

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 207**

51 Int. Cl.:

**C07H 15/234** (2006.01)

**C12P 19/48** (2006.01)

**A61K 31/7036** (2006.01)

**C12R 1/465** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2008 E 08854513 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2226388**

54 Título: **Antibiótico aminoglucósido novedoso, método para producir el mismo, y uso farmacéutico del mismo**

30 Prioridad:

**30.11.2007 JP 2007310618**

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

**24.05.2016**

73 Titular/es:

**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (100.0%)  
4-16, Kyobashi 2-Chome, Chuo-Ku  
Tokyo-To, JP**

72 Inventor/es:

**SUMIDA, NAOMI;  
YANAI, KOJI;  
TANI, MASATO;  
FUKUSHIMA, TAKAYOSHI;  
OTA, YASUMASA;  
GOMI, SHUICHI y  
NAKANE, AKITAKA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 571 207 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

Antibiótico aminoglucósido novedoso, método para producir el mismo, y uso farmacéutico del mismo

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud se basa en y reivindica el beneficio de prioridad de la anterior solicitud de patente japonesa No. 310618/2007, presentada el 30 de noviembre, 2007.

10 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a antibióticos aminoglucósidos novedosos, un proceso para producir los mismos, y el uso farmacéutico de los mismos.

15 **Antecedentes técnicos**

Los antibióticos aminoglucósidos son un término genérico para antibióticos glucósidos que contienen aminoazúcar o aminociclitol y excluye un grupo de antibióticos tal como macrólidos, nucleósidos, y antraciclinas. Hasta ahora, se han descubierto un número de antibióticos aminoglucósidos a partir del cultivo de actinomicetes o bacterias. Entre ellos, se han usado estreptomina, neomicina, kanamicina, gentamicina, ribostamicina, tobramicina y similares como agentes quimioterapéuticos útiles. Por otra parte, el uso extendido de estos antibióticos aminoglucósidos en la práctica clínica ha conducido a un problema de la aparición de bacterias resistentes a antibióticos aminoglucósidos.

Las kanamicinas (kanamicina A, kanamicina B, y kanamicina C) son antibióticos aminoglucósidos producidos por *Streptomyces kanamyceticus*. Las kanamicinas tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Sin embargo, puesto que muchas bacterias infecciosas se vuelven rápidamente resistentes a kanamicinas, en los últimos años, la adaptación clínica de las kanamicinas está limitada a enfermedades, principalmente tuberculosis.

En kanamicinas, se han desarrollado derivados de kanamicina tales como dibekacinas, amicacinas, y arbekacinas eficaces también contra bacterias resistentes basándose en estudios sobre un mecanismo resistente. Sin embargo, están apareciendo bacterias resistentes a estos agentes. En tales circunstancias, se ha esperado el desarrollo de antibióticos aminoglucósidos novedosos que sean eficaces contra bacterias resistentes y puedan reducir la nefrotoxicidad que es un problema común a los antibióticos aminoglucósidos.

Respecto a antibióticos aminoglucósidos que comprenden 2-desoxiestreptamina como un azúcar constituyente, se han hecho estudios sobre la producción de antibióticos aminoglucósidos novedosos obteniendo una cepa mutante que produce un antibiótico aminoglucósido de forma dependiente de 2-desoxiestreptamina, añadiendo un análogo de 2-desoxiestreptamina a la cepa mutante, y cultivando la mezcla. También en kanamicinas hay un artículo en que se producen antibióticos diferentes de kanamicinas obteniendo una cepa mutante que tiene un fenotipo de producción de kanamicina dependiente de 2-desoxiestreptamina, añadiendo 2-epiestreptamina a la cepa mutante, y cultivando la mezcla (documento US 3.669.838). Además, hay un artículo en el que se produce 4-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)6-O-(3-amino-3-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil)1-N-metil-2-desoxiestreptamina o 4-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)6-O-(3-amino-3-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil)2-epi-estreptamina añadiendo 1-N-metil-desoxiestreptamina o mioinosadamina-1,3(2-epiestreptamina) a una cepa mutante que tiene un fenotipo de producción de kanamicina dependiente de 2-desoxiestreptamina y cultivando la mezcla (Kojima, M. y Satoh, A., "Journal of Antibiotics", (Japón), 1973, Vol. 26, p. 784-786). Además, hay un artículo en el que se producen 4-O-(6-amino-6-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil)6-O-(3-amino-3-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil)estreptamina (LL-BM27 $\alpha$ ) y 4-O-(6-amino-6-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil)6-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)estreptamina (LL-BM27 $\beta$ ) añadiendo estreptamina a una cepa mutante que tiene un fenotipo de producción de kanamicina dependiente de 2-desoxiestreptamina y cultivando la mezcla (Borders, D.B. et al., "Journal of Antibiotics", (Japón), 1982, Vol. 35, p. 1107-1110). Aquí LL-BM27 $\alpha$  es sinónimo de 2-hidroxikanamicina A.

Las cantidades de antibióticos aminoglucósidos producidos por la adición de las sustancias y el cultivo de la mezcla son tan pequeñas que la aplicabilidad industrial de los antibióticos aminoglucósidos es baja. Según esto, se puede decir que todavía se requieren antibióticos aminoglucósidos novedosos que sean clínicamente útiles y tengan potente actividad antimicrobiana.

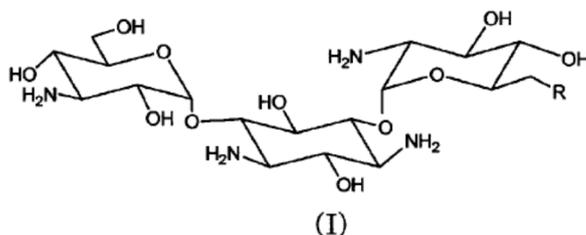
**Compendio de la invención**

Los presentes inventores han encontrado ahora que se pueden producir antibióticos aminoglucósidos novedosos que tienen potente actividad antimicrobiana cultivando una cepa productora de kanamicina derivada del género Streptomycin junto con un análogo específico de 2-desoxiestreptamina. La presente invención se ha hecho basada en tal descubrimiento.

Según esto, un objeto de la presente invención es proporcionar novedosos agentes antibióticos aminoglucósidos que poseen potente actividad antimicrobiana y un proceso para producir los mismos.

Según la presente invención, se proporcionan antibióticos aminoglucósidos que son compuestos representados por la fórmula (I) o sus sales farmacológicamente aceptables.

5 [Fórmula química 1]



en donde R representa amino o hidroxilo.

10 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para producir compuestos representados por la fórmula (I), el proceso comprende cultivar una cepa productora de kanamicina del género *Streptomyces* en un medio que comprende estreptamina y/o mioinositol para producir el compuesto.

15 Los compuestos según la presente invención tienen potente actividad antimicrobiana contra bacterias causantes de varias enfermedades infecciosas y se puede utilizar ventajosamente en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Además, el proceso de producción según la presente invención puede suministrar de forma sencilla y estable los compuestos anteriores.

## 20 Descripción detallada de la invención

### Depósito

25 La cepa *S. Kanamyceticus*-DOS según la presente invención se ha depositado con el Depositario de Organismos de Patente Internacional, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (dirección: Tsukuba Central 6 Tsukuba-shi, Higashi 1-1-1, Ibaraki, 305-8566 Japón) (fecha del depósito original: 1 de noviembre, 2007) con el número de acceso FERM BP-11052.

### Definición

30 El término "2-hidroxikanamicina A" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que tiene hidroxilo introducido en la posición 2 de kanamicina A. El término "2-hidroxikanamicina" se refiere a un grupo de compuestos que tienen hidroxilo introducido en la posición 2 de kanamicinas (kanamicina A, kanamicina B y kanamicina C). Específicamente, el grupo de compuestos incluye 2-hidroxikanamicina A, 2-hidroxikanamicina B, y 2-hidroxikanamicina C.

Además, la cepa productora de kanamicina, como se usa en el presente documento, que es "dependiente de desoxiestreptamina" se refiere a una cepa mutante, entre las bacterias que producen kanamicina, que puede restablecer la capacidad de producir kanamicinas añadiendo desoxiestreptamina.

40 El polipéptido "que tiene actividad funcionalmente equivalente a" o "que tiene actividad funcionalmente equivalente" como se usa en el presente documento se refiere a los siguientes polipéptidos.

