

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 981**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/64**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012 E 12774572 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2699584**

54 Título: **Péptido cíclico derivado de Nonomurea sp., proceso para la producción del mismo, y composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con micobacterias que comprende el mismo**

30 Prioridad:

**18.04.2011 US 201161476473 P**

**29.07.2011 US 201161513403 P**

**03.11.2011 US 201161555257 P**

**07.03.2012 US 201261607934 P**

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

**04.07.2016**

73 Titular/es:

**MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND  
ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION  
(50.0%)**

**116 Myoungji-ro, Cheoin-gu, Yongin-si  
Gyeonggi-do 449-728, KR y**

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY  
OF ILLIONIS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, JONG WOO;**

**LEE, SANG WOOK;**

**PARK, SANG JIN;**

**SUH, JOO WON;**

**LEE, IN AE;**

**YOON, TAE MI;**

**CHOI, JONG KEUN;**

**LEE, JI EAN;**

**KIM, JIN YONG;**

**JIN, YING YU;**

**FRANZBLAU, SCOTT;**

**CHO, SANGHYUN;**

**GAO, WEI;**

**PAULI, GUIDO;**

**MCALPINE, JAMES;**

**NAPOLITANO, JOSE;**

**JAKI, BIRGIT;**

**FRIESEN, BRENT;**

**RODRIGUEZ BRASCO, MARIA FLORENCIA y**

**LANKIN, DAVID**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 575 981 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

Péptido cíclico derivado de *Nonomuraea* sp., proceso para la producción del mismo, y composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con micobacterias que comprende el mismo

5

**Campo técnico**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional del Estados Unidos con número US 61/476.473, presentada el 18 de abril de 2011; y US 61/513.403, presentada el 29 de julio de 2011; y US 61/555.257, presentada el 3 de noviembre de 2011; y US 61/607.934 presentada el 7 de marzo de 2012.

10

La presente invención se refiere a novedosos péptidos dirigidos contra micobacterias muy activas contra *Mycobacterium tuberculosis* replicante/replicante y varias cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos incluyendo aquellas con resistencia multifármaco (RMF) y tuberculosis extremadamente resistente a fármacos (XDR). La presente invención se refiere también a un proceso de fermentación para cultivar una cepa de *Nonomuraea* sp. MJM5123 para preparar los péptidos antimicobacterianos, y al proceso para la producción de los mismos y sus composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos antimicobacterianos para la prevención y/o el tratamiento de la tuberculosis.

15

20 **Antecedentes de la técnica**

*Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria grande y compleja que produce la enfermedad de la tuberculosis (TB) en seres humanos y otros mamíferos. La TB es una enfermedad muy contagiosa que se disemina de una persona a otra por la ruta respiratoria.

25

Se produjeron 9,4 millones de casos nuevos de TB en 2009, incluyendo 1,1 millón de casos entre personas con VIH y 0,3 millones de RMF-TB [WHO Actions For Life - Towards a world free of tuberculosis; Organización Mundial de la Salud: Ginebra, Suiza, 2006]. La RMF-TB requiere que la duración del tratamiento se amplíe de seis meses hasta un mínimo de dos años. La prevalencia mundial de la TB extremadamente resistente a fármacos (XDR-TB) se estima en un 6,6 % entre las cepas de tuberculosis las cepas de tuberculosis RMF M [WHO Actions For Life - Towards a world free of tuberculosis; Organización Mundial de la Salud: Ginebra, Suiza, 2006].

30

A pesar de la amplia concienciación que ha despertado la epidemia, la prevalencia de la TB de tipo RMF y también la XDR-TB sigue en aumento [WHO Anti-tuberculosis drug resistance in the world - Informe n.º 4. 2008]. La rápida aparición de cepas de tuberculosis RMF y XDR es difícil o virtualmente intratable con las quimioterapias actuales. Dichas cepas representan una amenaza importante para la salud global, especialmente en los países en desarrollo y en países con prevalencia creciente del VIH/SIDA [Koenig, R. Drug-resistant tuberculosis. En Sudáfrica, la TB XDR y el VIH representan una combinación mortal. Science 2008, 319, 894-897].

35

La mayoría de personas infectadas con una infección de TB latente (LTBI) pueden contener el bacilo impidiendo que cause síntomas y no suponen riesgo de infección para otras personas. Con la excepción de la evidente supresión inmunitaria mediada por enfermedad o por fármacos, se sabe poco acerca de lo que hace que la LTBI evolucione a una enfermedad de TB activa, pero una vez que la TB es capaz de evitar el confinamiento inmunológico, se considera que ha evolucionado a una enfermedad TB activa. Los niños y adultos malnutridos y/o inmunocomprometidos tienen mayor riesgo de evolución de la enfermedad. En 2008, la TB reclamó las vidas de 1,82 millones de personas, de los que 500.000 se produjeron entre personas infectadas con VIH, convirtiéndose en la causa principal de muerte para las personas con VIH [World Health Organization. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud, 2009].

