilo o un grupo metilo).

5 La presente invención es preferentemente las sustancias antibióticas que anteceden mostradas mediante la fórmula (1) anterior y la sustancia antibiótica mostrada mediante la fórmula (1) anterior es de forma particularmente preferida las sustancias mostradas en la Tabla 1 anterior.

10 El método para separar y purificar una cualquiera de las sustancias antibióticas que muestran una actividad antibacteriana y la sustancia antibiótica que muestra un efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa, o ambas cosas, a partir de un cultivo que es producido cultivando el RH2180-5 que antecede (nº de acceso NITE BP-870) y contiene el compuesto péptido cíclico que antecede o la sal del mismo, puede ser usado como el método para fabricar una sustancia antibiótica útil. Dicho RH2180-5 (nº de acceso NITE BP-870) tiene la secuencia de bases de la región de 16S rRNA mostrada por la secuencia nº 1 en el gráfico de secuencias.

15 Además, este método puede ser usado como el método para fabricar una sustancia antibiótica, en que la sustancia antibiótica muestra una actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE).

Adicionalmente, la presente invención puede ser usada como el método para fabricar una sustancia antibiótica, en que la sustancia antibiótica muestra una actividad antibacteriana para MRSA y VRE y además muestra un efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa debida al menos a *Staphylococcus aureus*.

20 La fracción que contiene sustancia antibiótica obtenida mediante fraccionamiento de un cultivo que es producido cultivando el microorganismo con nº de acceso NITE BP-870 es útil. Además, el agente de protección microbiana que contiene la sustancia antibiótica obtenida a partir de este cultivo es útil. Además, el agente de protección microbiana que contiene la fracción antes del aislamiento de una sustancia como la sustancia es útil.

Método de preparación del compuesto péptido cíclico de la presente invención a partir de un cultivo de RH2180-5

25 En cuanto al método para obtener "el compuesto péptido cíclico mostrado por la fórmula (1) que antecede" de la presente invención a partir de un cultivo de RH2180-5, se puede mencionar un método convencional para obtener una sustancia fisiológicamente activa a partir de un cultivo de un microorganismo. En este caso, el término "cultivo" significa lo mismo que se mencionó con anterioridad.

30 Para preparar "el compuesto péptido cíclico mostrado mediante la fórmula (1) que antecede" de la presente invención, se seleccionan métodos para su aislamiento y purificación no solamente mediante la confirmación habitualmente usada de la actividad antibacteriana mediante MIC, sino también haciendo referencia al efecto terapéutico (ED_{50}) como un indicador usando el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda descrito en el documento de patente 4 (véase la Tabla 2).

Es decir, se puede suponer que el compuesto péptido cíclico mostrado por la fórmula (1) que antecede de la presente invención podría ser eficazmente descubierto usando los métodos de aislamiento y purificación que se seleccionaron haciendo referencia no solamente a MIC sino también al efecto terapéutico basado en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda.

5 Espectro antibacteriana

El espectro antibacteriana del compuesto péptido cíclico mostrado mediante la fórmula (1) que antecede de la presente invención puede ser investigado mediante MIC como se mencionó con anterioridad. Como consecuencia, se pudo confirmar que, por ejemplo, cada sustancia del pico 5, pico 6 y pico 9 de RH2180-5 muestra una actividad antibacteriana para bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* y, además, exactamente la misma actividad antibacteriana que las bacterias habituales no solamente para MRSA sino también para VRE, mostrando así que estas son sustancias útiles para muchas bacterias resistentes a múltiples fármacos (véase la Tabla 3 del Ejemplo de Ensayo 1 y la Tabla 6 del Ejemplo del Ensayo 4).

Los espectros antibacterianas de cada sustancia de los picos, a saber, los espectros antibacterianas de los compuestos péptidos cíclicos mostrados por la fórmula (1) que antecede se investigaron mediante MIC (la sustancia del pico 1 no fue investigada) para *Staphylococcus aureus* (MSSA 1) y *Enterococcus faecalis* (EF 1), que son el mismo tipo de bacterias sensibles a productos químicos que *Staphylococcus aureus* resistente a metililina (MRSA 3 y MRSA 4) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) y, como consecuencia, cada sustancia de los picos mostró casi los mismos valores de MIC entre MSSA 1 y MRSA 3 y MRSA 4 y entre EF 1 y VRE y, por tanto, se pudo confirmar que un grupo de los compuestos de la presente invención no está influenciado por la resistencia química que incluye resistencia a vancomicina (véase la Tabla 4 del Ejemplo del Ensayo 2).

El compuesto que tiene una estructura péptida cíclica mostrada por la fórmula (1) anterior de la presente invención contiene un compuesto que muestra una actividad antibacteriana para al menos *Staphylococcus aureus* resistente a metililina (MRSA) y *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE).

Consecuentemente, se pudo confirmar que el compuesto que tiene una estructura péptida de la presente invención puede ser producido, por ejemplo, a partir de un cultivo del nuevo microorganismo RH2180-5 (nº de acceso NITE BP-870) e incluye un compuesto que muestra una actividad antibacteriana para al menos MRSA y VRE resistentes a múltiples fármacos. Igualmente, el método de cultivo del microorganismo, el método de purificación, etc., que se mencionan con anterioridad, son simples ejemplos que se seleccionaron para encontrar los compuestos de la presente invención, por lo que es natural seleccionar diferentes métodos de fabricación de acuerdo con su finalidad cuando haya necesidad de fabricar a gran escala con elevada eficacia, etc.

Fármaco terapéutico para enfermedad infecciosa

Un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa que contiene el compuesto péptido cíclico mostrado por la fórmula (1) anterior o su sal farmacéuticamente aceptable, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tiene un excelente efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa. Está reconocido que especialmente alguno de los compuestos péptidos cíclicos mostrados por la fórmula (1) anterior o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención, tienen un efecto terapéutico superior en comparación con vancomicina no solamente en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda, sino también en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* en ratón (este modelo se explicará con posterioridad); y, por tanto, pueden ser adecuadamente usados como un ingrediente activo de un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa.

El contenido del compuesto de la presente invención en el fármaco terapéutico que antecede para una enfermedad infecciosa no está particularmente restringido y, por tanto, su contenido puede ser apropiadamente seleccionado dependiendo de su finalidad y modo de administración. Además, pueden ser apropiadamente seleccionados y usados un excipiente y otros aditivos que se usen en la producción de una formulación de una sustancia antibiótica, hasta el grado en que no afecten adversamente al efecto farmacéutico del compuesto de la presente invención, de acuerdo con los requisitos de esta formulación.

La formulación del fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con un objeto y un método de administración y, por tanto, los compuestos de la presente invención pueden ser usados para cualquier administración oral en forma de polvos, gránulos, cápsulas, comprimidos y solución; o cualquier administración parenteral como inyección, infusión intravenosa, supositorio, administración dérmica, por vía pernasal, enteral o inhalante. Como excipientes para una administración oral, se pueden usar excipientes conocidos hasta ahora como lactosa, glucosa, almidón y polivinilpirrolidona; y cuando se usa en forma de una solución, el compuesto de la presente invención puede ser usado en un disolvente inerte como agua purificada y etanol, junto con un emulsionante farmacéuticamente permitido, agente suspensor, solubilizante, edulcorante, controlador del pH, fragancia, conservante, etc.

Cuando se usa como un fármaco inyectable, se puede usar una solución acuosa esterilizada como agua destilada y una solución salina fisiológica para inyección, mientras que en el caso de una solución no acuosa, un ejemplo ilustrativo de la solución utilizable incluye un aceite vegetal como aceite de oliva; y un alcohol como etanol, polietilenglicol y butilenglicol. Además, pueden estar contenidos en la misma un agente de tonicidad, un

emulsionante, un agente dispersante, un estabilizador y un agente solubilizante como ciclodextrina.

5 La cantidad de dosificación del producto del compuesto de la presente invención que se formula como se mencionó anteriormente se puede determinar apropiadamente de acuerdo con los síntomas, edad, sexo, formulación, vía de administración, frecuencia de administración por día, etc.; pero la cantidad de dosificación para un adulto es generalmente de 10 a 1.000 mg por día. Sin embargo, por ejemplo, cuando es usada como una infusión de goteo intravenosa que es frecuentemente usada para curar un paciente grave de una bacteria resistente a múltiples fármacos, existe una posibilidad de necesitar más cantidad de dosificación.

Ejemplos

10 En lo que sigue, la presente invención se explicará más en detalle haciendo referencia a ejemplos, ejemplos de ensayo y ejemplos de examen; pero la presente invención no está limitada a la gama concreta de los ejemplos siguientes, etc.

Ejemplo 1

Aislamiento y purificación de sustancia del pico 5 RH2180-5

(1) Exploración de microorganismo que tiene actividad antibacteriana mediante MIC

15 Un terreno tomado de diversos lugares se puso en suspensión en una solución salina fisiológica y seguidamente la parte sobrenadante de la misma fue aplicada a un medio GA y un medio HV; y después de una incubación a 30 °C, se separaron bacterias en crecimiento y seguidamente se cultivó en un medio YME, un medio SGM o un medio CDY a 30 °C durante 5 días. Se añadió una cantidad igual de acetona a los mismos y posteriormente se pusieron en suspensión y se centrifugaron y separaron y la materia sobrenadante resultante se evaporó. El residuo que resultó de esta manera se diluyó con solución salina fisiológica y seguidamente su actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* se evaluó mediante MIC con un método de microdilución de caldo. Como consecuencia la actividad antibacteriana fue encontrada en la materia sobrenadante del cultivo de cepas 3487 de 14346 cepas.

20 (2) Estudio de cepa de microorganismo capaz de producir su estancia terapéuticamente activa usando el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* del gusano de la seda (en lo que sigue, este modelo se escribe como "modelo del gusano de la seda" para abreviar)

Los efectos terapéuticos de 3487 de las cepas que anteceden que mostraban una actividad antibacteriana fueron estudiados el modelo del gusano de la seda descrito en el documento de patente 4 y, como consecuencia, se encontró el efecto terapéutico en la materia sobrenadante del cultivo de 45 cepas.

30 (3) Purificación de sustancia terapéuticamente activa haciendo referencia al efecto terapéutico usando el modelo del gusano de la seda

De las 45 cepas anteriormente mencionadas, se purificó una sustancia terapéuticamente activa a partir de una materia sobrenadante del cultivo de RH2180-5 que se separó del terreno tomado de Okinawa. El RH2180-5 se identificó como un microorganismo perteneciente al género *Lysobacter* mediante análisis de su secuencia 16S rRNA, tendencia de las sustancias producidas a partir del mismo, etc., que se mencionarán con posterioridad.