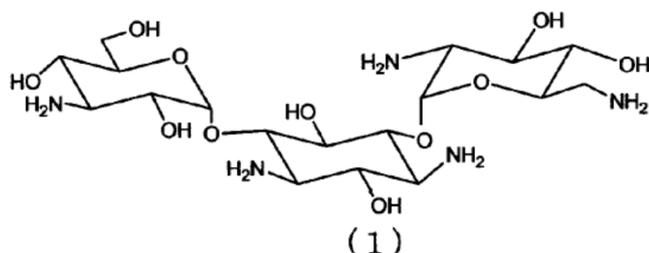
45 En el polipéptido, además de polimorfismos o mutantes de genes que codifican el polipéptido, se pueden producir mutantes estructurales en una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por una reacción de modificación. Sin embargo, se sabe que algunos polipéptidos, a pesar de la presencia de estos mutantes, tienen sustancialmente la misma actividad fisiológica y biológica que los polipéptidos que no tienen mutantes. El polipéptido que, a pesar de la diferencia estructural, no tiene una gran diferencia en función se denomina un polipéptido "que tiene actividad funcionalmente equivalente".

### Compuestos representados por la fórmula (I) o sus sales farmacológicamente aceptables

50 Un rasgo característico de los compuestos representados por la fórmula (I) según la presente invención es que se ha introducido hidroxilo en la posición 2 de kanamicina B o C. Los compuestos que tienen la estructura tienen un amplio espectro antimicrobiano que varía desde bacterias gram positivas a bacterias gram negativas incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y tienen potente actividad antimicrobiana.

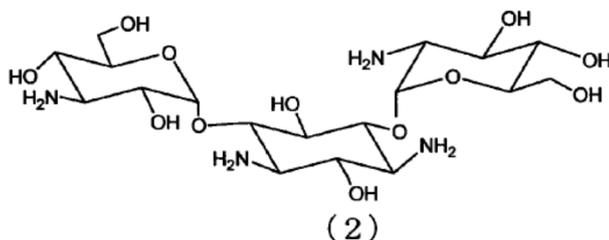
Según una forma de realización de la presente invención, en los compuestos representados por la fórmula (I), R representa amino. Este compuesto (de aquí en adelante denominado "hidroxikanamicina B") tiene una estructura representada por la fórmula (1).

5 [Fórmula química 2]



10 Según otra forma de realización de la presente invención, en los compuestos representados por la fórmula (I), R representa hidroxilo. Este compuesto (de aquí en adelante denominado "2-hidroxikanamicina C") tiene una estructura representada por la fórmula (2).

[Fórmula química 3]



15 Los compuestos representados por la fórmula (I) pueden estar presentes como sales. Tales sales incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos específicos de las mismas incluyen halhidratos tal como, fluorhidratos, clorhidratos, bromhidratos, o yodhidratos, sales de ácidos inorgánicos tal como sulfatos, fosfatos, percloratos, o carbonatos, sales de ácidos carboxílicos tal como ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido hidroxiacético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido butírico, ácido maleico, ácido propiónico, ácido fórmico, o ácido málico, sales de aminoácidos tal como ácido algínico, ácido aspártico o ácido glutámico, o sales de ácido sulfónico tal como ácido metanosulfónico o ácido p-toluenosulfónico. Se prefieren halhidratos tal como clorhidratos y sales de ácidos inorgánicos tal como sulfatos.

20

25

#### Cepas productoras

30 Los compuestos representados por la fórmula (I) se pueden producir por varios métodos. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, los compuestos representados por la fórmula (I) se pueden producir cultivando una cepa productora de kanamicina del género *Streptomyces* en un medio que comprende estreptamina y/o mioinositol.

35 Los ejemplos de tales cepas productoras adecuadas incluyen cepas productoras de kanamicina dependientes de desoxiestreptamina. Más preferidas son cepas del género *Streptomyces* en donde se ha inactivado 2-desoxi-escilo-inososa sintasa que cataliza una primera reacción en la biosíntesis de 2-desoxiestreptamina a partir de ácido glucosa-6-fosfórico. Es sorprendente que, cuando tales cepas de cultivan junto con un análogo de desoxiestreptamina, los compuestos según la presente invención se pueden producir selectivamente sin producir kanamicinas.

40 Según esto, según aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona una cepa productora de kanamicina del género *Streptomyces* capaz de producir compuestos representados por la fórmula (I) en donde se ha inactivado 2-desoxi-escilo-inososa sintasa.

45 La cepa productora mutante se puede obtener, por ejemplo, tratando bacterias productoras de kanamicina que derivan del género *Streptomyces* incluyendo *Streptomyces kanamyceticus*, por ejemplo, por métodos de mutación artificial incluyendo irradiación ultravioleta (UV) o nitroguanidina (NTG). La obtención de la cepa mutante deseada se puede confirmar, por ejemplo, obteniendo una cepa productora de kanamicina dependiente de desoxiestreptamina, después midiendo la actividad de 2-desoxi-escilo-inososa sintasa intracelular en cada cepa mutante por un método

convencional (Kudo, F. et al., "Journal of Antibiotics", (Japón), 1999, Vol. 52, p. 81-88), y seleccionando una cepa mutante que no tenga actividad enzimática.

Respecto a la cepa productora de kanamicina en la se ha inactivado 2-desoxi-escilo-inososa sintasa, los genes que codifican 2-desoxi-escilo-inososa sintasa ya se han esclarecido (Solicitud de patente japonesa disponible al público No. 173537/2004). Según esto, también se puede obtener una cepa mutante deseada por tecnología de recombinación génica. Por ejemplo, una cepa mutante deseada se puede obtener destruyendo un gen que codifica 2-desoxi-escilo-inososa sintasa. Además, la cepa mutante también se puede obtener preparando un gen mutante que tiene una sustitución de aminoácido que proporciona 2-desoxi-escilo-inososa sintasa inerte, y sometiendo el gen mutante a sustitución génica con un gen de tipo salvaje en un cromosoma. El gen se puede destruir o sustituir por métodos comúnmente usados en *Actinomyces* ("Practical *Streptomyces* Genetics", "The John Innes Foundation", (Inglaterra), Norwick, 2000, p. 311-338).

Por ejemplo, se puede mencionar una mutación en la que el ácido aspártico en la posición 136 de la secuencia de aminoácidos de la sintasa representada por SEQ ID No. 1 se sustituye por asparraguinas como un ejemplo de mutación por la cual se inactiva 2-desoxi-escilo-inososa sintasa. Según esto, la cepa que puede producir el compuesto representado por la fórmula (I) se puede obtener integrando un gen que codifica un polipéptido que tiene la mutación o un gen que codifica un análogo funcionalmente equivalente al polipéptido en una cepa.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la cepa productora de kanamicina capaz de producir el compuesto representado por la fórmula (I) es la cepa en la que se ha integrado un gen que codifica un polipéptido seleccionado de los siguientes polipéptidos (a) a (c):

- (a) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 1 que tiene una mutación en la que el ácido aspártico en la posición 136 se ha cambiado a asparraguina,
- (b) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en (a) en donde uno o más aminoácidos se han sustituido, deletado, añadido o insertado, el polipéptido tiene una actividad funcionalmente equivalente al polipéptido definido en (a), y
- (c) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene homología del 80% o más con la secuencia de aminoácidos definida en (a), el polipéptido tiene una actividad funcionalmente equivalente al polipéptido definido en (a).

Se puede mencionar *S. Kanamyceticus-DOS* como un ejemplo de cepas productoras de kanamicina adecuadas correspondientes a (a).

En (b), el "uno o más aminoácidos" es preferiblemente de 1 a 40 aminoácidos, más preferiblemente de 1 a 8 aminoácidos, aún más preferiblemente de 1 a 4 aminoácidos.

En (d), la homología es preferiblemente no menos del 90%, más preferiblemente no menos del 95%.

Además, cuando se considera la producción estable del compuesto representado por la fórmula (I), preferiblemente, el polipéptido descrito en (b) o (c) tiene una mutación en la que el ácido aspártico en la posición 136 en la secuencia de aminoácidos descrita en (a) o en una posición correspondiente a la posición 136 se ha cambiado a asparraguina. La presencia o ausencia de la mutación en la secuencia de aminoácidos descrita en (a) a (c) y la determinación de la homología de secuencia las puede determinar apropiadamente un experto en la materia comparando la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 1 con la secuencia de aminoácidos en (a) a (c) por un método convencional.