40

45

En consecuencia, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos fármacos contra la TB, preferentemente con un nuevo mecanismo de acción.

50

Entretanto, el documento WO 2009/119710 divulga tiopéptidos cíclicos antibacterianos producidos mediante un actinomiceto que pertenece al género *Nonomuraea*. Terui et al. en Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 18(24), 6321-3 divulga tetrapéptidos cíclicos derivados del caldo de fermentación de *Nonomuraea* sp. TA-0426 que inhibe el transportador de glicina de tipo 1. El documento US 2010/093615 divulga tiopéptidos cíclicos antibacterianos obtenidos a partir de una cepa de *Nonomuraea* sp Bp3714-39.

55

**Divulgación de la invención**

60

**[Problema técnico]**

Es un objeto de la presente invención proporcionar novedosos péptidos dirigidos contra la TB activos contra *M. tuberculosis* replicante/no replicante, y muchas cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos.

65

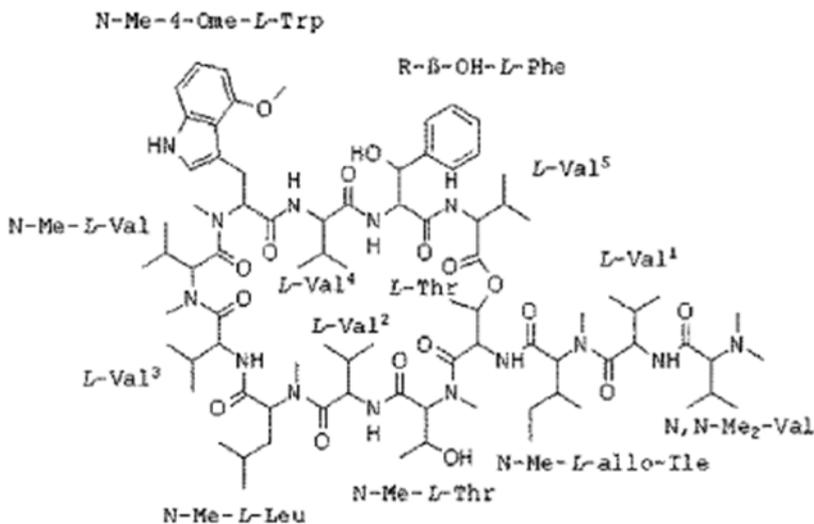
Es otro objeto de la presente invención proporcionar un proceso para la producción de los péptidos dirigidos contra

la tuberculosis y a un uso de los péptidos anti-TB en las composiciones farmacéuticas para la prevención y/o el tratamiento de diferentes infecciones de micobacterias.

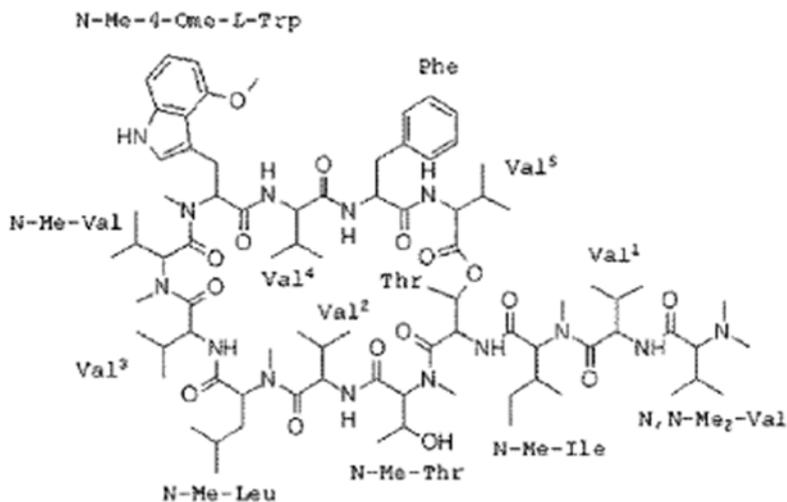
**[Solución al problema]**

5 Para conseguir el objetivo anterior, la presente invención proporciona péptidos cíclicos aislados de una cepa de *Nonomuraea sp.* MJM5123. En una realización preferida de la presente invención, el péptido cíclico de la presente invención puede tener la siguiente Fórmula 1 o Fórmula 2:

[Fórmula 1: H-14]



[Fórmula 2: H-16]



10 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica eficaz para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con *Mycobacterium spp.* En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención comprende novedosos péptidos cíclicos anti-TB  
 15 aislados a partir de una cepa de *Nonomuraea sp.* MJM5123 y un transportador farmacéuticamente aceptable para tratar infecciones causadas por *Mycobacteria*. Los presentes inventores han depositado la *Nonomuraea sp.* MJM5123 en la Korean Collection for Type Cultures (KCTC) del Korea Research Institute of Biotechnology and Bioscience (KRIBB) el 3 de abril de 2012 (n.º de acceso: KCTC 12178BP).

A partir de ahora, la presente invención se describe detalladamente.

20 La presente invención proporciona péptidos cíclicos aislados de una *Mycobacterium spp.*, preferentemente una cepa de *Nonomuraea sp.* MJM5123. En una realización preferida de la presente invención, el péptido cíclico de la

presente invención tiene la Fórmula 1 o Fórmula 2. Preferentemente, los péptidos cíclicos de la presente invención se pueden aislar de una cepa de *Nonomuraea sp.* MJM5123 mediante los siguientes procedimientos:

#### Actinomicetos - Una fuente de nuevos antibióticos anti-TB

5 Los actinomicetos son organismos del suelo ubicuos conocidos por producir una gran variedad de metabolitos secundarios. Algunos antibióticos, utilizados para el tratamiento de una variedad de infecciones bacterianas, proceden de los actinomicetos, incluyendo estreptomycin, cefalosporinas, tetraciclina, eritromicina, rifampina, y daptomicina. Aunque tres fármacos diferentes utilizados en la actualidad para tratar la tuberculosis (rifampina, 10 estreptomycin y cicloserina) se descubrieron a partir de actinomicetos usando ensayos de difusión en agar, estos cribados no se realizaron inicialmente usando *M. tuberculosis*. Esto fue debido a la naturaleza contagiosa y frecuente resultado fatal (en el momento) de la TB. Puesto que ahora se entiende que *M. tuberculosis* solamente es susceptible a algunas clases de agentes antimicrobianos, los inventores deben asumir que el fallo del pasado al cribar caldos de fermentación directamente contra este patógeno, dio como resultado que muchos tipos de 15 compuestos potencialmente útiles quedaran sin detectar. De esta forma, los inventores iniciaron este programa de descubrimiento de fármacos contra la TB realizando el cribado directamente contra una cepa virulenta de *M. tuberculosis*.

#### Cribado de alto rendimiento

20 Las técnicas de cribado de alto rendimiento tanto para compuestos puros o para extracto se definieron en el Institute for Tuberculosis Research (ITR). La Colección de extractos de microorganismos útiles (ECUM, por sus siglas en inglés) de la Myongji University Corea del Sur mantiene una colección de cultivo de más de 7000 aislados de actinomicetos procedentes de Corea, China, Nepal, Filipinas, Vietnam, Antártica, y el Círculo Polar Ártico. La 25 inclusión de ubicaciones bastante exóticas fue un intento de aislar especies raras y novedosas.

Cada aislado se fermentó inicialmente en cultivos de 20 ml en tres medios de cultivo diferentes - G.S.S. (medio rico), medio de Bennett y GyC (medio mínimo) y se sometieron a ensayo tres extractos por cepa en el ensayo en 30 microplaca con azul alamar (MABA) y adicionalmente se clasificaron.

#### Identificación de MJM5123

Tras cribar más de 65.000 extractos almacenados en la Colección de extractos de microorganismos útiles (ECUM, por sus siglas en inglés) de la Myongji University en Corea, el extracto metanólico de micelio de una novedosa 35 especie de actinomicetos, cepa MJM5123, pareció tener una fuerte actividad anti-TB. La cepa MJM5123 se identificó como una *Nonomuraea sp.* mediante un enfoque taxonómico polifásico.

#### Aislamiento guiado por bioensayo

40 La cepa MJM5123 se seleccionó para un procedimiento de aislamiento guiado por bioensayo basado en un fraccionamiento inicial con cromatografía líquida al vacío (VLC) seguido por purificación dirigida con varias etapas de cromatografía de alta velocidad en contracorriente (CCC).