35 El RH2180-5 fue inoculado y cultivado en 1.200 ml de medio YME y, seguidamente, se investigó un método para la purificación de una sustancia antibiótica que muestra un efecto terapéutico a partir de un extracto del cultivo de 50% en peso de acetona haciendo referencia al efecto terapéutico en el modelo del gusano de la seda. Como consecuencia, pudo ser purificada una sustancia antibiótica que mostraba el efecto terapéutico purificada mediante disolución en una fase de butanol, precipitación en agua, cromatografía en una columna ODS y RP-HPLC (HPLC de fase inversa) usando una columna ODS.

40 Como se muestra en la Tabla 2, la actividad específica del efecto terapéutico (ED50) se elevó en 300 veces en relación al extracto de acetona mediante los procedimientos de purificación que anteceden. Por otra parte, la actividad antibacteriana (MIC) se elevó en 5 veces. Esto presumiblemente es porque la actividad antibacteriana mostrada en el extracto de acetona, el material de partida y la purificación fue con intervención de una sustancia distinta de la sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico en el producto finalmente purificado y, además, pudo ser separada una sustancia activa antibacteriana distinta de la sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico mediante estos procedimientos de purificación seleccionados.

45 Además, se detectaron 9 compuestos que tenían un modelo de absorción UV similar en la RP-HPLC que antecede y, por tanto, se confirmó que el RH2180-5 produjo al menos 9 compuestos relacionados (véase el modelo de absorción UV de HPLC en la Fig. 1).

50

Ejemplo 2

Cultivo de RH2180-5 y fabricación de la sustancia del pico 5 RH2180-5

5 Un microorganismo tomado de un cultivo inclinado de RH2180-5 mediante un palillo de platino fue inoculado a un matraz Erlenmeyer de 500 ml relleno con 100 ml de medio YME y seguidamente se cultivó a agitando a 30 °C durante 3 días para obtener un cultivo de siembra. Seguidamente, 1,0 ml de este cultivo de siembra fue inoculado a 12 matraces Erlenmeyer de 500 ml relleno cada uno con 100 ml de dicho medio líquido y seguidamente se agitaron para cultivar a 30 °C durante 5 días.

10 A la solución del cultivo así obtenida se añadió una cantidad igual de acetona y, seguidamente, después de que esta solución de mezclas se agitó a fondo y seguidamente se separó por centrifugación, la materia sobrenadante resultante se evaporó para separar acetona. Seguidamente, este material se sometió a disolución en otra fase disolvente usando butanol. La disolución en disolvente de butanol se hizo como sigue: el extracto de acetona se puso en suspensión en 80 ml de agua y después se le añadió una cantidad igual de butanol, la mezcla resultante se agitó a fondo y se dejó en reposo. La capa de butanol resultante se separó mediante un embudo de separación y seguidamente se evaporó hasta sequedad para ser usada para una precipitación en agua. La precipitación en agua se hizo como sigue: después de que el residuo seco que antecede se pusiera en suspensión en 80 ml de agua, la suspensión resultante se separó por centrifugación para recoger una materia depositada.

20 Una muestra de 75 mg de residuo de extracto de butanol se disolvió en metanol a 60% y seguidamente usando 25 ml de Waters, Sep-Pak C18 (Sep-Pak es la marca registrada fabricada por la entidad Waters Corp.), se hizo una elución con metanol de 60 al 100% que contenía 0,1% de TFA para cada 20 ml con un incremento de 10%. Como consecuencia, la fracción que contiene sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico se eluyó en la fracción de metanol de 70 a 80%.

25 Estas fracciones que contienen sustancia antibiótica que muestran el efecto terapéutico se recogieron y se secaron y se tomó un peso de 22 mg de cada muestra así obtenida y disuelta en metanol al 50% y, seguidamente, usando la columna Senshu Pak SP-100 ODS (diámetro de 20 mm y longitud de 250 mm, fabricada por la entidad Senshu Scientific Co., Ltd.), se hizo una elución con metanol de 75 a 95% que contenía 0,1% de TFA. La fracción que contenía sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico fue fraccionada en 9 fracciones que contenían un compuesto en cada fracción mediante RP-HPLC con las condiciones anteriores.

30 A partir de la RP-HPLC anteriormente mencionada se confirmó que la fracción que contiene la sustancia antibiótica que muestra el efecto terapéutico comprende un grupo de 9 compuestos que tienen un modelo de absorción UV similar con un componente principal del mismo que está en el pico 5 (Instrumento UV: fila foto-diodos Waters 2996) (véase la Fig. 1).

Llevando a cabo las operaciones anteriores se obtuvieron 5,3 mg de la sustancia del pico 5 RH2180-5. De una manera similar a la anterior, se obtuvo cada sustancia de los picos a partir de los respectivos picos de pico 1, pico 2, pico 3, pico 4, pico 6, pico 7, pico 8 y pico 9.

35 Ejemplo de Examen 1

Análisis estructural de la sustancia del pico 5 RH2180-5

Se hizo una espectrometría de masas exacta de la sustancia del pico 5 RH2180-5 con un espectrómetro de masas Bio TOF-Q (fabricado por la entidad Bruker Daltonics, Inc.); y, como consecuencia, se encontró que su peso molecular era de 1616,9 [(M+H)⁺ de m/z=1617,8755 mediante ESI-TOF-MS].

40 Se hizo un análisis de aminoácidos mediante un analizador de aminoácidos (fabricado por la empresa Hitachi, Ltd.) después de la hidrólisis de la muestra con ácido clorhídrico 6N a 105 °C y, seguidamente, se detectaron dos moléculas para cada uno de Thr, Glu y Arg y una molécula para cada uno Ser, Gly e Ile (Fig. 2).

45 Además, como consecuencia del análisis de ¹H-NMR y ¹³C-NMR mediante ECA-500 NMR (fabricado por la entidad JEOL, Ltd.) (Fig. 3) y un análisis TOF-MS (Fig. 4), la sustancia del pico 5 RH2180-5 fue identificada como el compuesto péptido cíclico mostrado mediante la fórmula (1) cuyo R¹ es un grupo 3-hidroxi-5-metil-hexanoilo, R² es un grupo metilo, y R³ es un grupo etilo, con la constitución mostrada en la Fig. 9.

Cuando la sustancia del pico 5 RH2180-5 fue sometida a hidrólisis ácida y seguidamente analizada como estructura D o estructura L mediante una columna quiral, se encontró que Ile, Ser, Leu y 2 Thr (treoninas) eran estructuras L mientras que N-MePhe y dos Arg (argininas) y Trp (triptófanos) eran estructuras D.

50 En cuanto a Gln y Glu, los dos se transformaron en Glu mediante hidrólisis ácida y, seguidamente, fueron detectados como la mezcla 1:1 de estructura D y estructura L. Por tanto, el péptido que contiene glutamina y ácido glutámico se hizo reaccionar con bis(1,1-trifluoroacetoxi)yodobenceno para transformar glutamina en ácido diaminobutílico y, seguidamente, después de su hidrólisis, el ácido glutámico no reaccionado se analizó en cuanto a la configuración absoluta mediante una columna quiral, estableciendo así que Gln era estructura D y Glu era

estructura L. (El método de determinación de estructura D y estructura L mediante este método de descomposición es un método usado en esta solicitud de patente por primera vez).

La configuración absoluta R del grupo hidroxilo de la cadena de ácido alifático se determinó mediante el método de Mosher modificado.

- 5 Como consecuencia, se encontró que la sustancia del pico 5 RH2180-5 es un compuesto péptido cíclico con su aminoácido en una conformación tridimensional, como se muestra en la Fig. 10.

Ejemplo de Examen 2

Análisis estructural de la sustancia del pico 9 RH2180-5

- 10 Se hizo un análisis estructural del compuesto del título mediante los métodos de análisis estructurales análogos a los del Ejemplo de Examen 1 con la excepción de que se usó la sustancia del pico 9 RH2180-5 como la muestra para el análisis estructural (véase la Fig. 8). Como consecuencia, se confirmó que esta sustancia es un compuesto péptido cíclico que tiene la misma estructura química que la de la sustancia del pico 5 RH2180-5, excepto en que R¹ en la fórmula (1) es un grupo 3-hidroxi-7-metil-octanoilo.

- 15 Además, las otras sustancias de los picos fueron analizadas análogamente, confirmando así que son compuestos que tiene la misma estructura de péptido cíclico que la sustancia del pico 5 RH2180-5 y la sustancia del pico 9 RH2180-5 en todo, excepto en que R¹, R² y R³ son los mostrados en la Tabla 1 (véanse las Figs. 5, 6, 7 y 8).

Ejemplo de Ensayo 1

Estudio de espectros antibacterianos de compuestos péptidos cíclicos de la presente invención

- 20 Se estudió el espectro antibacteriano de la sustancia del pico 5 RH2180-5 para diversas bacterias que incluyen MRSA y VRE. Además, se estudió también la influencia de la resistencia química. Para el estudio de esta última, se seleccionaron *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, y el valor de la medición de MIC de cada sustancia de los picos se hizo mediante un método de microdilución del caldo basado en la entidad CLSI (anteriormente NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards) en el que *Staphylococcus aureus* no mostró resistencia a un producto químico (en lo sucesivo abreviado "MSSA 1") y dos tipos de MRSA mostraron resistencia a muchos productos químicos que incluían metilicina (MRSA 3 y MRSA 4; véase la Tabla 3 para los productos químicos resistentes) para *Staphylococcus aureus* y para *Enterococcus faecalis* no mostró resistencia a un producto químico (en lo sucesivo abreviado como "EF 1") y mostraba resistencia a vancomicina (en lo sucesivo abreviado como "VRE") para *Enterococcus faecalis*.