La equivalencia funcional entre el polipéptido descrito en (b) o (c) y el polipéptido descrito en (a) se puede confirmar midiendo la actividad 2-desoxi-escilo-inososa sintasa para ambos polipéptidos según el método descrito anteriormente descrito en Kudo, F. et al., "Journal of Antibiotics", (Japón), 1999, Vol. 52, p. 81-88 y comparando los resultados medidos. Además, la equivalencia funcional se puede confirmar indirectamente midiendo la dependencia de desoxiestreptamina o actividad antimicrobiana de la cepa productora de kanamicina con genes que codifican los polipéptidos integrados en la misma por un método descrito en el ejemplo 2 o el ejemplo de prueba 1 y comparar estadísticamente los resultados medidos.

#### Proceso de producción

Como se ha descrito anteriormente, el compuesto representado por la fórmula (I) según la presente invención se puede producir cultivando una cepa productora de kanamicina derivada del género *Streptomyces* en un medio que comprende un análogo de 2-desoxiestreptamina seleccionado de estreptamina y mioinositol.

Cuando se considera la producción selectiva del compuesto representado por la fórmula (I), como se ha descrito anteriormente, la cepa productora de kanamicina derivada del género *Streptomyces* es preferiblemente una cepa productora de kanamicina en la que se ha inactivado 2-desoxi-escilo-inososa sintasa. Sin embargo, también se puede usar una cepa productora de kanamicina en la que 2-desoxi-escilo-inososa sintasa no se ha inactivado. Los

ejemplos de cepas adecuadas en las que 2-desoxi-escilo-inososa sintasa no se ha inactivado incluyen *Streptomyces kanamyceticus*.

5 Además, en el proceso de producción según la presente invención, una combinación de la cepa productora de kanamicina con el análogo de 2-desoxiestreptamina añadido al medio se puede determinar apropiadamente considerando el tipo de compuesto contemplado deseado.

10 Según una forma de realización de la presente invención, la cepa productora de kanamicina es una donde se ha inactivado 2-desoxi-escilo-inososa sintasa, y el medio comprende estreptamina. Según esta forma de realización, el compuesto representado por la fórmula (I) se puede producir junto con 2-hidroxikanamicina A. Esto es ventajoso en que se pueden producir 2-hidroxikanamicinas (2-hidroxikanamicinas A a C) simultáneamente. Además, según otra forma de realización de la presente invención, la cepa productora de kanamicina es una en la que se ha inactivado 2-desoxi-escilo-inososa sintasa, y el medio comprende mioinositol. Según esta forma de realización, se puede producir selectivamente 2-hidroxikanamicina C, que es un compuesto representado por la fórmula (I) en donde R representa hidroxilo.

15 La cantidad de adición de estreptamina o mioinositol puede variar apropiadamente dependiendo de las condiciones de cultivo, pero es preferiblemente de 100 a 50.000 µg/ml, más preferiblemente de 1.000 a 10.000 µg/ml.

20 Se pueden añadir apropiadamente sustancias convencionales como ingredientes del medio en el proceso de producción según la presente invención.

25 Los ingredientes del medio distintos de estreptamina y mioinositol utilizables en el presente documento incluyen, por ejemplo, fuentes de carbono tal como glucosa, sacarosa, jarabes de almidón, dextrinas, almidones, glicerol, jarabes, aceites animales y vegetales; y fuentes de nitrógeno tal como harinas de soja, aceites de germen de trigo, licores de maceración de maíz, tortas de semillas de algodón, extractos de carne, polipeptona, extractos de malta, extractos de levadura, sulfato de amonio, nitrato de sodio, y urea. Además, si es necesario, la adición de sodio, potasio, magnesio, cobalto, cloro, ácido fosfórico (por ejemplo, hidrogenofosfato dipotásico), ácido sulfúrico (por ejemplo, sulfato de magnesio) y sales inorgánicas que pueden producir otros iones también es eficaz. Además, si es necesario, también se pueden añadir varias vitaminas tal como tiaminas (por ejemplo, clorhidrato de tiamina), ácido glutámico (por ejemplo, glutamato de sodio), aminoácidos tal como asparraguina (por ejemplo, DL-asparraguina), micronutrientes tal como nucleótidos, y fármacos seleccionados tal como antibióticos. Además, se pueden añadir apropiadamente sustancias orgánicas e inorgánicas que ayudan al crecimiento de las bacterias y fomentan la producción de 2-hidroxikanamicina B y 2-hidroxikanamicina C.

35 El medio preferiblemente tiene aproximadamente de pH 5,5 a pH 9.

El cultivo se puede llevar a cabo por cultivo sólido, cultivo con agitación, cultivo con agitación aireado, o cultivo aerobio profundo en condiciones aerobias. Entre ellos, el cultivo aerobio profundo es preferido.

40 Por ejemplo, de 15°C a 40°C es adecuado como la temperatura de cultivo. En muchos casos, sin embargo, las bacterias se hacen crecer a una temperatura de aproximadamente 25°C a 35°C.

45 La cantidad del compuesto representado por la fórmula (I) producido varía dependiendo del medio, condiciones de cultivo, y método de cultivo usados, pero alcanza el máximo, por ejemplo, de 2 días a 15 días.

Preferiblemente, cuando la cantidad del compuesto representado por la fórmula (I) en el medio ha alcanzado el máximo, el cultivo se para. El compuesto se recoge luego del cultivo y se purifica.

50 Para recoger el compuesto de la presente invención del cultivo, se puede usar un medio de separación convencional que utiliza las propiedades del compuesto. El medio de separación puede ser, por ejemplo, extracción en solvente, métodos de resina de intercambio iónico, cromatografía en columna de adsorción o reparto, filtración en gel, diálisis, precipitación, y cristalización, sea solas o en combinación apropiada. Por ejemplo, el cultivo se filtra para dar un filtrado. El filtrado se adsorbe después en una resina de intercambio catiónico tal como Amberlite IRC-50 o Amberlite FPC3500, y la elución se lleva a cabo con amoniaco acuoso. El eluato se purifica además con una resina de intercambio catiónico tal como Dowex 50W o Amberlite CG-50 y si es necesario se purifica por cromatografía de exclusión iónica con Dowex 1 o por cromatografía de adsorción con HP20ss, por lo cual se puede aislar cada 2-hidroxikanamicina representada por la fórmula (I).

#### 60 Uso

Los compuestos según la presente invención tienen potente actividad antimicrobiana y son útiles para la administración como medicinas a animales incluyendo el ser humano. Por tanto, según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables. La composición se usa preferiblemente como un agente antimicrobiano.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto representado por la fórmula (I) o su sal farmacológicamente aceptable, en la fabricación de una composición farmacéutica.

- 5 Según aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un agente antimicrobiano.

10 Cuando el compuesto según la presente invención se usa como una composición farmacéutica, la composición farmacéutica se puede formular según varias formas farmacéuticas o formas de uso por métodos convencionales. Las preparaciones farmacéuticas para la administración oral incluyen comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, polvos, formulaciones líquidas, suspensiones, jarabes y agentes sublinguales. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen inyecciones, agentes transdérmicos, inhalantes, y supositorios. En la formulación se usan apropiadamente aditivos farmacéuticos tal como tensioactivos, excipientes, estabilizantes, agentes humectantes, disgregantes, ayudas de disolución, agentes de ajuste de tonicidad, tampones, colorantes, y agentes saborizantes.

15 Se pueden usar soportes farmacéuticamente aceptables como el soporte para la composición farmacéutica. El tipo y composición del soporte se puede determinar apropiadamente según las rutas de administración y métodos de administración. Por ejemplo, los soportes líquidos utilizables en el presente documento incluyen agua, alcoholes, aceites de soja, y aceites de sésamo. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen azúcares tal como maltosa y sacarosa, sales de aminoácidos tal como lisina, polisacáridos tal como ciclodextrina, sales de ácido orgánico tal como estearato de magnesio, y derivados de celulosa tal como hidroxipropilcelulosa.

20 Los compuestos según la presente invención que tienen actividad antimicrobiana preferiblemente se usan en el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas. Según esto, según un aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan compuestos para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I) o su sal farmacológicamente aceptable a un animal incluyendo un ser humano.

25 El término "tratamiento" como se usa en el presente documento significa aliviar un estado de enfermedad establecido, y el término "prevención" como se usa en el presente documento significa prevenir el establecimiento de un estado de enfermedad en el futuro.

30 Los compuestos según la presente invención se pueden aplicar a bacterias causantes de varias enfermedades infecciosas. Las bacterias causantes de enfermedades infecciosas incluyen, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, o *Acinetobacter*. Se prefiere *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, o *Pseudomonas aeruginosa*.