La investigación guiada por bioensayo de los principios bioactivos de productos naturales requieren técnicas 45 analíticas preparativas que son capaces de resolver mezclas complejas eficazmente [Hostettmann, K.; Marston, A. The search for new drugs from higher plants. *Chimia* 2007, 61, 322-326; Hostettmann, K.; Marston, A. Plants as a still unexploited source of new drugs. *Nat Prod Com* 2008, 3, 1307-1315; Hostettmann, K.; Marston, A.; Wolfender, J. L. Strategy in the search for new lead compounds and drugs from plants. *Chimia* 2005, 59, 291-294]. Los métodos convencionales contemporáneos en este campo son diferentes formas de cromatografía sólido-líquido que utilizan 50 fases sólidas estacionaria, tales como columnas/ultrarrápida, vacío, y cromatografía líquida de alto rendimiento (CC, VLC, HPLC). Sin embargo, existen varios inconvenientes asociados con el uso de fases estacionarias sólidas (adsorbentes), que limitan significativamente su función en el contexto del fraccionamiento guiado por bioensayo: La adsorción irreversible es una de estas limitaciones, y está ampliamente reconocida [Lindblom, T. Irreversible 55 absorption of diphenylamine onto a straight phase and a reverse phase HPLC-column. Symposium on Chemical Problems Connected with the Stability of Explosives, [Proceedings] 1993, 9<sup>a</sup>, 205-213; Kubo, I. Recent applications of counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products. *J Chrom* 1991, 538, 187-191; Sadek, P. C.; Carr, P. W.; Bowers, L. D.; Haddad, L. C. A radiochemical study of irreversible adsorption of proteins on reversed-phase chromatographic packing materials. *Anal Biochem* 1986, 153, 359-371]. De acuerdo con ello, los métodos de CL están frecuentemente asociados con la pérdida de material (recuperación limitada) y, de manera 60 más importante, la atenuación de la bioactividad junto con la ruta de fraccionamiento. Estas limitaciones no se producen en la cromatografía contracorriente (CCC), ya que es una técnica líquido-líquido que se basa en su totalidad en el reparto de una muestra entre dos disolventes inmiscibles para conseguir la separación, permite la recuperación completa del material de muestra y, por tanto, tiene el potencial de evaluar los efectos sinérgicos de mezclas complejas de productos naturales. Además, es un método ideal para el aislamiento dirigido de clases de 65 compuestos específicas. Así, el procedimiento de aislamiento está principalmente basado en CCC.

La cepa MJM5123 se cultivó en masa en fermentadores de 20 l en el ECUM, se recogió y se extrajo para producir biomasa suficiente para aislamiento, elucidación de la estructura y perfilado biológico de los compuestos puros H-14 y H-16, dos péptidos cíclicos fuertemente activos contra la TB.

##### 5 Elucidación de la estructura de los componentes bioactivos

Se llevó a cabo una elucidación completa de la estructura de H-14 y H-16 usando las técnicas de RMN 1D/2D más modernas y de mayor calidad, así como información estructural basada en la EM de alta resolución, potenciada mediante la cristalografía de rayos X del péptido. Se utilizó la RMN cuantitativa (RMNc) para el reconocimiento selectivo realizado simultáneamente con la determinación cuantitativa en cada etapa de aislamiento. La RMNc es una herramienta óptima, no solamente para la determinación de la pureza y/o la cantidad de aislados activos, sino también con el fin de perfilar los compuestos biológicamente activos, pero también mezclas/fracciones complejas. La estructura 3D global de H-14 y sus restos de aminoácidos se determinaron mediante cristalografía de rayos X.

##### 15 Optimización del proceso de fermentación

Para mejorar la productividad de los péptidos anti-TB, se desarrolló un proceso de fermentación y un medio económico. La fermentación principal se llevó a cabo a 34 °C con una velocidad de agitación de 600 rpm y 0,3 vvm de aireación durante 6 días. El volumen final del micelio empaquetado fue del 80 % a un pH de 8,20 y el azúcar total fue inferior al 1,8 %. El proceso de fermentación proporcionó 373 mg/l de H-14.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica eficaz para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con *Mycobacterium* spp. que comprenden un compuesto de Fórmula 1 y/o Fórmula 2 de la presente invención como principio activo. En una realización preferida, la enfermedad relacionada con *Mycobacterium* spp. es tuberculosis. En otra realización preferida de la presente invención, la tuberculosis puede ser una tuberculosis RMF o una tuberculosis XDR.

La composición farmacéutica de la presente invención comprende los novedosos péptidos anti-TB de la presente invención aislados de una cepa *Nonomuraea* sp. MJM5123. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un transportador farmacéuticamente aceptable, un excipiente y un diluyente.