- 30 Además, los valores de la MIC de la sustancia del pico 6 RH2180-5 y la sustancia del pico 9 RH2180-5 se midieron como MSSA 1 y EF 1 y sus bacterias resistentes a productos químicos (MRSA 3, MRSA 4 y VRE). Los diversos microorganismos usados para el ensayo y los resultados de las mediciones de la MIC para los mismos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Cepas	Productos químicos que muestran resistencia	MIC (µg/ml)			
		Pico 5	Pico 6	Pico 9	Pico 9
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA1)	No	5	5	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA3)	OX, FL, KM, TC, EM	5	5	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA4)	OX, FL, KM, CP,	5	5	5	5
<i>Enterococcus faecalis</i> (EF1)	No	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE)	VM	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803		25			
<i>Bacillus subtilis</i> JCM2499		6.3			
<i>Bacillus cereus</i> JCM20037		3,1			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		25			
<i>Streptococcus agalactiae</i> JCM5671		100			
<i>Streptococcus sanguinis</i> JCM5708		100			
<i>Salmonella enteria</i>		>100			
<i>Escherichia coli</i>		>100			
<i>Serratia marcescens</i>		>100			

Cepas	Productos químicos que muestran resistencia	MIC (µg/ml)			
		Pico 5	Pico 6	Pico 9	Pico 9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		>100			
<i>Candida albicans</i>		>100			
	OX : oxacilina FL : flomoxef KM : kanamicina TC : tetraciclina CP : cloranfenicol EM : eritromicina CPLX : ciprofloxacina VM : vancomicina				

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 3, se confirmó que la sustancia del pico 5 RH2180-5 muestra una actividad antibacteriana para bacterias gram-positivas porque muestra actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

5 Además, se confirmó que esto no está influenciado por resistencia a múltiples fármacos que incluyen vancomicina porque muestra los mismos valores de MIC para dos MRSA y VRE resistentes a múltiples fármacos en cuanto al valor de MIC para bacterias habituales (MSSA 1 y EF 1). Estos valores de la MIC no son bajos y no son elevados en la actividad antibacteriana en comparación con sustancias antibióticas previamente informadas; pero en cuanto al efecto terapéutico, se confirmó mediante los estudios mostrados con posterioridad que su efecto terapéutico es mayor en comparación con vancomicina.

10 Además, se confirmó que la sustancia del pico 6 RH2180-5 y la sustancia del pico 9 RH2180-5 muestran las mismas actividades antibacterianas para bacterias resistentes a múltiples fármacos y para bacterias habituales como las de la sustancia del pico 5 RH2180-5.

Ejemplo de Ensayo 2

15 Estudio comparativo de la actividad antibacteriana de cada sustancia de los picos para bacterias resistentes a múltiples fármacos y para bacterias que tienen resistencia química

En cuanto a los compuestos de la presente invención de 8 sustancias de la sustancia del pico 2 y la sustancia del pico 9, excepto para la sustancia del pico 1, que se quedaba corta en la cantidad del ensayo, el estudio comparativo se hizo sobre las actividades antibacterianas para bacterias resistentes a múltiples fármacos y para bacterias que tenían resistencia química.

20 Se seleccionaron microorganismos del ensayo de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, los mismos que el Ejemplo de Ensayo 1; y la medición del valor de la MIC de cada sustancia de los picos se hizo mediante un método de microdilución de caldo basado en la entidad CLSI (anteriormente NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards) para MSSA 1 y EF 1, y MRSA 3, MRSA 4 y VRE, los mismos que el Ejemplo de Ensayo 1. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.

25 Tabla 4

Compuestos	MSSA1	MRSA3	MRSA4	EF1	VRE
P1	-	-	-	-	-
P2	12,5	12,5	6,3	50	50
P3	25	25	25	50	50
P4	12,5	25,0	12,5	50	25
P5	6,3	6,3	6,3	12,5	12,5
P6	6,3	6,3	3,1	50	25
P7	12,5	12,5	1,5	50	25
P8	12,5	12,5	12,5	50	25
P9	6,3	6,3	6,3	12,5	12,5

MIC (µg/ml)

MSSA1: *Staphylococcus aureus*

MRSA3: *Staphylococcus aureus* resistente a OX, FL, KM, TC y EM

30 MRSA4: *Staphylococcus aureus* resistente a OX, FL, KM, CP y CPLX

EF1: *Enterococcus faecalis*

VRE: *Enterococcus* resistente a vancomicina

OX: oxacilina

FL: flomoxef

KM: kanamicina

5 TC: tetraciclina

CP: cloranfenicol

EM: eritromicina

CPLX: ciprofloxacina

10 Como consecuencia, el valor de la MIC en sí mismo para cada sustancia de los picos es mayor en comparación con los agentes antibacterianos previamente descritos; pero cuando la comparación se hizo entre bacterias habituales y bacterias resistentes a múltiples fármacos (entre MSSA 1 y MRSA 3 y MRSA 4, y entre EF 1 y VRE) los valores de la MIC son casi iguales, confirmando así que la actividad antibacteriana de cada sustancia de los picos no está influenciada por la resistencia a múltiples fármacos.

15 Igualmente, en el caso del compuesto péptido cíclico de la presente invención, se confirmó que la actividad antibacteriana no coincide necesariamente con el efecto terapéutico. Por ejemplo, la sustancia del pico 5 RH2180-5 que muestra, en cuanto a los valores de la MIC para MSSA, 6,3 µg/ml en la Tabla 4 y 5 µg/ml en la Tabla 3; pero en cuanto al resultado del estudio del efecto terapéutico para el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* en ratón (ED₅₀) que se mencionará con posterioridad, su valor de la ED₅₀ es aproximadamente un tercio de la vancomicina, confirmando así un elevado efecto terapéutico.

20 Incluso aunque los valores de la MIC de 5 µg/ml y 6 µg/ml están en el nivel del valor de la MIC mostrado por la bacteria resistente en vancomicina, el compuesto péptido cíclico de la presente invención muestra un adecuado efecto terapéutico y una razón para esto puede ser porque los compuestos de la presente invención expresan la actividad antibacteriana mediante un mecanismo de acción diferente de los fármacos existentes, que probablemente refleja el efecto terapéutico. Si la actividad antibacteriana es expresada mediante un mecanismo de acción diferente de los fármacos existentes, la frecuencia de separación de la cepa resistente se espera que sea bajo al menos en este momento, por lo que esto puede ser considerado como un aspecto ventajoso del compuesto péptido cíclico de la presente invención.

25 Ejemplo de Ensayo 3

30 Estudio del efecto terapéutico y la toxicidad de la sustancia del pico 5 RH2180-5 en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* en ratón (en lo sucesivo, este modelo se escribe como "modelo de ratón" para abreviar)

La cepa de Smith de *Staphylococcus aureus* se puso en suspensión en 7% de mucina + citrato de amonio-férrico 0,2 mM, y se administraron $6,2 \times 10^6$ (20xLD₅₀) de la misma en la cavidad peritoneal de 5 ratones por grupo (ICR hembra de cuatro semanas de edad). Cada fármaco se inyectó por vía hipodérmica 2 horas después de la administración de la bacteria mediante el método mostrado a continuación.

35 Para este modelo de ratón se inyectó por vía hipodérmica la sustancia del pico 5 RH2180-5 disuelta en PBS de manera que su cantidad resultara 25 mg/kg, 12,5 mg/kg y 6,3 mg/kg; y seguidamente se estudió su efecto terapéutico (ED₅₀) midiendo los umbrales de supervivencia 1 día después de la administración (5 ratones por grupo). Análogamente, se estudió la ED₅₀ de vancomicina para el modelo de ratón usado esta vez. En el caso de la sustancia del pico 5 RH2180-5, la supervivencia de la totalidad de los ratones se confirmó con la administración de 40 25 mg/kg bajo la condición no supervivencia con administración de PBS. En este caso, los valores de ED₅₀ se obtuvieron mediante el método probit.

45 Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. La sustancia del pico 5 RH2180-5 muestra el efecto terapéutico para el modelo de ratón con un valor de ED₅₀ de 0,6 mg/kg, que es claramente inferior a la ED₅₀ de la vancomicina simultáneamente estudiada (1,6 mg/kg), confirmando así se produce una sustancia antibiótica que tiene un elevado efecto terapéutico para *Staphylococcus aureus*.

Tabla 5

Efecto terapéutico en el modelo de infección de *Staphylococcus aureus* en ratón

Muestra	ED ₅₀ (mg/kg)
Pico 5 RH2180-5	0,6
Vancomicina	1,6

5 Cada fármaco fue inyectado por vía hipodérmica dos horas después de que se administraran $6,2 \times 10^6$ ($20 \times LD_{50}$) de cepa Smith de *S. aureus* en la cavidad peritoneal de un ratón (ICR hembra de cuatro semanas de edad).

10 Además, la sustancia del pico 5 RH2180-5 fue inyectada por vía hipodérmica al ratón para estudiar la toxicidad aguda de la sustancia del pico 5 RH2180-5 para el ratón mediante observación 1 día después de la administración. En la toxicidad aguda, no se observó ninguna toxicidad (el ratón no murió) hasta la administración de una cantidad de 50 mg/kg que corresponde a 80 veces el valor ED₅₀, la concentración más elevada en el estudio y, por tanto, esto sugirió que la sustancia del pico 5 RH2180-5 tiene una baja toxicidad.

15 A partir de los resultados anteriores, se pudo confirmar que la sustancia del pico 5 RH2180-5 antibiótica (P5) de la presente invención producida a partir de RH2180-5 muestra un excelente valor de la ED50 para *Staphylococcus aureus* en comparación con vancomicina, mostrando por tanto un elevado efecto terapéutico y, además, a partir de los resultados del estudio de la actividad antibacteriano mediante MIC, se pudo confirmar que la sustancia tiene unas excelentes características de mostrar eficacia no solamente para MRSA, que es altamente problemática clínicamente, sino también para VRE, que se espera que resulte problemática análogamente a MRSA desde ahora.

20 Además, 8 de cada 9 compuestos que tenían una constitución básica de la estructura de péptidos de la presente invención que se aislaron y purificaron a partir de un cultivo de RH2180-5 (el espectro antibacteriano de la sustancia del pico 1 no fue estudiado) mostraron casi los mismos valores de la MIC que las cepas resistentes a múltiples fármacos y para las cepas no adquirió propiedades similares de resistencia a múltiples fármacos (Tabla 4) por lo que se pudo confirmar que los compuestos que tienen una constitución básica de la estructura de péptidos de la presente invención pueden ser usados como un fármaco terapéutico antiinfeccioso eficaz, especialmente para bacterias resistentes a múltiples fármacos.