35 Cuando el compuesto representado por la fórmula (I) es 2-hidroxikanamicina B, las bacterias causantes de enfermedades infecciosas son preferiblemente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, o *Acinetobacter*, más preferiblemente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, o *Acinetobacter*, aún más preferiblemente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, o *Acinetobacter*.

40 Cuando el compuesto representado por la fórmula (I) es 2-hidroxikanamicina C, las bacterias causantes de enfermedades infecciosas son preferiblemente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, o *Acinetobacter*, más preferiblemente *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, o *Acinetobacter*, aún más preferiblemente *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, o *Acinetobacter*.

45 La dosis eficaz del compuesto según la presente invención la pueden determinar apropiadamente los médicos considerando las condiciones particulares, por ejemplo, la edad, peso, tipo y gravedad de los pacientes, y vía de administración. Cuando el compuesto se administra por vía oral a un ser humano, por ejemplo, el compuesto se puede administrar, por ejemplo, a una dosis de 0,01 a 1000 mg/kg por adulto al día. Por otra parte, cuando el compuesto se administra por vía intravenosa, el compuesto se puede administrar a una dosis de 0,001 a 100 mg/kg por adulto al día.

### 60 Ejemplos

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que no se pretenden como una limitación de la invención.

En los siguientes ejemplos, los análisis por LC/MS se llevaron a cabo en las siguientes condiciones.

### 65 Condiciones para análisis por LC/MS

(Parte de HPLC: Waters 2690)

Coulmna: Capcell Pak C18 MG, 4,6 x 150 mm, 5 µm (fabricada por Shiseido Company, Limited)

Fase móvil: A: solución de ácido pentafluoropropiónico acuoso al 0,2%

5 B: Acetonitrilo

C: H<sub>2</sub>O

Gradiente lineal: 0 min (A/B/C = 10/10/80) → 15 min (A/B/C = 10/30/60)

Velocidad de flujo; 0,4 ml/min, temp.: 30°C

10 (Parte MS: Waters ZQ) Método ESI

Temp. fuente de iones: 100°C

Temp. desolvatación: 380°C

Flujo de gas de desolvatación: 350 l/h

flujo de gas de cono: 50 l/h

15 Diferencia de potencial capilar: 3,5 kV

Diferencia de potencial del cono: positiva: 30 V

Ejemplo 1: Construcción del plásmido pDDOI para la introducción de la mutación del gen de la 2-desoxi-escilinososa sintasa (orf11) de *Streptomyces kanamyceticus*

20 Respecto a la 2-desoxi-escilinososa sintasa (SEQ ID No. 1), el ácido aspártico en la posición 136 conservado como un residuo de aminoácido importante para la unión al sustrato, ácido glucosa-6-fosfórico, se cambió a asparraguina para inactivar la proteína enzima. La preparación se llevó a cabo por una reacción de PCR usando pKM9 (véase la solicitud de patente japonesa accesible al público No. 173537/2004, ejemplo 2, FERM P-19117) como molde.

Se muestra una región de grupo biosintético de kanamicina utilizada en SEQ ID No. 2.

30 Se usaron los siguientes cebadores, es decir, un cebador que incluye un sitio de digestión Hind III o Xba I y un cebador que se había diseñado de modo que el ácido aspártico (GAT) en la posición 136 desde el codón de iniciación de un gen de DOI sintasa se mute a asparraguina (AAC),

Km-Mu-Hind III

5'-GGGAAGCTTGACCTTGGAGGTATGTGT-3' (SEQ ID No. 3)

35 Km-Mu-L

5'-GTTCAGCGATGGCCACCACGGTGGT-3' (SEQ ID No. 4)

(La parte subrayada representa la parte introducida de la mutación)

Km-Mu-R

5'-TCGGTGCTCTCGCTCAAGCAG-3' (SEQ ID No.: 5)

40 Km-Mu-Xba I

5'-GGGTCTAGATGCCGTCCTGGTGGTAGT-3' (SEQ ID No.: 6)

45 Se llevó a cabo una reacción de PCR usando una combinación de cebadores Km-Mu-Hind III (SEQ ID No. 3) con Km-Mu-L (SEQ ID No. 4) y una combinación de cebadores de Km-Mu-R (SEQ ID No. 5) con Km-Mu-Xba I (SEQ ID No. 6). La reacción se llevó a cabo usando aproximadamente 1 µg de ADN genómico, 0,3 µM de cada cebador, y ADN polimerasa KOD plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) en condiciones de 94°C/2 min (94°C/15 s, 50°C/30 s, y 68°C/1,5 min) x 25 ciclos. Como resultado, se amplificaron específicamente fragmentos de ADN de aproximadamente 1,5 kpb. Los fragmentos de ADN se purificaron mediante un kit de purificación de PCR QIAquick (fabricado por QIAGEN K.K.). El extremo romo se fosforiló (fabricado por NIPPON GENE CO., LTD), y los fragmentos de ADN fosforilados se digirieron con Hind III y Xba I, seguido por clonación en los sitios Hind III y Xba I de pUC119. Se analizó la secuencia de bases de los fragmentos de ADN clonados. Como resultado, se pudo confirmar que los fragmentos de ADN contenían un gen de 2-desoxi-escilinososa sintasa (orf11) (SEQ ID No. 7) con la sustitución contemplada por asparraguina insertada en el mismo.

55 El plásmido pSET152 (Bierman, M. et al., "Gene", (Países Bajos), 1992, Vol. 116, p. 43-49) para transferencia por conjugación de *Actinomyces* se digirió con Sph I y se hizo romo con ADN polimerasa de T4. Un enlazador Hind III (fabricado por TAKARA SHUZO CO., LTD.) se unió después al mismo para construir pSET153. Un fragmento de aproximadamente 2,8 kpb Hind III-Xba I derivado de pSET153 se unió a un fragmento Hind III-Xba I de aproximadamente 3 kpb que contenía el gen sometido a sustitución de aminoácidos para obtener el plásmido pDDOI para la introducción de la mutación génica orf11 que tenía una capacidad de transferencia por conjugación.

Ejemplo 2: Creación de una cepa no productora de desoxiestreptamina por el plásmido pDDOI para la introducción de la mutación génica orf11

Se recubrió *Streptomyces kanamyceticus* que es una bacteria productora de kanamicina sobre un medio agar MS (harina de soja al 2%, manitol al 2%, agar al 2%) y se cultivó a 28°C durante 3 días. Después del cultivo, se rasparon las hifas con 3 ml de glicerol al 20% y se recogieron para preparar un líquido de hifa de un huésped.

5 Por otra parte, la cepa de *E. coli* (*Escherichia coli*) ET12567/pUZ8002 que tiene el plásmido pDDOI se inoculó en 100 ml de un medio LB líquido (Bacto triptona de Difco al 1%, extracto de levadura de Difco al 0,5%, NaCl al 0,5% y glucosa al 0,1%) que contenía 25 µg/ml de cloranfenicol, 25 µg/ml de kanamicina, y 50 µg/ml de apramicina y se cultivó a 37°C durante la noche para preparar un precultivo. El cultivo se inoculó en el mismo medio líquido que el precultivo de modo que la concentración final del precultivo era el 1%, seguido por cultivo a 37°C durante aproximadamente 4 horas. El cultivo se lavó dos veces con un medio LB líquido y por último se resuspendió en 10 ml de un medio LB líquido para preparar un líquido de *E. coli*.

15 El líquido de las hifas del huésped (500 µl) preparado anteriormente y 500 µl del líquido de *E. coli* se mezclaron para la recogida. Las bacterias recogidas se cubrieron después sobre un medio MS agar con MgCl<sub>2</sub> añadido de modo que la concentración final de las bacterias era 10 mM. Después de cultivar a 28°C durante 20 h, se superpuso 1 ml de agua esterilizada que contenía 1 mg de apramicina y 1,5 mg de ácido nalidíxico, y el cultivo siguió a 28°C durante 5 días para obtener una cepa resistente a apramicina.

20 Se preparó ADN genómico de la cepa resistente a apramicina con un extractor de ADN genómico MagExtractor (fabricado por TOYOBO CO., LTD.) según un protocolo, y se confirmó por PCR y un análisis de transferencia Southern que pDDOI estaba insertado en el cromosoma por recombinación homóloga.