En una realización de la presente invención, los péptidos cíclicos de la presente invención se pueden tratar solos como un agente terapéutico contra la tuberculosis, o se pueden tratar combinados con una composición mixta de uno o al menos dos tipos de otros agentes antimicobacterianos. En una realización preferida de la presente invención, el agente antimicobacteriano puede ser un agente de tratamiento oral de primera línea contra la tuberculosis, tal como isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida; un agente anti-TB inyectable tal como estreptomycin, amikacina, capreomicina y kanamicina; una fluoroquinolona tal como ciprofloxacina, ofloxacina y moxifloxacina; agente de tratamiento oral de segunda línea contra la tuberculosis, tal como rifabutin, protionamida, etionamida, cicloserina, PAS y tioacetazona; otros agentes anti-TB tales como linezolid, clofazimina, amoxicilina/clavulanato, y un derivado de diaminodifenilsulfona; y un compuesto actualmente en ensayos clínicos para la tuberculosis tales como bedaquilina, PA-824, Dalamanid, SQ-109, Sutezolid, rifapentina y compuestos en desarrollo preclínico, en particular AZD5847, BTZ043, TBA-354, CPZE/ N-45, SQ-641, SQ-609, DC-159a, Q201, THPP, análogos de riminofenazina de clofazimina e inhibidores LeuRS que contienen boro, pero no siempre limitados a los citados.

Los péptidos cíclicos anti-TB de la presente invención se pueden formular para su administración por vía oral, por ejemplo, polvos, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, soluciones, suspensiones, emulsiones y jarabes. Los transportadores, excipientes y diluyentes se ilustran mediante lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral.

Las formulaciones sólidas para administración oral son comprimidos, píldoras, polvos, gránulos y cápsulas. Estas formulaciones sólidas se preparan por mezclado con uno o más excipientes adecuados tales como almidón, calcio dihidratado, sacarosa o lactosa, gelatina, etc. Salvo por los excipientes sencillos, se pueden utilizar lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, etc.

Las formulaciones líquidas para administración oral son suspensiones, soluciones, emulsiones y jarabes, y las formulaciones anteriormente mencionadas pueden incluir varios excipientes tales como agentes mojantes, edulcorantes, aromas y conservantes además de los diluyentes simples de uso generalizado tales como agua y parafina líquida.

Los péptidos anti-TB novedosos de la presente invención se pueden formular para inyección intravenosa. Para uso intravenoso (IV), una forma soluble en agua de un compuesto de la presente invención se puede disolver en cualquiera de los fluidos intravenosos usados habitualmente, y se administran por infusión. Las formulaciones

intravenosas pueden incluir transportadores, excipientes o estabilizantes que incluyen, sin limitación, calcio, albúmina sérica humana, citrato, acetato, cloruro de calcio, carbonato, y otras sales. Los fluidos intravenosos incluyen, sin limitación, suero salino fisiológico o solución de Ringer. Los péptidos anti-TB de la presente invención también se pueden introducir en inyectores, cánulas, catéteres y líneas.

5 Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en la forma de soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas estériles isotónicas para inyección. Estas soluciones o suspensiones se pueden preparar a partir de polvos o gránulos estériles que tienen uno o más de los transportadores mencionados para su uso en las formulaciones para administración oral. Los péptidos anti-TB novedosos de la presente invención se pueden disolver  
10 en polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, alcohol bencílico, cloruro de sodio, y/o diferentes tampones.

Para preparaciones intramusculares, parenterales o intravenosas, una formulación estéril de los péptidos anti-TB o una forma salina soluble adecuada del compuesto, por ejemplo, la sal de clorhidrato, se puede disolver y administrar en un diluyente farmacéutico tal como agua para inyección (WFI), suero salino fisiológico o glucosa al 5 %.

15 Una forma insoluble adecuada de los péptidos contra la tuberculosis también se puede preparar y administrar en forma de suspensión en una base acuosa o una base oleosa farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un éster de un ácido graso de cadena larga tal como oleato de etilo. Las formas de depósitos inyectables se pueden preparar formando matrices microencapsuladas de los péptidos anti-TB en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero concreto empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Se preparan también formulaciones inyectables de depósito atrapando el fármaco en microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

25 Para su aplicación a los ojos o a los oídos, los péptidos de la presente invención se pueden formular en bases hidrófobas o hidrófilas tales como pomadas, cremas, lociones, pinturas o polvos.

Para su aplicación en administración rectal, los péptidos de la presente invención se pueden formular en la forma de supositorios premezclados con transportadores convencionales tales como manteca de cacao, cera, u otro glicérido.

30 Los péptidos anti-TB de la presente invención también se pueden utilizar en inhaladores, tales como inhaladores de dosis medida, y nebulizadores.