Ejemplo de Ensayo 4

25 Estudio del espectro antibacteriano de la sustancia del pico 5 RH2180-5

30 Se estudió el espectro antibacteriano de la sustancia del pico 5 RH2180-5 que antecede respecto a diversos microorganismos que incluyen MRSA y VRE. Se midió cada valor de la MIC para el caso de adición de suero sanguíneo al 10% y para el caso de no adición del mismo mediante el método de microdilución de caldos basado en la entidad CLSI (anteriormente NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards). Los resultados del mismo se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Microorganismos	MIC (µg/ml)	
	Sin suero	Con suero al 10%
Methicillin susceptible <i>S. aureus</i> MSSA1(clinical isolate)	3,1	1,5
Methicillin resistant <i>S. aureus</i> MRSA3(clinical isolate)	12,5	1,5
Methicillin resistant <i>S. aureus</i> MRSA4(clinical isolate)	12,5	1,5
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith ATCC 13709	6,25	1,5
<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	12,5	6,3
Vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecalis</i> EF5	12,5	6,3
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	25	ND
<i>Bacillus subtilis</i> JCM2499	6,3	1,5
<i>Bacillus cereus</i> JCM20037	3,1	0,8
<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	6,3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ND	25
<i>Streptococcus sanguinis</i> JCM5678	ND	100
<i>Streptococcus agalactiae</i> JCM5671	ND	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ND	50
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	7,8	3,9
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	7,8	15,6
<i>Serratia marcescens</i> (clinical isolate)	>100	>50
<i>Escherichia coli</i> W3110	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	>100	>50
<i>Salmonella enterica</i>	>100	ND
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	>100	>100
<i>Candida tropicalis</i> pK233	>100	>100
<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	>100	>100

ND: No determinado

A partir de los resultados de la Tabla 6, se podría confirmar que la sustancia del pico 5 RH2180-5 es eficaz para bacterias gram-positivas y aumenta su actividad mediante la adición de suero sanguíneo.

Ejemplo de Ensayo 5

Estudio de la actividad antibacteriano de la sustancia del pico 5 RH2180-5

5 En un medio de cultivo CA-Mueller Hinton se introdujeron $1,8 \times 10^8$ *Staphylococcus aureus*, y seguidamente se le añadieron la sustancia del pico 5 RH2180-5 que antecede (25 µg/ml), vancomicina (VM, 5 µg/ml), y gentamicina (GM, 2,5 µg/ml) y seguidamente se obtuvieron los números de células supervivientes después de 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos como CFU (Unidades Formadoras de Colonias/ml). Los resultados del mismo se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Tiempo (minutos)	CFU/ml de <i>S. aureus</i>			
	Sustancia del pico 5 RH2180-5 (25µg/ml)	VM (5 µg/ml)	GM (2,5 µg/ml)	Testigo (sin fármaco)
0				$1,8 \times 10^8$
15	$<1 \times 10^4$	$8,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	
30	$<1 \times 10^4$	$4,9 \times 10^7$	$7,6 \times 10^5$	
60	$<1 \times 10^4$	$6,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^5$	
120	$<1 \times 10^4$	$3,4 \times 10^7$	$4,0 \times 10^5$	

*VM: Vancomicina; GM: Gentamicina

10 A partir de los resultados de la Tabla 7, se pudo confirmar que el número de *Staphylococcus aureus* disminuyó inmediatamente después de la adición de la Sustancia del pico 5 RH2180-5 en comparación con la adición vancomicina y gentamicina.

15 Además, se encontró a partir de este resultado y otros que la fracción que contiene sustancia antibiótica obtenida mediante fraccionamiento de un cultivo que es producido cultivando el microorganismo con nº de acceso NITE BP-870 y, además, un agente de protección microbiana que contiene la sustancia antibiótica obtenida a partir de su cultivo son útiles. Se encontró que no solamente es útil un agente de protección microbiana que contiene la sustancia del pico 5 RH2180-5 es útil, sino que son análogamente útiles también un agente de protección microbiana que contiene incluso otras sustancias de los picos o la fracción antes del aislamiento de una sustancia como la sustancia.

20 Ejemplo de Ensayo 6

Estudio de la actividad bacteriolítica de la sustancia del pico 5 RH2180-5

25 Se diluyó *Staphylococcus aureus* en un medio de caldo CA-Mueller Hinton y seguidamente se le añadieron la sustancia del pico 5 RH2180-5, vancomicina y daptomicina siendo sus concentraciones cinco veces mayores las del Ejemplo del Ensayo 1 y seguidamente el microorganismo se cultivó a 37 °C. Usando un espectrómetro de absorción (fabricado por la entidad Shimadzu Corp.), se siguió la absorvancia a 600 nm (OD_{600}) después de su adición con el paso del tiempo. Los resultados del mismo se muestran en la Fig. 11.

A partir de los resultados de la Fig. 11, se pudo confirmar que la sustancia del pico 5 RH2180-5 muestra la actividad bacteriolítica porque la disminución de la absorvancia (OD_{600}) de la misma es mayor en comparación con vancomicina y daptomicina.

30 Ejemplo 3

Producción de formulación de la sustancia del pico 5 Rh2180-5

Formulación de comprimidos

35 Después de que se mezclaron uniformemente 20,0 mg de sustancia del pico 5 RH2180-5, 40 mg de lactosa, 20 mg de almidón y 5 mg de hidroxipropil-celulosa con bajo grado de sustitución, se prepararon gránulos para comprimidos mediante un método de granulación en húmedo usando 8% en peso de una solución acuosa de hidroxipropil-celulosa como material aglutinante. A esto se añadió 0,5 a 1 mg de estearato de magnesio, cantidad suficiente para proporcionar propiedades de deslizamiento a los gránulos y, seguidamente, se formaron los comprimidos por medio

de una máquina formadora de comprimidos.

Formulación de la solución

Se prepararon para inyección disolviendo 10,0 mg de sustancia del pico 5 RH2180-5 en 10 ml de 2% en peso de solución acuosa de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

5 Ejemplo de Examen 3

Análisis de 16S rRNA

Se amplificaron bases de 16S rRNA de RH2180-5 mediante un método de PCR de colonias y, seguidamente, los fragmentos de RNA amplificados se analizaron mediante un secuenciador. Como consecuencia, se determinó la secuencia de bases correspondiente a la longitud casi completa de la región de 16S rRNA mostrada en la secuencia nº 1, excepto para algunas bases en el lado terminal 5' y el lado terminal 3'. Seguidamente, se realizó una búsqueda de homología con una cepa existente perteneciente al género *Lysobacter* usando NCBI BLAST relativa a esta secuencia de bases. Como consecuencia, el RH2180-5 mostró una tasa de homología de 99% con relación a la cepa DSM 2043T de *Lysobacter enzymogenes* existente y, por tanto, se consideró que RH2180-5 es un microorganismo perteneciente a un género *Lysobacter*.

15 Con respecto RH2180-5

El RH2180-5 tiene muchas similitudes de propiedades químicas respecto a la cepa DSM 2043T de *Lysobacter enzymogenes*, pero los espectros antibacterianos de las sustancias fisiológicamente activas producidas son diferentes. Además, los compuestos que son una estructura principal de las sustancias fisiológicamente activas son "la sustancia del pico 5 RH2180-5 y sus compuestos relacionados que tienen una función farmacéutica útil" que tienen una constitución básica de la estructura de péptidos cíclicos no descritos con anterioridad y, por tanto, son completamente diferentes en este aspecto. Esto plantea una diferencia significativa con la cepa existente. Consecuentemente, considerando los resultados anteriores, se estimó que el RH2180-5 era un microorganismo perteneciente a un género *Lysobacter*.

Aplicación industrial

25 El nuevo compuesto péptido de la presente invención muestra eficacia para bacterias resistentes a múltiples fármacos como MRSA y VRE, que se convierten en un grave problema clínico y, por tanto, este puede ser usado como un nuevo fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa. Además, la cepa del microorganismo de la presente invención puede ser usada adecuadamente para fabricar el compuesto péptido cíclico útil que antecede.

30 Además, la presente invención tiene una aplicación industrial para una nueva fracción que contiene sustancia antibiótica, una sustancia antibiótica contenida en la misma y un método para fabricar dicha fracción que contiene sustancia antibiótica y la sustancia antibiótica útil obtenida a partir de la misma.

Nº de acceso

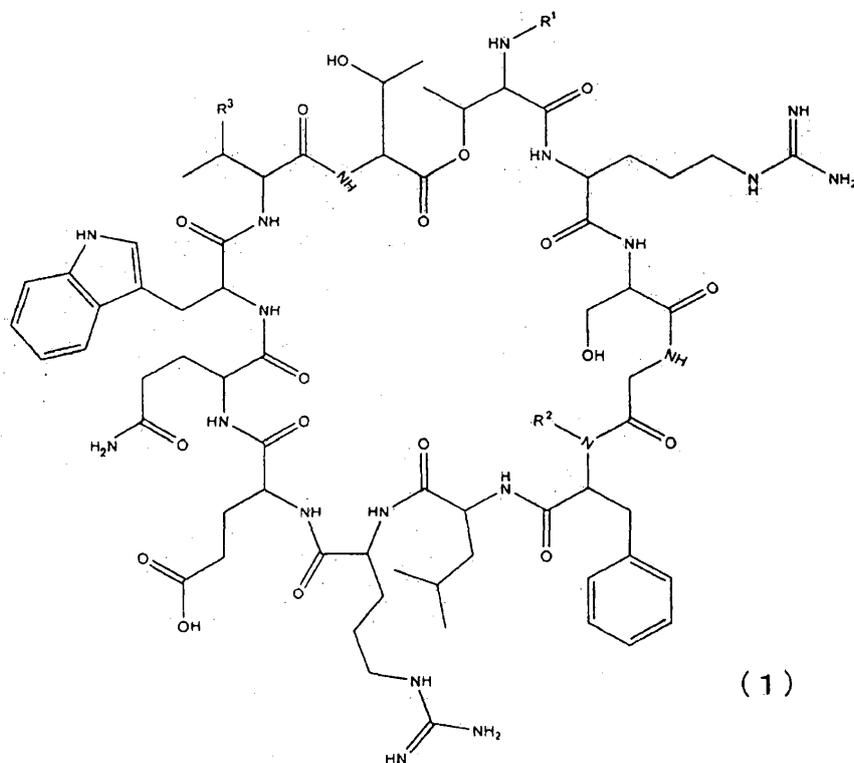
NITE BP-870

Texto libre del gráfico de secuencias

35 El gráfico de secuencias nº 1 muestra la secuencia de bases de la longitud casi completa de 16S rRNA para una cepa desconocida perteneciente al género *Lysobacter*.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de péptido cíclico mostrado mediante la siguiente fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



5

en la R^1 representa un grupo acilo que tiene 7, 8 ó 9 átomos de carbono y que contiene opcionalmente un grupo sustituyente; R^2 representa un grupo metilo o un átomo de hidrógeno y R^3 representa un grupo etilo o un grupo metilo.