25 El recombinante homólogo se inoculó en un medio YEME modificado (50 ml), seguido por cultivo con agitación a 28°C durante 2 días, y 1 ml de cultivo se inoculó adicionalmente en un medio YEME modificado fresco (50 ml) para realizar cultivo sucesivo. Después de ello, el cultivo diluido a un recuento celular viable adecuado se recubrió sobre un medio MS agar, seguido por cultivo a 28°C durante 4 días. La colonia crecida se replicó en medio MS agar que contenía 20 µg/ml de apramicina y sobre un medio MS agar sin apramicina, y se seleccionaron 18 cepas sensibles a apramicina que no pueden crecer en el medio que contenía apramicina.

30 Se prepararon los ADN genómicos de las cepas sensibles a apramicina, y se llevó a cabo una reacción de PCR usando una combinación de cebadores de Km33 (5'-CTTCGTGAATCCCCCTT-3': SEQ ID No. 8) con Km35 (5'-GCCACCGCCTCGATCA-3': SEQ ID No. 9) para obtener fragmentos de ADN amplificados de aproximadamente 3,5 kpb. Se analizó la secuencia de bases de estos fragmentos de ADN amplificados. Como resultado, una cepa era una cepa mutante en la que se observó la sustitución por asparraguinas como se había diseñado y, para 17 cepas, la secuencia de bases permaneció sin cambiar.

35 Para examinar la productividad de kanamicina, esas cepas se inocularon en 30 ml de un medio de crecimiento líquido (Umezawa, H. et al., "The Journal of Antibiotics", (Japón), 1977, Vol. 30, p. 181-188) preparado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml de volumen, seguido por cultivo a 28°C durante dos días. Después de ello, se inoculó 1 ml del cultivo en 30 ml de medio productor líquido (en el que la cantidad de almidón se aumentó desde el 1,2% al 6%), y se llevó a cabo cultivo con agitación a 26°C durante 7 días. Para analizar el producto, el cultivo se ajustó a pH 2,5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50%, se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se centrifugó en condiciones de 17.400 x g y 10 minutos, y el sobrenadante se sometió a un análisis por LC/MS. Como resultado, para una cepa con mutación orf11 introducida, no se observó la producción de kanamicinas, y las 17 cepas que volvieron a la misma secuencia de bases que la cepa parental produjeron kanamicina A (tiempo de retención 8,2 min, m/z 485) y kanamicina B (tiempo de retención 10,4 min, m/z 484).

40 A continuación, la cepa no productora de kanamicina se recubrió sobre un medio de agar preparado añadiendo desoxiestreptamina al medio líquido, diluido a la concentración media, para dar una concentración de 200 µg/ml, seguido por cultivo a 28°C durante 7 días. Después de ello, el agar se congeló y descongeló para extraer el producto que después se bioensayó. La bacteria del ensayo fue *Bacillus subtilis* ATCC6633. Como resultado, el producto obtenido por cultivo sin desoxiestreptamina no tenía actividad antimicrobiana, mientras que, para el producto obtenido por cultivo con desoxiestreptamina añadida se detectó actividad antimicrobiana. Según esto, el producto obtenido por cultivo con desoxiestreptamina añadida se sometió a un análisis por LC/MS. Como resultado, se pudieron detectar kanamicina A y kanamicina B a partir del producto. Por tanto, se confirmó que la sustitución del aminoácido en la posición 136 de orf11 creó una cepa productora de kanamicina dependiente de desoxiestreptamina, S. Kanamyceticus-DOS.

60 Ejemplo 3: Cultivo con estreptamina añadida utilizando una cepa productora de kanamicina dependiente de desoxiestreptamina

La cepa productora de kanamicina dependiente de desoxiestreptamina obtenida en el ejemplo 2 se cultivó en el medio productor líquido a 26°C durante 7 días. El segundo y tercer días, se añadió estreptamina ajustada para tener una concentración final de 2.000 µg/ml.

65

Se añadió Radio Light #800 a 2,000 l del cultivo, y la mezcla se filtró. El filtrado se adsorbió en Amberlite FPC3500 de 50 ml de volumen (Tipo  $\text{NH}_4^+$ , Rohm and Haas Japan K.K.). La resina se lavó con agua, y la elución se llevó a cabo después con amoníaco acuoso 0,5 N. El eluato se ajustó a pH 6 y se adsorbió en Dowex 50W de 50 ml (tipo  $\text{NH}_4^+$ , Muromachi Tecnos CO., LTD.), y la elución se llevó a cabo con amoníaco acuoso de 0,04 N a 0,2 N para obtener 57,6 mg de 2-hidroxikanamicina A, 32,8 mg de 2-hidroxikanamicina B y 513,2 mg de 2-hidroxikanamicina C. Las estructuras de estas hidroxikanamicinas se determinaron por un análisis espectral HR-FAB/MS (JEOL JMS-700, JEOL Ltd.) y RMN (JEOL JNM-LA400, JEOL Ltd.).

#### Ejemplo 4: Cultivo con mioinositol añadido utilizando una cepa productora de kanamicina dependiente de desoxiestreptamina

La cepa productora de kanamicina dependiente de desoxiestreptamina obtenida en el ejemplo 2 se recubrió sobre el medio agar al que se había añadido mioinositol a una concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$ , seguido por cultivo a 28°C durante 7 días. Después de ello, el agar se congeló y descongeló para extraer el producto que después se sometió a un análisis por LC/MS. Como resultado, se detectó un pico atribuible a 2-hidroxikanamicina C (tiempo de retención 8,3 min, m/z 501).

#### Ejemplo 5: Cultivo con estreptamina o mioinositol añadidos en bacterias productoras de kanamicina

En bacterias productoras de kanamicina (*Streptomyces kanamyceticus*), se llevó a cabo cultivo en agar con la adición de 500  $\mu\text{g/ml}$  de estreptamina o mioinositol de la misma manera que en el ejemplo 4. El producto se analizó por LC/MS. Como resultado, tanto en la adición de estreptamina como en la adición de mioinositol, se detectó que, además de kanamicina A (tiempo de retención 8,2 min, m/z 485) y kanamicina B (tiempo de retención 10,4 min, m/z 484), se produjeron 2-hidroxikanamicina B (tiempo de retención 10,7 min, m/z 500) y 2-hidroxikanamicina C (tiempo de retención 8,3 min, m/z 501).

#### Ejemplo 6: Confirmación de las propiedades fisicoquímicas de hidroxikanamicinas B y C

Se examinaron las propiedades fisicoquímicas de las hidroxikanamicinas B y C obtenidas en los ejemplos 3 a 5 y se encontró que eran como sigue.

##### Propiedades fisicoquímicas de 2-hidroxikanamicina B

- (1) Color y propiedades: polvo incoloro
- (2) Fórmula molecular:  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_{11}$
- (3) Espectro de masas (HR-FAB/MS): valor medido 500,2563 (M+H)<sup>+</sup>, valor calculado 500,2568
- (4) Rotación específica:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +127,1^\circ$  (c = 1,  $\text{H}_2\text{O}$ )
- (5) Espectro de absorción ultravioleta  $\lambda_{\text{max}}$  nm: adsorción terminal ( $\text{H}_2\text{O}$ )
- (6) Espectro de adsorción infrarroja  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3351, 2910, 1585, 1477, 1368, 1032
- (7) Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 2,87 (1H, dd, H-1), 3,14 (1H, dd, H-2), 2,84 (1H, dd, H-3), 3,40 (1H, dd, H-4), 3,77 (1H, dd, H-5), 3,32 (1H, dd, H-6), 5,37 (1H, d, H-1'), 2,79 (1H, dd, H-2'), 3,58 (1H, dd, H-3'), 3,32 (1H, dd, H-4'), 3,81 (1H, m, H-5'), 2,84 (1H, dd, H-6'a), 3,06 (1H, m, H-6'b), 5,05 (1H, d, H-1''), 3,52 (1H, dd, H-2''), 3,02 (1H, dd, H-3''), 3,35 (1H, dd, H-4''), 3,93 (1H, dt, H-5''), 3,78 (2H, br d, H-6'')  
[TSP = 0 ppm]
- (8) Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 57,0 (d, C-1), 73,5 (d, C-2), 55,7 (d, C-3), 82,9 (d, C-4), 74,7 (d, C-5), 84,7 (d, C-6), 100,7 (d, C-1'), 55,9 (d, C-2'), 74,1 (d, C-3'), 72,0 (d, C-4'), 73,3 (d, C-5'), 42,1 (t, C-6'), 100,7 (d, C-1''), 72,4 (d, C-2''), 54,9 (d, C-3''), 69,8 (d, C-4''), 72,7 (d, C-5''), 60,9 (t, C-6'')  
[Dioxano = 67,4 ppm]
- (9) Solubilidad: soluble en agua, e insoluble en acetato de etilo y cloroformo.