La presente invención proporciona además un proceso para la fabricación del péptido cíclico contra la tuberculosis de la Fórmula 1 o la Fórmula 2 de la presente invención. El proceso de la presente invención puede comprender las siguientes etapas: cultivar un microorganismo productor de un péptido antimicobacteriano con la cepa *Nonomuraea* sp. MJM5123 en condiciones aerobias en un medio de cultivo acuoso; y aislar los péptidos cíclicos contra la tuberculosis de la presente invención a partir de los micelios fermentados.

40 En una realización de la presente invención, la etapa de aislar el péptido cíclico contra la tuberculosis puede comprender las siguientes etapas: realizar una cromatografía líquida en vacío (VLC) del extracto metanólico de micelios de *Nonomuraea* sp. MJM5123 usando metanol y cloroformo como eluyente; realizar una cromatografía en columna abierta Sephadex LH-20 usando metanol como eluyente; y realizar una cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC) usando HEMWat+2 como disolvente.

45 En otra realización de la presente invención, la etapa de aislar el péptido cíclico contra la tuberculosis puede comprender las siguientes etapas: extraer los micelios de *Nonomuraea* sp. MJM5123 usando metanol como disolvente; añadir agua hasta el 30 % del extracto metanólico para preparar metanol acuoso; desgrasar el extracto de metanol usando hexano; separar la capa acuosa y ajustar hasta el 65 % de metanol acuoso; extraer la capa acuosa usando cloroformo; concentrar y resolver el extracto de cloroformo usando metanol; realizar una cromatografía en columna Sephadex LH-20 usando metanol como eluyente; y realizar la HPLC provista de una columna rellena con un gel de fase invertida (RP-18).

### 55 Efectos ventajosos de la invención

Los péptidos anti-TB novedosos tienen una citotoxicidad muy baja frente a células de mamíferos y una actividad potente contra *M. tuberculosis* replicante no replicante incluyendo cepas de *M. tuberculosis* resistentes a un solo fármaco, MDR y XDR-TB, de forma que se puedan usar eficazmente como agentes terapéuticos para la tuberculosis.

### 60 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los procesos para establecer las bibliotecas de extractos microbianos.

La Figura 2 muestra una visión general del proceso de extracción de los presentes péptidos.

65 La Figura 3 muestra una micrografía de barrido electrónico de *Nonomuraea* sp. MJM5123 que ha crecido en medio ISP3 durante 2 semanas a 28 °C.

La Figura 4 muestra el resultado del análisis de hidrolizado de células completas *Nonomuraea sp.* MJM5123.

La Figura 5 muestra un perfil lípido polar de *Nonomuraea sp.* MJM5123. Las placas se pulverizaron con ácido molibdatofosfórico para detectar los lípidos totales (a), ninhidrina para detectar aminolípidos (b), azul de molibdeno para detectar fosfolípidos (c), y ácido  $\alpha$ -naftosulfúrico para detectar glucolípidos (d).

La Figura 6 muestra un análisis filogenético, basado en las secuencias del ADNr de 16S disponibles de la base de datos NCBI, construida a partir de múltiples alineamientos de datos mediante CLUSTAL-X [Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997, 25, 4876-4882].

La Figura 7 muestra el gráfico de biomasa y actividad de los compuestos anti-TB en la fermentación principal (DCW; peso de células secas, PMV; volumen de micelio empaquetado, actividad; zona de inhibición del crecimiento frente a *Mycobacterium smegmatis* ml2155 mediante un ensayo de difusión en disco de papel).

La Figura 8 muestra cristales de H-14 crecidos usando un método de evaporación lenta. La dimensión más grande fue de aproximadamente 0,5 mm.

La Figura 9 muestra una estructura 3D de H-14.

La Figura 10 muestra un mapa de densidad electrónica de restos seleccionados, triptófano (W10), fenilalanina (F12), treonina (T5) e isoleucina (I3) a una resolución de 0,83.

La Figura 11 muestra la disposición estructural del péptido H-14 cíclico de la presente invención.

La Figura 12 muestra la disposición estructural del péptido H-16 cíclico de la presente invención. La Figura 13 muestra los restos de aminoácidos especiales en las Figuras 15 y 16.

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

Las realizaciones prácticas y realmente preferidas de la presente invención son ilustrativas como se muestran en los siguientes Ejemplos.

Sin embargo, se apreciará que los expertos en la materia, tras la consideración de la presente memoria descriptiva, pueden realizar modificaciones y mejoras comprendidas en el espíritu y el alcance de la presente invención.