10 2. El compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 1, en el que el grupo sustituyente de R^1 en la fórmula (1) anterior es un grupo hidroxilo, o en el que R^1 en la fórmula (1) anterior es un grupo 3-hidroxi-5-metil-hexanoilo, un grupo 3-hidroxi-6-metil-heptanoilo, o un grupo 3-hidroxi-7-metil-octanoilo o en el que la fórmula (1) anterior R^1 es un grupo 3-hidroxi-5-metil-hexanoilo, R^2 es un grupo metilo y R^3 es un grupo etilo o en el que en la fórmula (1) anterior R^1 es un grupo 3-hidroxi-7-metil-octanoilo, R^2 es un grupo metilo y R^3 es un grupo etilo.

15 3. Un método para fabricar el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable es fabricado a partir de un cultivo que es producido cultivando la cepa RH2180-5, que es capaz de producir el compuesto péptido cíclico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y pertenece al género *Lysobacter* con n° de acceso NITE BP-870 en la entidad de depósito NITE Patent Microorganisms Depository (NPMO) de la Incorporated
20 Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (NITE) o su cepa mutante, capaz de producir un compuesto similar al compuesto producido a partir de la cepa que antecede.

4. Un fármaco terapéutico para una enfermedad infecciosa, en que el fármaco terapéutico contiene el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según cualquier las reivindicaciones 1 a 2, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

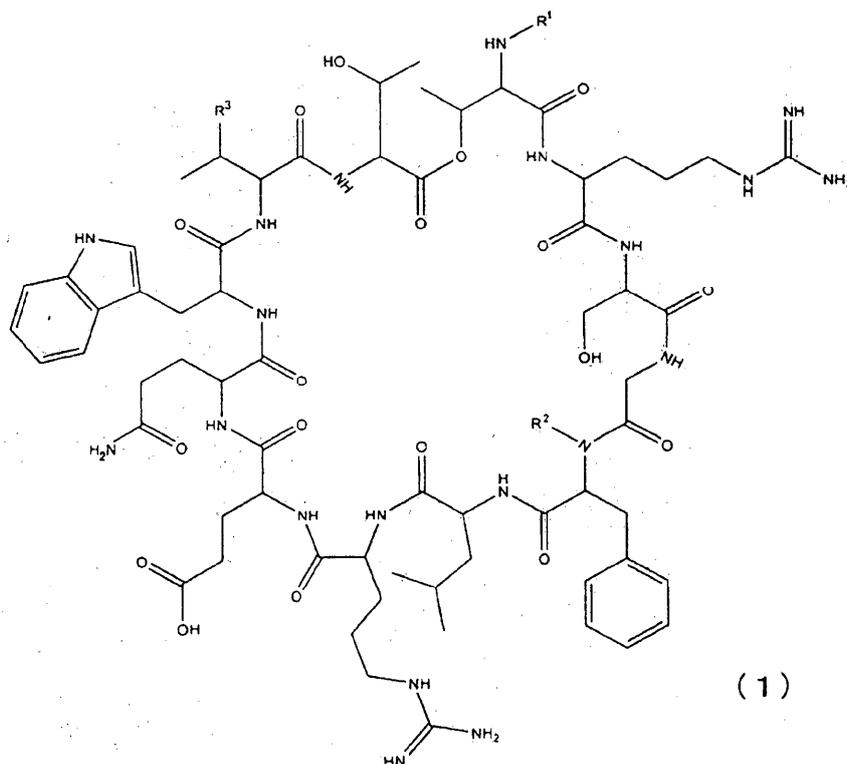
25 5. Una sustancia antibiótica, caracterizada porque la sustancia antibiótica es obtenida a partir de un cultivo que es producido cultivando un microorganismo perteneciente a un género *Lysobacter* con n° de acceso NITE BP-870 y contiene el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

30 6. La sustancia antibiótica según la reivindicación 5, en que la sustancia antibiótica muestra una actividad antibacteriana al menos para *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) y *Enterococcus* resistente a

vancomicina (VRE).

7. La sustancia antibiótica según la reivindicación 5 ó 6, en que la sustancia antibiótica muestra un efecto terapéutico para una enfermedad infecciosa al menos debida a *Staphylococcus aureus*.

5 8. La sustancia antibiótica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en que la sustancia antibiótica es mostrada mediante la siguiente fórmula (1)



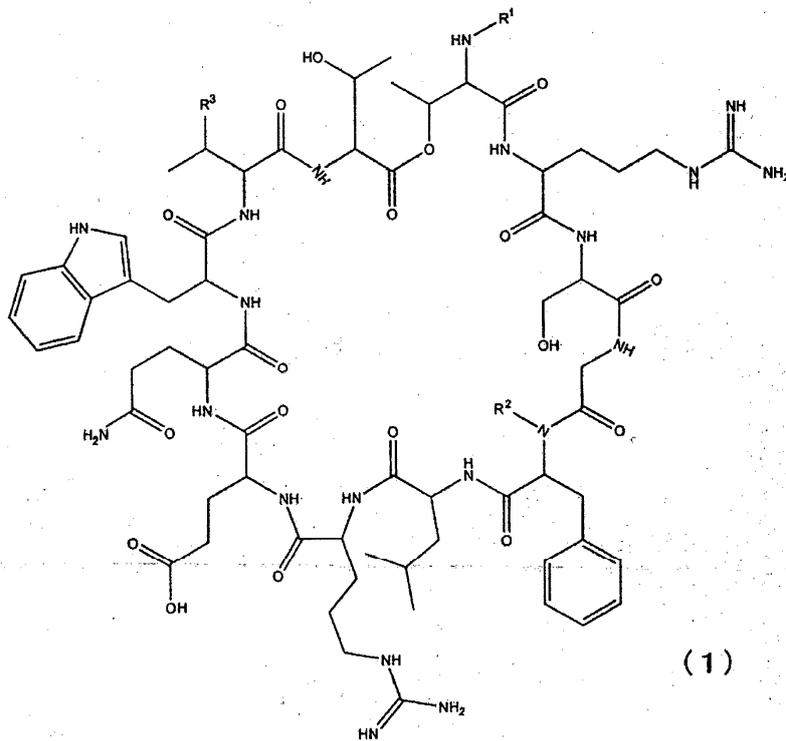
en la R^1 representa un grupo acilo que tiene 7, 8 ó 9 átomos de carbono y que contiene un grupo hidroxilo; R^2 representa un grupo metilo o un átomo de hidrógeno y R^3 representa un grupo etilo o un grupo metilo.

10 9. Un agente antimicrobiano, caracterizado porque el agente de protección microbiana contiene el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 1 ó 2.

10. Un microorganismo, en que el microorganismo pertenece a un género *Lysobacter* con nº de acceso NITE BP-870 o es un microorganismo mutado de forma natural o artificial del mismo y es capaz de producir el compuesto péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se define en la reivindicación 1 ó 2.

15 11. El microorganismo según la reivindicación 10, en que el microorganismo tiene la secuencia de bases de la región de 16S rRNA mostrada mediante la secuencia nº 1 en el gráfico de secuencias.

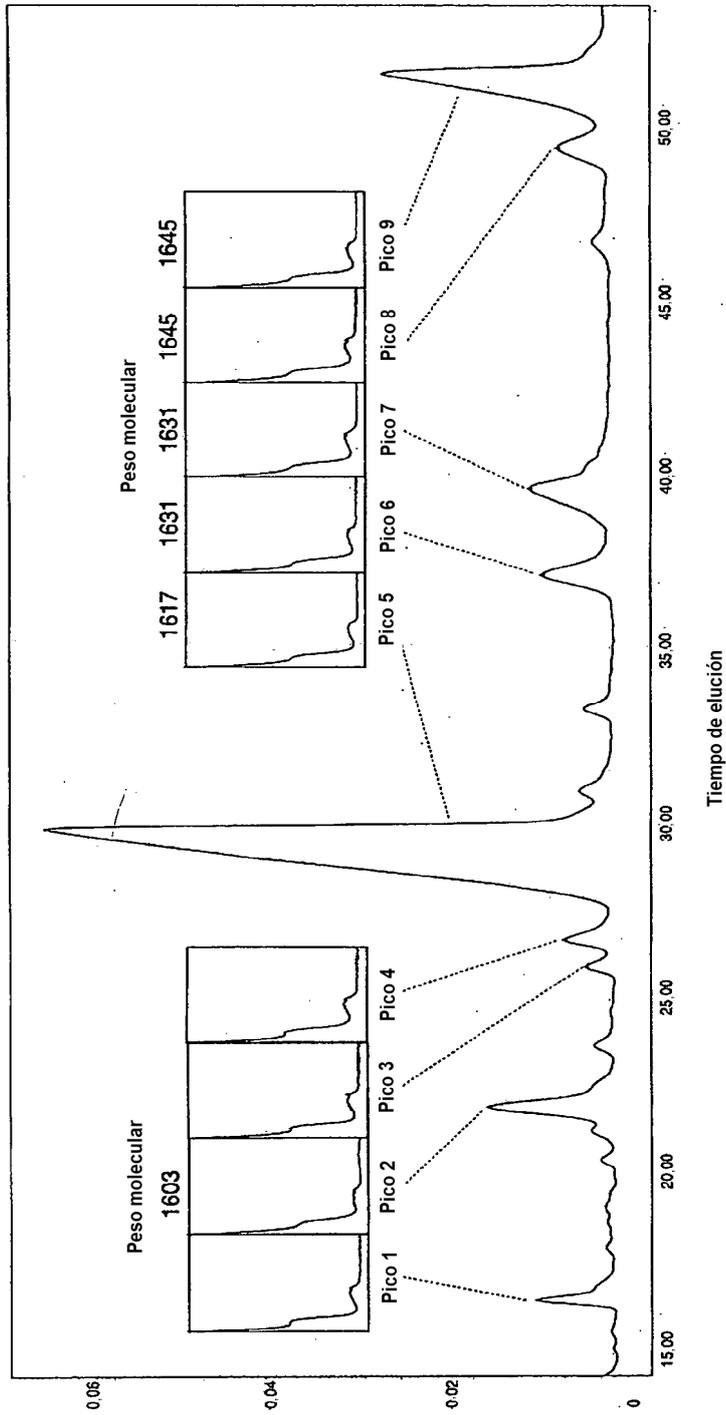
12. Un compuesto péptido cíclico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se determina en la reivindicación 1 ó 2, o un agente que comprende dicho compuesto péptido cíclico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para ser usado en el tratamiento de una enfermedad infecciosa.