##### Propiedades fisicoquímicas de 2-hidroxikanamicina C

- (1) Color y propiedades: polvo incoloro
- (2) Fórmula molecular:  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{12}$
- (3) Espectro de masas (HR-FAB/MS): valor medido 501,2398 (M+H)<sup>+</sup>, valor calculado 501,2408
- (4) Rotación específica:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +114,3^\circ$  (c = 1,  $\text{H}_2\text{O}$ )
- (5) Espectro de absorción ultravioleta  $\lambda_{\text{max}}$  nm: adsorción terminal ( $\text{H}_2\text{O}$ )
- (6) Espectro de adsorción infrarroja  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3358, 2920, 1591, 1457, 1369, 1032
- (7) Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 2,88 (1H, dd, H-1), 3,14 (1H, dd, H-2), 2,83 (1H, dd, H-3), 3,39 (1H, dd, H-4), 3,76 (1H, dd, H-5), 3,33 (1H, dd, H-6), 5,32 (1H, d, H-1'), 2,81 (1H, dd, H-2'), 3,60 (1H, dd, H-3'), 3,41 (1H, dd, H-4'), 3,86 (1H, m, H-5'), 3,76 (1H, dd, H-6'a), 3,88 (1H, m, H-6'b), 5,06 (1H, d, H-1''), 3,54 (1H, dd, H-2''), 3,04 (1H, dd, H-3''), 3,37 (1H, dd, H-4''), 3,94 (1H, dt, H-5''), 3,79 (2H, br d, H-6'')  
[TSP = 0 ppm]
- (8) Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 57,1 (d, C-1), 73,5 (d, C-2), 56,0 (d, C-3), 83,6 (d, C-4), 74,8 (d, C-5), 84,8 (d, C-6), 101,1 (d, C-1'), 56,1 (d, C-2'), 74,3 (d, C-3'), 70,6 (d, C-4'), 73,7 (d, C-5'), 61,4 (t, C-6'), 100,9 (d, C-1''), 72,4 (d, C-2''), 55,1 (d, C-3''), 69,7 (d, C-4''), 72,8 (d, C-5''), 60,9 (t, C-6'')

[Dioxano = 67,4 ppm]

(9) Solubilidad: soluble en agua, e insoluble en acetato de etilo y cloroformo

Ejemplo de prueba 1: Actividad antimicrobiana de 2-hidroxicanamicina B y 2-hidroxicanamicina C

5 La actividad antimicrobiana de 2-hidroxicanamicina B y 2-hidroxicanamicina C se midió como la concentración  
inhibidora mínima (CIM) mediante un método de dilución en agar. Las bacterias de prueba que se habían cultivado  
durante la noche en un medio de crecimiento se ajustaron a  $10^6$  células/ml, y se inoculó un bucle de platino de las  
10 misma en un medio Mueller-Hinton agar que contenía 2-hidroxicanamicina B o 2-hidroxicanamicina C (fabricado por  
Difco laboratorios Inc.), seguido por cultivo a 37°C durante 18 a 20 horas.

Los resultados se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

15 Actividad antimicrobiana de 2-hidroxicanamicinas B y C

Cepa	CIM (µg/ml)	
	2-hidroxicanamicina B	2-hidroxicanamicina C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	2	128
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	2	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC14990	1	32
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0,5	16
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	64	>128
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC19434	64	>128
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC13311	1	32
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC23055	1	32
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	4	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	128	>128

**Lista de secuencias**

20 <110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> ANTIBIÓTICOS AMINOGLUCÓSIDOS NOVEDOSOS, PROCESO PARA PRODUCIR LOS MISMOS Y USO FARMACÉUTICO DE LOS MISMOS

25 <D>28700

<150> JP 2007-310618

<151> 30-11-2007

30 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

35 <211> 390

<212> PRT

<213> *Streptomyces kanamyceticus*

<400> 1

ES 2 571 207 T3

Met Gln Val Thr Thr Ile Thr Met Asp Asp Val Gln Tyr Pro Tyr Arg  
 1 5 10 15

Leu Gly Thr Asp Cys Leu Asp Gly Ile Val Thr Arg Leu Gly Glu Leu  
 20 25 30

Gly Ala Ser Arg Tyr Leu Ile Val Ser Asp Pro Arg Val Ala Glu Leu  
 35 40 45

Tyr Gly Gln Gly Leu Arg Glu Arg Leu Ala Glu Gln Ala Gly Pro Ala  
 50 55 60

Glu Leu Ile Thr His Ala Ser Gly Glu Gln Asn Lys Gly Leu Pro Ala  
 65 70 75 80

Leu His Asp Leu Ala Glu Glu Ala Leu Arg Arg Gly Ala Asp Arg Gln  
 85 90 95

Ser Ile Val Val Ala Leu Gly Gly Gly Val Thr Gly Asn Ile Ala Gly  
 100 105 110

Leu Leu Ala Ala Leu Leu Phe Arg Gly Ile Arg Leu Val His Val Pro  
 115 120 125

Thr Thr Val Val Ala Met Leu Asp Ser Val Leu Ser Leu Lys Gln Ala  
 130 135 140

Val Asn Ala Gly Val Gly Lys Asn Leu Val Gly Thr Phe Tyr Gln Pro  
 145 150 155 160

Val Glu Val Leu Ala Asp Thr Ala Met Leu Arg Thr Leu Pro Val Arg  
 165 170 175

Glu Val Arg Ser Gly Met Cys Glu Val Val Lys Asn Ser Leu Ala Ile

ES 2 571 207 T3

180 185 190

Arg Pro Ser Met Ile Asp Gln Leu Ser Ala Gly Leu Arg Pro Asp Gly  
195 200 205

Arg Tyr Pro Asp Asp Thr Met His Trp Ile Ile Tyr Glu Ser Leu Ala  
210 215 220

Ala Lys Ala Gln Val Thr Ala Tyr Asp Lys Tyr Glu Arg Gly Glu Gly  
225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Tyr Gly His Thr Val Gly His Ala Val Glu His Ser  
245 250 255

Ser Gln Gly Ala Val Pro His Gly Ala Ala Val Ala Leu Gly Met Ile  
260 265 270

Ala Ala Ala Gln Val Ser His Arg Ala Gly Trp Ala Ser Ala Glu Leu  
275 280 285

Val Asp Leu His Arg Glu Leu Val Ala Lys Thr Gly Val Ala Arg Arg  
290 295 300

Ile Pro Ser Asp Ile Pro Leu Ser Ala Val Arg His Arg Leu Ser Phe  
305 310 315 320

Asp Asn Lys Arg Gly Tyr Leu Pro Ala Ser Ala Asp Thr Tyr Pro Met  
325 330 335

Val Leu Leu Glu Ser Pro Gly Lys Val Leu Arg Ser Glu Gly Thr Val  
340 345 350

Leu Thr Ala Ala Pro Arg Asp Leu Val Asp Ala Val Val Asp Glu Leu  
355 360 365

Ala Glu Pro Pro Arg Pro Ala Ala Ala Arg Thr Asp Asp Ala Ala Thr  
370 375 380

Val Leu Gly Gly Ala Gly  
385 390

<210> 2  
 <211> 5261  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces kanamyceticus

5

<400> 2  
 gtgcgcatca tctccgtaca ggaggcggcc acccgcacct tcgacgtctg cgtggtgggc 60  
 agcggcgcct ccggtgccat caccgccgcg gtgctcgcg aacggggcct gtccgtgctc 120  
 atcctcgaac agggcaccgc gatcccgcg ggcaccgacc acgacgacgt cgaggacccc 180  
 gacacctggg cgtacgcacg cgacggggaa ggctggagca aggagggcta tcctggagc 240