### Ejemplo 1: Preparación de bibliotecas de extractos microbianos para cribado de alto rendimiento

Se aislaron aproximadamente 7.000 aislados de actinomicetos de muestras de suelo recogidas en zonas con condiciones ecológicas y meteorológicas tales como las regiones alpinas, regiones tropicales, regiones polares, volcanes y otros, y se puede mantener mediante el The Extract Collection of Useful Microorganisms (ECUM) en la Myongji University de Corea. Se prepararon nueve tipos diferentes de extractos a partir de cada aislado para el cribado de candidatos contra la tuberculosis. En primer lugar, cada aislado se cultivó con 30 ml de G.S.S, medio de Bennett, de GYC. Tras separar los micelios del caldeo de cultivo mediante centrifugación, el micelio se extrajo con metanol y el sobrenadante del cultivo se repartió entre acetato de etilo y agua, respectivamente. Finalmente, nueve extractos orgánicos y acuosos de cada aislado microbiano cultivado en tres medios se concentraron hasta sequedad mediante evaporación al vacío y se conservó en un congelador fuerte a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Figura 1, Figura 2 y Tabla 1).

Tabla 1

[Tabla 1]

|  |
|--|
| Tres medios principales para actinomicetos |
| <b>&lt;1&gt; Medio G.S.S.</b>              |
| Almidón soluble 10 g                       |
| Glucosa 20 g                               |
| Harina de soja 25 g                        |
| Extracto de ternera 1 g                    |
| Extracto de levadura 4 g                   |
| NaCl 2 g                                   |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,25 g            |
| $\text{CaCO}_3$ 2 g                        |
| D.W. 1 l                                   |
| pH 7,2                                     |
| <b>&lt;2&gt; Medio de Bennett</b>          |
| Glucosa 10 g                               |
| Extracto de levadura 1 g                   |
| Bacto-peptona 2 g                          |
| Extracto de ternera 1 g                    |
| <b>&lt;3&gt; Medio DyC</b>                 |
| Dextrina 25 g                              |

|  |
|--|
| Tres medios principales para actinomicetos |
| Levadura seca 12 g                         |
| CSL 20 g                                   |
| NaBr 1 g                                   |
| CoC <sub>2</sub> 1 g                       |
| pH 7,0                                     |
| <b>&lt;3&gt; Medio de coloración</b>       |
| D.W. 1 l                                   |

**Ejemplo 2: Cribado a gran escala**

5 Cada aislado de actinomiceto del ECUM se fermentó inicialmente en cultivos de 20 ml en tres medios de cultivo diferentes: G.S.S. (medio rico), medio de Bennett y GyC (medio mínimo). El micelio se extrajo con metanol, y el sobrenadante del cultivo con acetato de etilo, que posteriormente se repartió con agua, produciendo nueve extractos por aislado. Se secaron alícuotas de 100 µl y se enviaron desde la Myongji University a la UIC en placas de 96 pocillos, se solubilizaron en 100 µl de DMSO y se diluyó a 1:100 en cultivos de ensayo. El HTS de ~63,000 extractos produjo 349 extractos (0,55 %) con =90 % de inhibición de *M. tuberculosis* en medio 7H12 (ácido palmítico como fuente de C) determinado mediante lecturas fluorométricas en el ensayo en microplaca con azul alamar (MABA).  
10 Noventa de los éxitos iniciales se volvieron a fermentar en escala de 1 l en ECUM, y los extractos se fraccionaron posteriormente en UIC con extracción en medio sólido con gel de sílice en fase invertida con un gradiente de MeOH-agua de 20-100 % seguido por CHCl<sub>3</sub> al 100 % para dar seis fracciones por extracto. Las fracciones se perfilaron biológicamente en términos de: 1.) toxicidad para células de mamífero (células VERO Cl<sub>50</sub>); 2.) actividad contra *M. tuberculosis* no replicante (LORA); 3.) actividad contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampina (RMP), isoniazida (INH), estreptomycin (SM), kanamicina (KM), capreomicina (CAP), cicloserina (CS), (para asegurar que los inventores no están simplemente encontrando de nuevo estos antibióticos derivados de actinomicetos) o moxifloxacin (Mox) y 4.) actividad contra *M. smegmatis*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*. Basándose en estos resultados, se priorizaron 20 cepas de actinomicetos para investigación adicional.