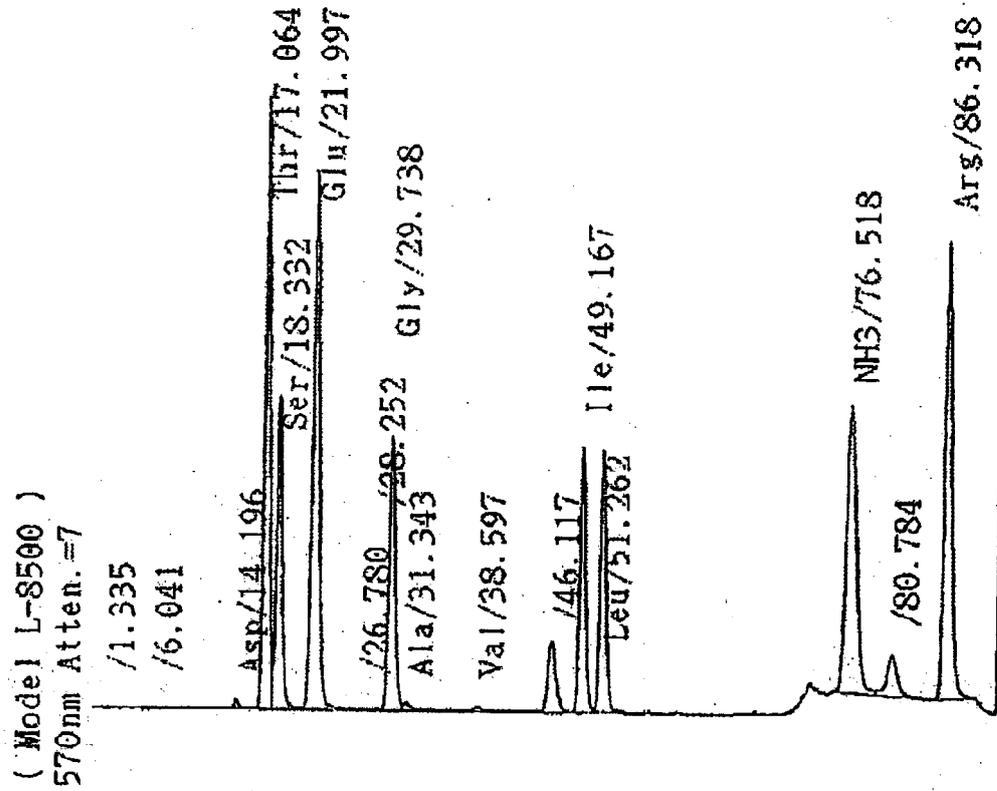
(1)

(En la fórmula (1), R^1 representa un grupo acilo que tiene 7, 8 ó 9 átomos de carbono y que contiene opcionalmente un grupo sustituyente; R^2 representa un grupo metilo o un átomo de hidrógeno y R^3 representa un grupo etilo o un grupo metilo).

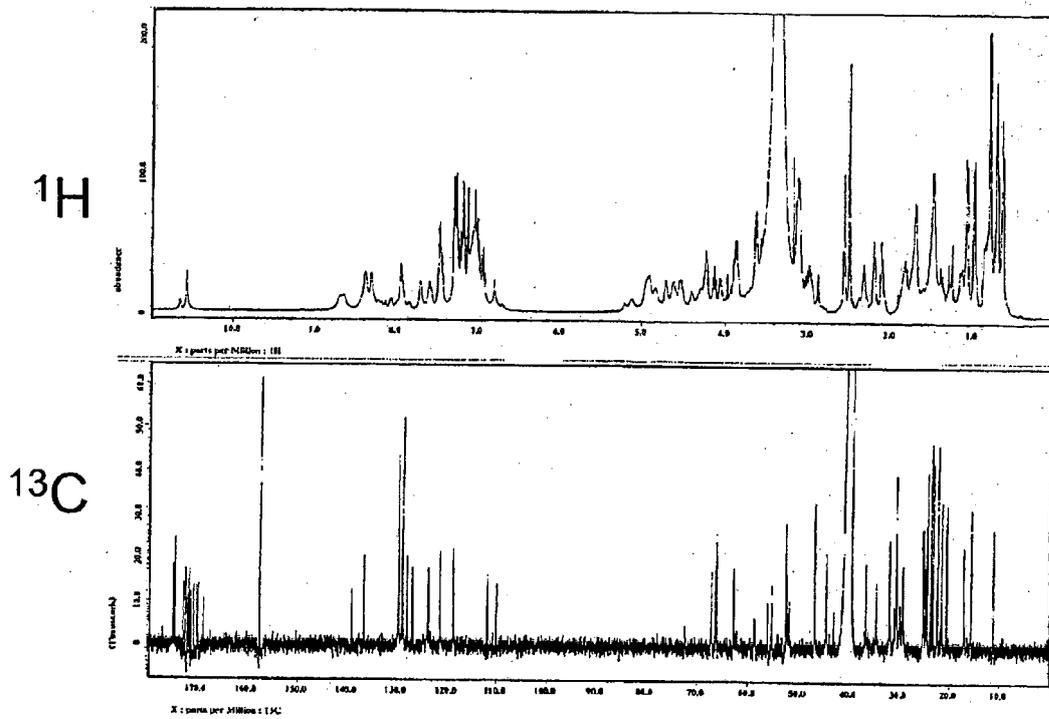
[Fig. 1]



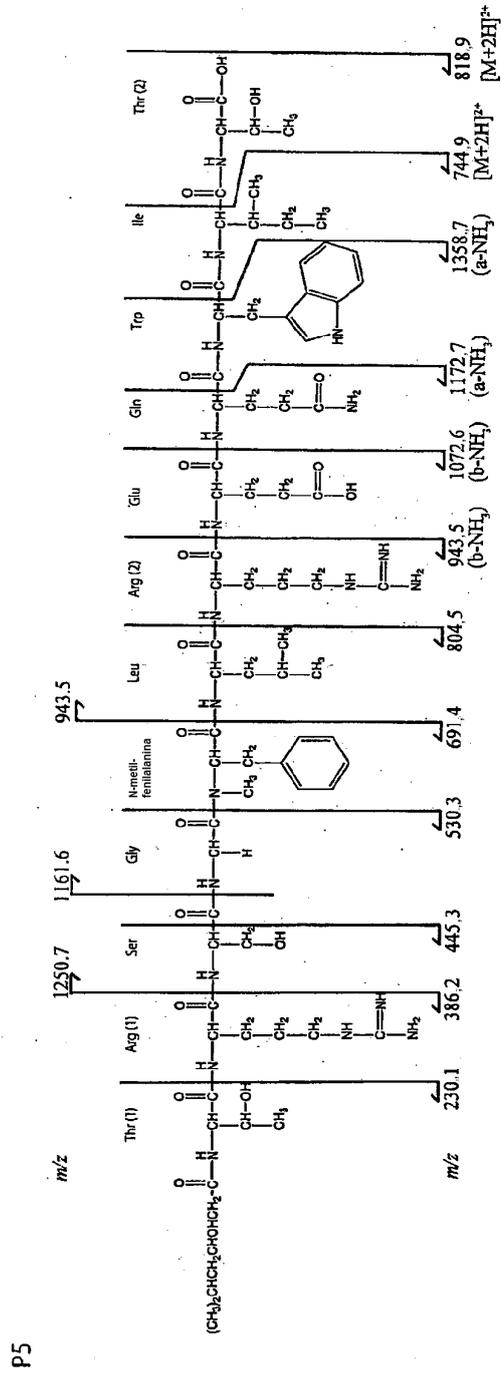
[Fig. 2]



[Fig. 3]

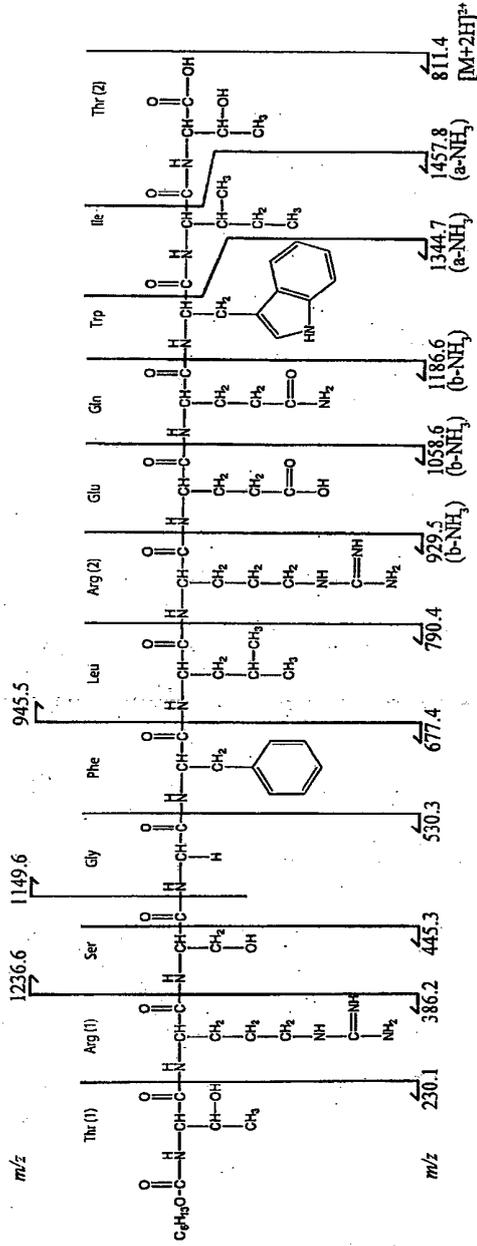


[Fig. 4]