ES 2 571 207 T3

gccatggcgt tcggcggcgg cacggtgttc tacggcggca tctccttccg ctacgaacag 300  
cgcgacctcg acccgccgcc cgcgctcctc ggcgacgccg actacgcgca ctggcggctg 360  
cggctcgacg aactggagcc gcactacgac tgggtggagg accggctcgg cgtgagcggc 420  
ccgtcccacg gccgggtggg cgactacgcc ttccccact acgcgcgggg ctcgctgccg 480  
cacaccccga tgggcggcgc gctggcccgg ggcgccgacg ccctggggct gaccccgctg 540  
tccaccccga tggcgatcag cggggccagg gaccggcagc gccccggctg cgccgagctg 600  
acgccgtgca ccggcttcac ctgcccggtc aacgccaaagg ccgatgtgat cagccgcatc 660  
ctggcgcgcg ccgaggggga cgtgtccgtc gccctggaca ccagagcggg gcggttcgtg 720  
gcctcggcac cggggcgggc gaaacgtctc gaagtgtctg gcggcagtcc ccgcagccgc 780  
cgctcgggtc atgccgaccg cttcgtcctc gcggccaacg ccatccagtc cgccgcgctc 840  
ctgctgcggt cggcggaccg gcgcgagccg gacggcatgg ggaactccag cggtcagggtg 900  
ggccgccacc tggccatgaa gaacagcgtc tacgtccgcg gcaggacca ggagcggatc 960  
gtcgcaccacc agccgctgcg ccatcgctac tccagcgtct gcgtcctgga ccacctgcgc 1020  
ggtgcggagt tccccgggca gctgggcggg atcatctacg aggccaacc gtgggaggac 1080  
cccgaggccg accgtcctgg cgccggttcg ctgctccagc tggagtgcct cctcggcgac 1140  
cgcccgcagg cccgcaacat ggtgcggctc gccaggagcc gggaccggga cgggctccag 1200  
cgcatcgtca tggactaccg ccagcaccct ttggacggcg aacgcctgga cgtgctccag 1260  
gggaaggcga aggatgtact gcacgcggcc ggggccgagc gcaccgagtc cgtcgacagc 1320  
gatttcgca ccggcagcac gcacgtgcac ggcacgctgc gcgccggtga cgaccccgcg 1380  
acctcgggtga ccgaccggac gggccggctg cacgactacg acaacgtgtg gtcggcggac 1440  
ggcgcgacgt tccccctcgc cgggaacttc aatccccacc tcaccatcca ggccaatgcc 1500  
cggcggatcg cggtcggcat ctctgacgg ccgccccctc tccccctccc cgtacgccct 1560  
gccgcccttc cccgtggcga gccacccctc tcgtgaatcc cccttcgtga cgcgcgaact 1620  
gtcttcgacc ttggaggtat gtgtcatgcc cctgcaaagt tcacggcttg cggtcgacaa 1680  
cggaaacccc gtccgcggca agccctggcc ggtgtggccg cagcccaccg acggcacctt 1740  
cgacgccctc tcccgcgtcc tgcgttcgg ccgctgggcc atcagcggcc cctaccgggg 1800  
cgtggagtcg gccgaacgcc gcttcgcccg ccggttcgcc gactaccacc gcatcgcca 1860  
ctgctgccc gcctccagcg gtacggcgag cctgatgctg gccctggagg cctgtggcgt 1920  
cggcgcggga gacgaggtca tcctgcccgg cgtcacctgg gtcgcctccg cctccacggt 1980  
ggtgggcgtc aacgcgggtc cgggtttcgc cgacatcgac ccggacacc tctgcctcga 2040  
cccgacgcc gtcgaggcgg ccatcaccct ggccaccaag gcgatcgtcg tcgtccacct 2100  
ctacgcggcc gtcgccgacc tcaccgcct caaggaggtg gccgaccggc acggcatcgt 2160  
gctcatcgag gactgcgcgc agggccacgg cgccgagttc gaaggccaca aggtcggcac 2220  
cttcggcgcg gtcggcacct tcagcatgca gcagagcaag gtctgacca gcggcgaggg 2280

ES 2 571 207 T3

cggcgccgcc atcaccgccc acccgggtgct cgccccccgg atggaacacc tgcgcgcgga 2340  
 cggccgctgc taccgcatc aggcgcccct ctccggccac atggagctcg tcgagacggg 2400  
 cgagctgatg ggagcaacc gctgcatctc cgagttccag gcagcgggtcc tgaccgagca 2460  
 gctggggcga ctcgaccggt tcaacgccct gcgacggcac aacgcggaac tcctcgacgc 2520  
 gctgctgacc gacgtcggat accgcccgca gcgacgacg cccggcacca ccgcccgcac 2580  
 gtactacacc tacgtcggc agctgcccga cgcggaactg cccggcgcgg acatcaccaa 2640  
 ggtcaccgag gcgctgacc ccgaactcgg cttcccggtg gcaccggcct actcgccgct 2700  
 caacgccaac cccctgtacg acccggccag tcgacgcccg ttcgccctcg gaccgagca 2760  
 cgagaagctc atcgacccc cccgattcgt gctcccggtg agcggccgcc tgacgcgtcg 2820  
 gctcgtcacc ttccaccacg ccgccctgct cggcgacgag tcggacatga gggacatcgc 2880  
 ggaagcgctt accaaggtgc tccagcaccg ggccgtcctg gccgcttgag ccgaagccgt 2940  
 cacacacgcc ttcaggattg gggacagacc atgcaggtca ccaccatcac gatggatgac 3000  
 gtccagtatc cctaccgatt aggcacggac tgctcgcag gcacgtcac gcgcctcggc 3060  
 gaactcggcg ccagccgcta cctgatcgtc agcgaccca gggtcgccga gctgtacggg 3120  
 caggggctgc gcgaacggct cgcggagcag gcgggacccg ccgagctgat caccatgcc 3180  
 tcgggagaac agaacaaggg cctgcccgca ctgcacgacc tggccgagga ggcgctgcgg 3240  
 cgcggcgccc accggcagag catcgtcgtg gactcggcg gcggtgtcac cgggaacatc 3300  
 gcggggctgc tggccgcgct gctcttccgc ggcatccgtc tgggtcacgt gcccaccacc 3360  
 gtggtggcca tgctggattc ggtgctctcg ctcaagcagg ccgtgaacgc gggagtgcgg 3420  
 aagaacctgg tcggcacctt ctaccagccc gtcgaagtgc tcgccgacac cgcgatgctg 3480  
 cgcaccctgc cggctccgca ggtcaggtcg gggatgtgag aggtggtgaa gaactcgtc 3540  
 gccatccgcc ccagcatgat cgaccagctg tcggccgggc tgcgccccga cggccgctat 3600  
 cccgacgaca cgatgcactg gatcatctac gagagcctgg ccgccaaggc ccaggtcacg 3660  
 gcgtacgaca agtacgagcg cggcgagggg ctcatcctgg agtacgggca caccgtcggg 3720  
 cacgccgtgg agcactcctc gcagggagcc gtgccgacg gcgccgccgt cgcgctcggc 3780  
 atgatcggc ccgcccaggc ctcccaccgg gcgggctggg cctcggccga actcgtcgac 3840  
 ctgcaccggg agctcgtcgc caagaccggg gtcgcgcggc gcatcccgtc cgacataccg 3900  
 ctctccgccc tcaggcaccg cctctcctc gacaacaagc ggggtacct cccggcctcc 3960  
 gccgacacct atccgatggt gctgctcgaa tccccggca aggtgctgag cagcgagggc 4020  
 accgtcctga cggcggcgcc acgggacctg gtcgacgagg tggtcgacga actcgcggaa 4080  
 cccccacggc ccgcccggc gaggaccgac gacgcccca ccgtcctcgg cggtgccggg 4140  
 tgagcgcgcc cgtgcgcgtc ggcgtcgtcg gtgcggggtt catgggcggg gtgcacgccg 4200  
 aggtggtggc ggctcatccc ggcgcccggc tcgaagcggg gcacgacctc gaccccggc 4260  
 ccgccagggg cctggccgag cggttccgcg ccgagcgggc cgagccctcc tgggcggacc 4320

ES 2 571 207 T3

tgctcgccga ccccgcgatc gacctgctca tcatcaccac gcccaacggg ctgcaccacc 4380  
 ggcaggcggc cgaggcgctg cgggcgggca agcactact ggtggagaag ccgctcggtg 4440  
 tcacgccgga gcagggtggc gagctcgctg aactcgccgg acggcacgac cgggtccttg 4500  
 cccacggaag caacttcgtg cacagcccga agttcgccg ggcccgtcaa ctggtcgcgg 4560  
 acaccgaggc gttcggacgg ccgcacctgg tccgggtcgt cttccgcaac tcgggccccg 4620  
 aggccgcctg ggccgcgtcc aaggacctcg cgggcggcgg agccctcctg gacctgggct 4680  
 gtcacgcggt ggagctgtgc cgggtggtgc tcgacggcgc cgacgtcgag tcggtcagcg 4740  
 cccgactgca gcgggtgctg ccgccccacg acgccgaagc ggaccgcgcg tccggcaccg 4800  
 cgggaaccgc gcgggtcgcg ctggaggacc aggcgctgct ggtcatggag ttcgccgacg 4860  
 gcgcggtcgg gcagtgcgac gtctcctggg taccacaggc cggtgagcag gtcaccgcgg 4920  
 agatcatcgg caccaagggc agggtcgagg tcgacctgtg gaccggcatg gggctgcgcg 4980  
 cctactcggg caagggctat caggacgtct gggatcccga gcagggtggt gtgcatccgg 5040  
 aatgggagtg gatccgggctg agcggctact accaccagga cggcaccgtg atcgaggcgg 5100  
 tgggccaggg catccccctc acccacggcc ccgcggaagc gctcgctcctg gcccggttcc 5160  
 tggccaccgg ttaccgcagt cacgcggagg ggcgggtact gcggctgtcc ggcgcgccgg 5220  
 tcggccctgg cgcgtcgacg acggcggcgg gctcggaatg a 5261