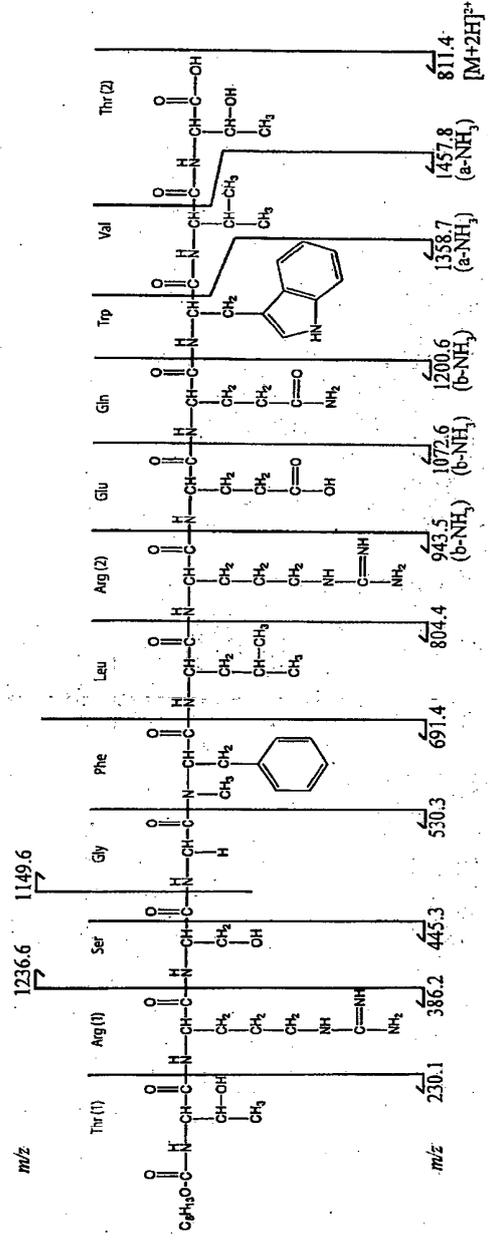


[Fig. 5]

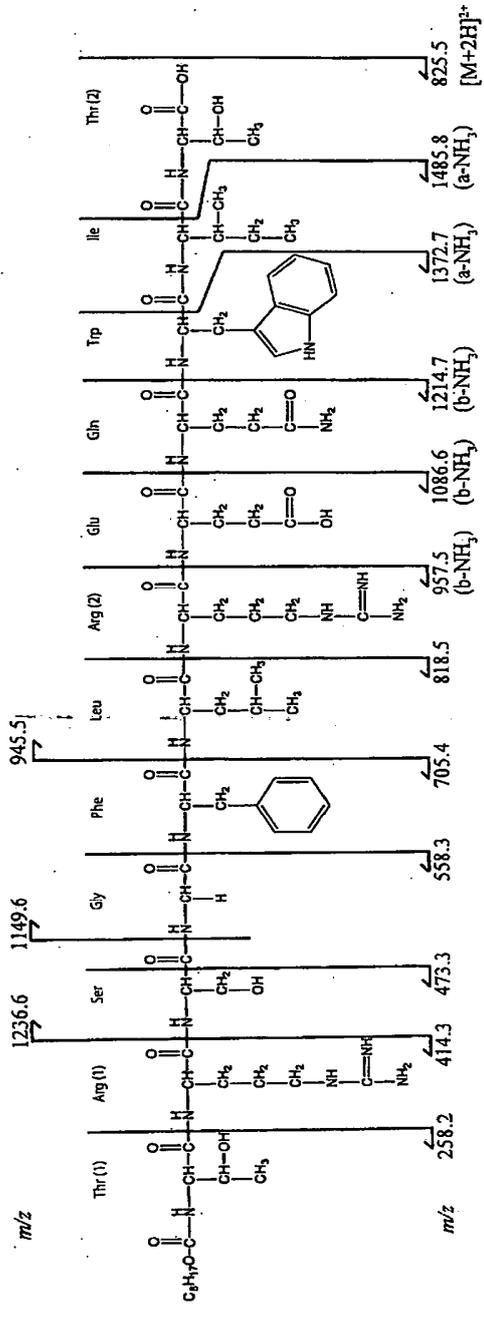
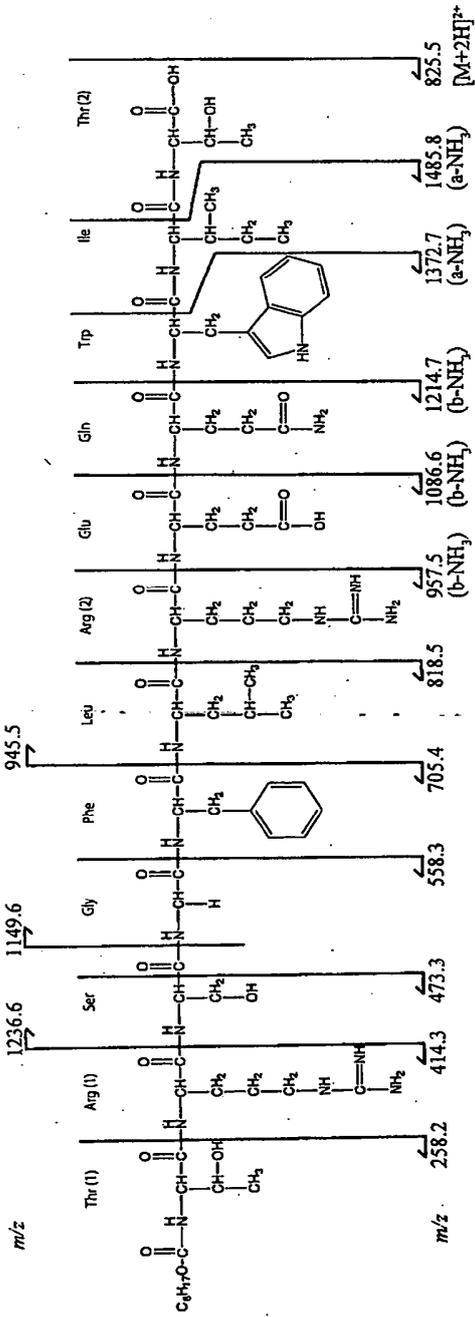
P1



P2



[Fig. 6]

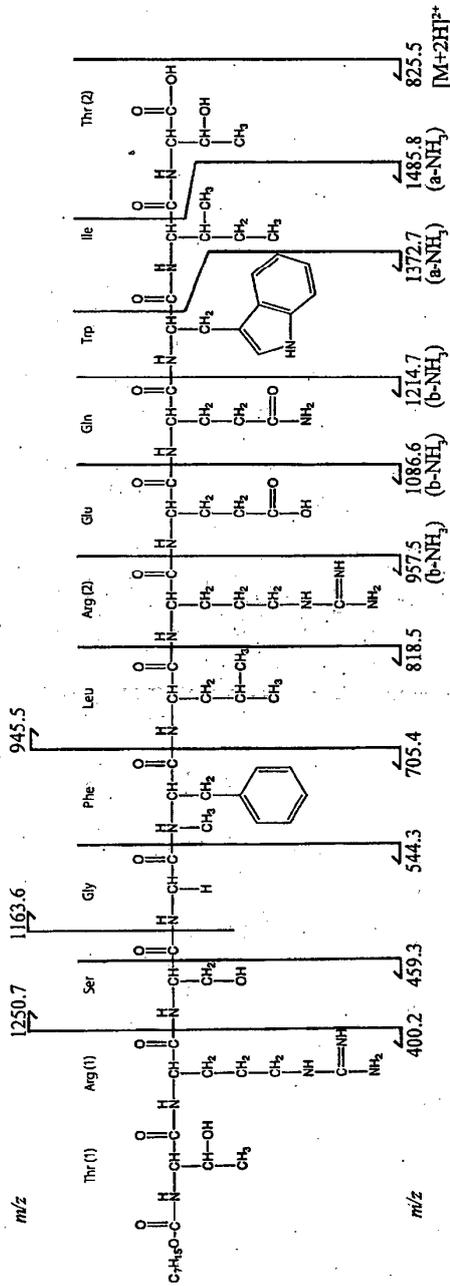


P3

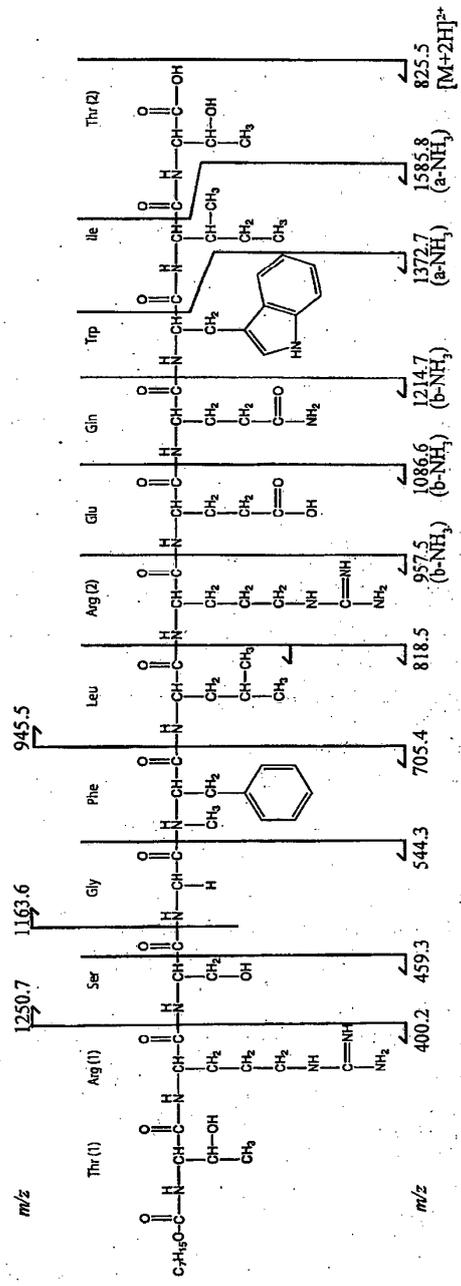
P4

[Fig. 7]

P6

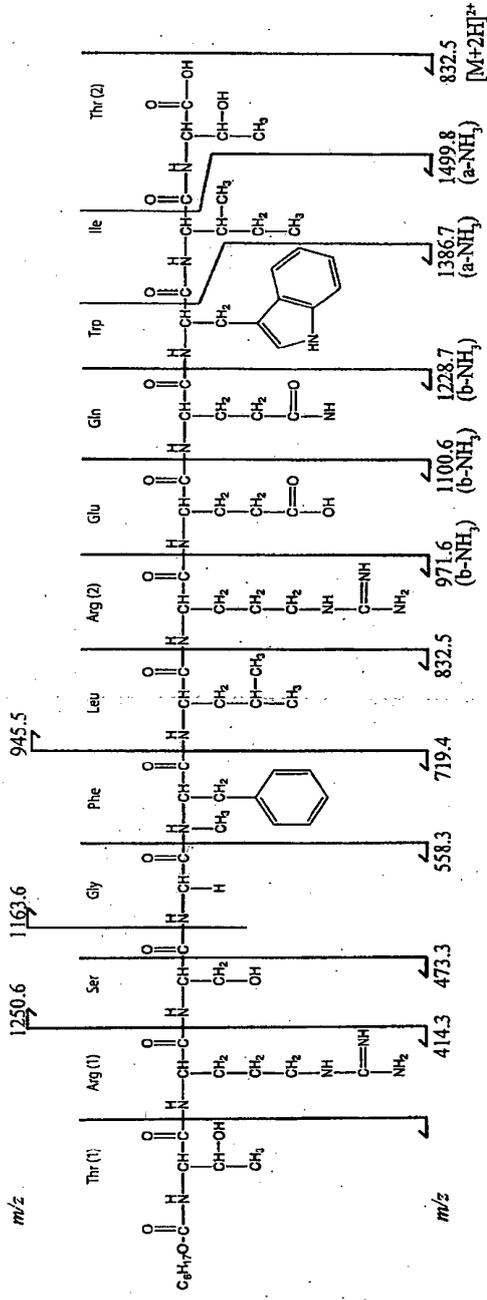


P7

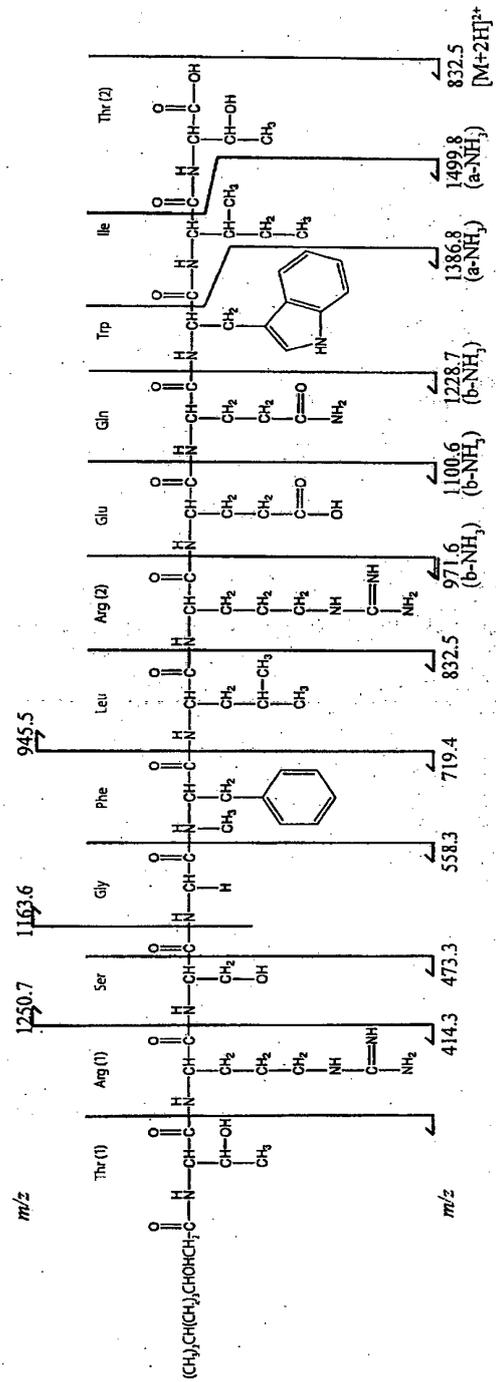


[Fig. 8]

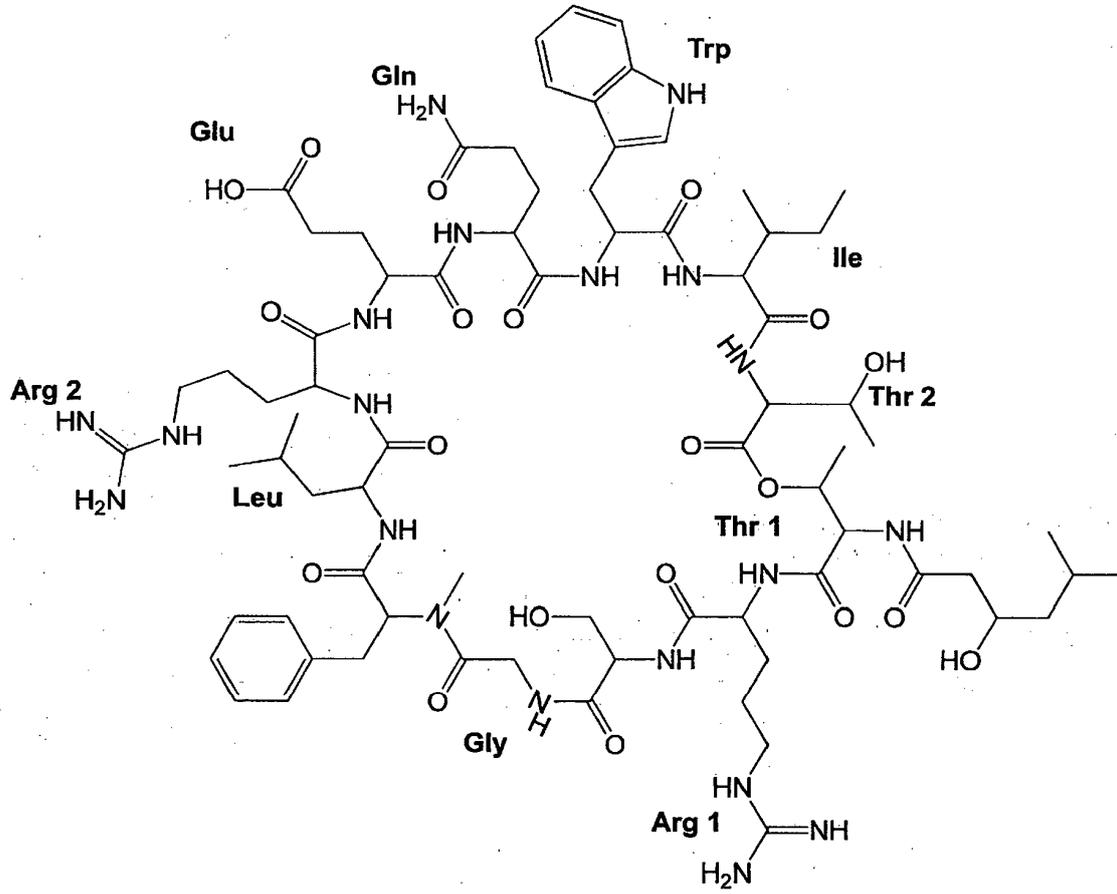
P8



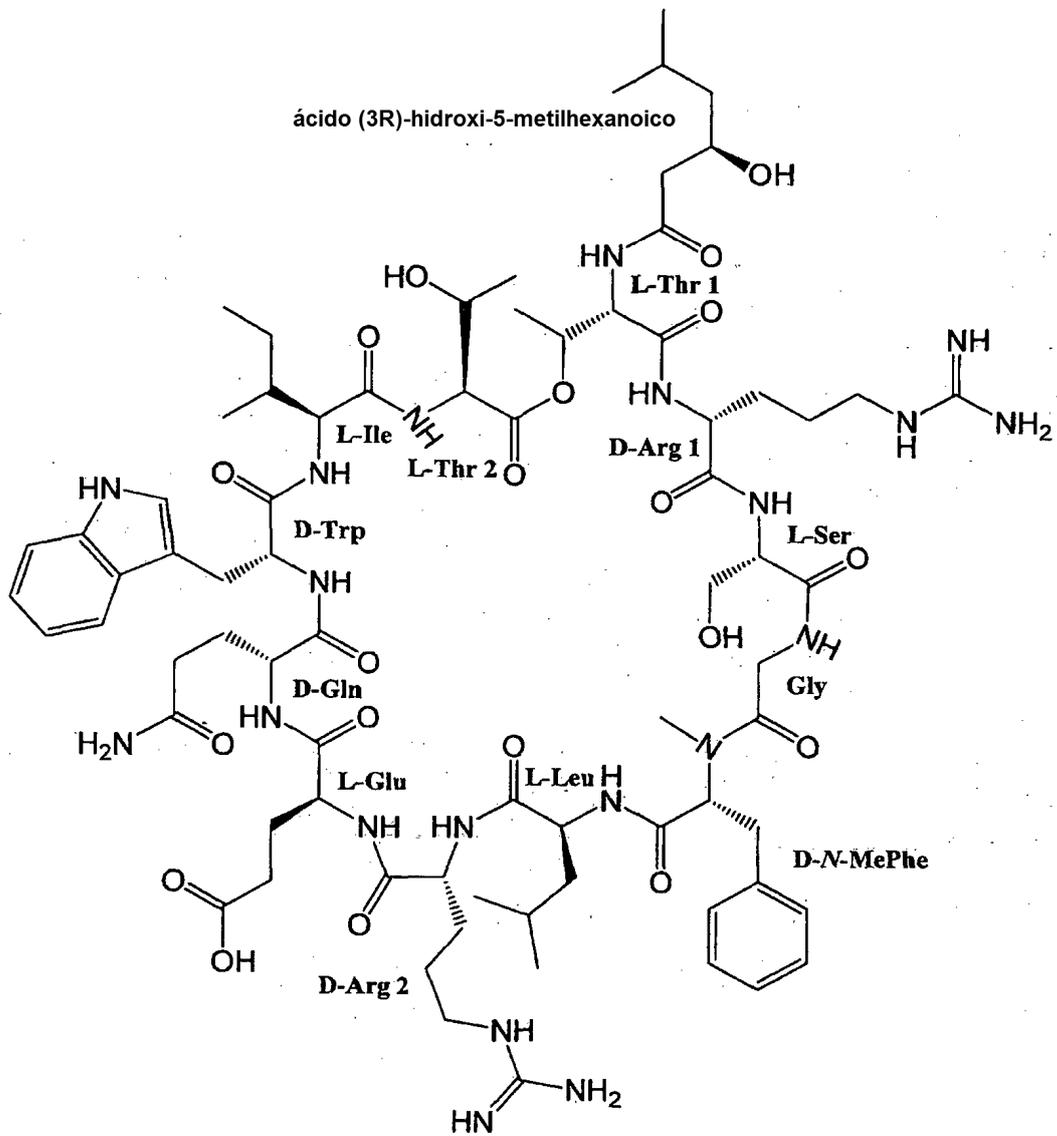
P9



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