<210> 3  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> cebador

10

<400> 3  
**gggaagcttg accttgagg tatgtgt** 27

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

15

<220>  
 <223> cebador

20

<400> 4  
**gttcagcatg gccaccacgg tggt** 24

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

25

<220>  
 <223> cebador

30

<400> 5  
**tcggtgctct cgctcaagca g** 21

35

<210> 6  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

ES 2 571 207 T3

	<220>		
	<223>	cebador	
5	<400>	6	
		<b>gggtctagat gccgtcctgg tggtagt</b>	27
	<210>	7	
	<211>	1176	
10	<212>	ADN	
	<213>	Streptomyces kanamyceticus	
	<400>	7	
		<b>atgcagggtca ccaccatcac gatggatgac gtccagtatc cctaccgatt aggcacggac</b>	60
		<b>tgccctcgacg gcatcgtcac gcgcctcggc gaactcggcg ccagccgcta cctgatcgtc</b>	120
		<b>agcgacccca gggtcgcccga gctgtacggg caggggctgc gcgaacggct cgcggagcag</b>	180
		<b>gcgggacccg ccgagctgat cacccatgcc tcggggagaac agaacaaggg cctgcccgca</b>	240
		<b>ctgcacgacc tggccgagga ggcgctcggc cgcggcgccg accggcagag catcgtcgta</b>	300
		<b>gcactcggcg gcggtgtcac cgggaacatc gcggggctgc tggccgcgct gctcttccgc</b>	360
		<b>ggcatccgtc tgggtcacgt gcccaccacc gtggtggcca tgctggattc ggtgctctcg</b>	420
		<b>ctcaagcagg ccgtgaacgc gggagtcggc aagaacctgg tcggcacctt ctaccagccc</b>	480
		<b>gtcgaagtgc tcgccgacac cgcgatgctg cgcaccctgc cggtcgcgca ggtcaggctc</b>	540
		<b>gggatgtgcy aggtggtgaa gaactcgtc gccatccgcc ccagcatgat cgaccagctg</b>	600
		<b>tcggccgggc tgcgccccga cggccgctat cccgacgaca cgatgcactg gatcatctac</b>	660
		<b>gagagcctgg ccgccaaggc ccaggtcacg gcgtacgaca agtacgagcg cggcgagggg</b>	720
		<b>ctcatcctgg agtacgggca caccgtcggg cacgccgtgg agcactcctc gcagggagcc</b>	780
		<b>gtgccgcacg gcgccgccgt cgcgctcggc atgatcgccg ccgcccaggc ctcccaccgg</b>	840
		<b>gcgggctggg cctcggcccga actcgtcgac ctgcaccggg agctcgtcgc caagaccggg</b>	900
		<b>gtcgcgcggc gcatcccgtc cgacataaccg ctctccgccg tcaggcaccg cctctccttc</b>	960
		<b>gacaacaagc ggggctacct cccggcctcc gccgacacct atccgatggt gctgctcgaa</b>	1020
		<b>tccccggca aggtgctgcy cagcgagggc accgtcctga cggcggcgcc acgggacctg</b>	1080
		<b>gtcgcgcggc tggctgacga actcgcggaa cccccaggc ccgcgggccg gaggaccgac</b>	1140
		<b>gacgccgcca ccgtcctcgg cggtgccggg tgatga</b>	1176
15	<210>	8	
	<211>	17	
	<212>	ADN	
	<213>	secuencia artificial	
20	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	8	
25		<b>cttcgtgaat ccccctt</b>	17
	<210>	9	
	<211>	17	
	<212>	ADN	
30	<213>	secuencia artificial	

<220>

<223> cebador

<400> 9

gcccaccgcc tcgatca

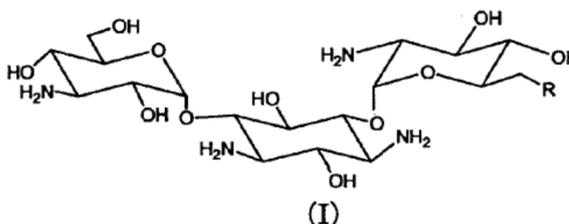
5

17

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (I) o su sal farmacológicamente aceptable:

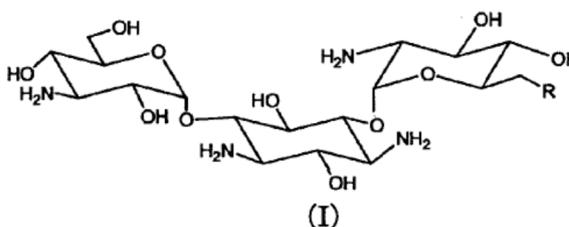
5 [Fórmula química 1]



en donde R representa amino o hidroxilo.

- 10 2. El compuesto según la reivindicación 1 o su sal farmacológicamente aceptable, en donde R representa amino.
3. El compuesto según la reivindicación 1 o su sal farmacológicamente aceptable, en donde R representa hidroxilo.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o su sal farmacológicamente aceptable.
5. Una cepa productora de kanamicina del género *Streptomyces* capaz de producir un compuesto según la reivindicación 1, en donde se ha inactivado 2-desoxi-escilo-inososa sintasa.
- 20 6. La cepa productora de kanamicina según la reivindicación 5, que es dependiente de 2-desoxiestreptamina.
7. La cepa productora de kanamicina según la reivindicación 5, en donde se ha integrado un gen que codifica un polipéptido seleccionado de los siguientes polipéptidos (a) a (d):
- 25 (a) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 1 que tiene una mutación en la que el ácido aspártico en la posición 136 se ha cambiado a asparraguina,
- (b) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en (a) en la que uno o más aminoácidos se han sustituido, delecionado, añadido o insertado, el polipéptido tiene una actividad funcionalmente equivalente al polipéptido definido en (a), y
- 30 (c) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 80% o más con la secuencia de aminoácidos definida en (a), el polipéptido tiene una actividad funcionalmente equivalente al polipéptido definido en (a).
- 35 8. La cepa según la reivindicación 7, en donde el polipéptido definido en (b) o (c) tiene la mutación definida en (a).
9. La cepa según la reivindicación 7, en donde el uno o más aminoácidos en (b) es de 1 a 40 aminoácidos.
- 40 10. La cepa según la reivindicación 7, en donde la homología en (c) no es menor del 90%.
11. La cepa según la reivindicación 5, en donde la cepa es *S. Kanamyceticus-DOS*.
12. Un proceso para producir un compuesto representado por la fórmula (I):

45 [Fórmula química 1]



en donde R representa amino o hidroxilo,

50

el proceso comprende cultivar una cepa productora de kanamicina del género *Streptomyces* en un medio que comprende estreptamina y/o mioinositol para producir el compuesto.

- 5 13. El proceso según la reivindicación 12, en donde la 2-desoxi-escilo-inososa sintasa en la cepa productora de kanamicina se ha inactivado.
14. El proceso según la reivindicación 13, en donde la cepa productora de kanamicina es una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11.
- 10 15. El proceso según la reivindicación 13, en donde el medio comprende estreptamina.
16. El proceso según la reivindicación 15, en donde el compuesto representado por la fórmula (I) se produce junto con 2-hidroxikanamicina A.
- 15 17. El proceso según la reivindicación 13, en donde el medio comprende mioinositol.
18. El proceso según la reivindicación 17, en donde R representa hidroxilo.
- 20 19. El compuesto según la reivindicación 1 o su sal farmacológicamente aceptable para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un animal incluyendo un ser humano.
20. El compuesto o su sal farmacológicamente aceptable para uso según la reivindicación 19, en donde la enfermedad infecciosa deriva de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, o *Pseudomonas aeruginosa*.