**Ejemplo 3: Identificación de MJM5123**Determinación de las características morfológicas y de cultivo

25 Se aisló MJM5123 de una muestra de suelo recogida en Mount Halla, Corea. El género de la cepa se identificó mediante la morfología característica y el análisis químico de los componentes de la pared celular. Para determinar las características morfológicas y de cultivo, la cepa se hizo crecer durante 2 semanas a 28 °C en el medio del International Streptomyces Project (ISP) (Shirling, E. B. y D. Gottlieb, Methods for characterization of Streptomyces species. Int J Syst Evol Microbiol. 1966 16(Pt 3): 313-330) tal como agar de extracto de malta con extracto de levadura (ISP2), agar de harina de avena (ISP3), agar de almidón con sales inorgánicas (ISP4), agar de asparagina glicerol (ISP5). Se determinaron los colores de las colonias utilizando el Color Harmony Manual (Jacobson, E., W. C. Grauville, et al., Color Harmony Manual. 1958. Chicago, Container Corporation of America). Se observaron las esporas y los micelios mediante microscopio de barrido electrónico (Hitachi, S-3500 N, Japón) (Figura 3).

35 Tabla 2

[Tabla 2]

| Características del cultivo de MJM5123 |  |
|--|--|
| Medio de agar                          | <i>Nonomuraea</i> sp. MJM5123                              |
|  | Crecimiento / color inverso / micelio aéreo / esporulación |
| Extracto de malta-levadura (ISP2)      | ++/beige/-/-   |
| Harina de avena (ISP3)                 | +/beige/+/+/+  |
| Sales-almidón (ISP4)                   | +/beige/-/-  |
| ISP5                                   | +/beige/-/-  |
| ISP6                                   | +/beige/-/-  |
| Tirosina (ISP7)                        | +/beige/-/-  |

40 El crecimiento y la esporulación del micelio aéreo se puntuaron como: ++, bueno; +, moderado; ±, malo; -, sin crecimiento ni formación de esporas

45 La cepa creció bien sobre medio ISP2 y mostró crecimiento moderado sobre los otros medios. El color del micelio vegetativo y del micelio aéreo fue beige sin pigmento difusible. Se formaron esporas de color blanco solamente en el medio de harina de avena (ISP3) y la micrografía de barrido electrónico mostró cadenas en forma de espiral de esporas rugosas en el micelio aéreo.

Para ensayar los pigmentos melanoides, se utilizó agar de hierro y extracto de lavadura con peptona (ISP6) y agar de tirosina (ISP7, con o sin tirosina). Se determinaron el intervalo de temperatura, la tolerancia al NaCl y el intervalo de pH para el crecimiento sobre medio ISP3 y se llevó a cabo el ensayo de resistencia a antibióticos sobre medio ISP2 durante 2 semanas a 28 °C.

5

Tabla 3

[Tabla 3]

| Características fisiológicas de <i>Nonomuraea sp.</i> MJM5123                         |    |
|---|----|
| Crecimiento en NaCl (%)   |    |
| 0   | ++ |
| 1   | ++ |
| 2   | +  |
| 3   | ++ |
| 4   | -  |
| Crecimiento a la temperatura (°C)   |    |
| 15  | -  |
| 20  | +  |
| 25  | +  |
| 28  | ++ |
| 37  | ++ |
| 45  | -  |
| Crecimiento a pH  |    |
| 5   | ++ |
| 6   | ++ |
| 6,8   | ++ |
| 7,2   | ++ |
| 9   | ++ |
| Pigmento melanina   |    |
| Con tirosina  | -  |
| Sin tirosina  | -  |
| Las características se puntuaron como (++) , positivo; (+) , moderado; (-) , negativo |    |

10 MJM5123 asimiló la tirosina como fuente nutriente sin producir melanina, y la cepa fue capaz de crecer a pH 5,0-9,0 y 0-3,0 % de NaCl y mostró un buen crecimiento a 20°C-37°C. MJM5123 fue susceptible a apramicina, kanamicina, vancomicina y tioestreptón, pero resistente a ampicilina.

Tabla 4

15

[Tabla 4]

|  |   |
|--|---|
| Crecimiento en presencia de antibióticos (50 µg/ml)                  |   |
| Resistencia a antibióticos (µg/ml)                                   |   |
| Apramicina (50)  | - |
| Kanamicina (50)  | - |
| Ampicilina (50)  | + |
| Vancomicina (50)   | - |
| Tioestreptón (50)  | - |
| Las características se puntuaron como (+) , positivo; (-) , negativo |   |

Se usó el medio de agar ISP9 como medio basal para examinar la utilización de hidratos de carbono como únicas fuentes de carbono. Se esterilizaron las soluciones madre (10 % p/v) de hidratos de carbono (Sigma Aldrich, CAR10) mediante filtración y se añadieron a medio ISP9 autoclavado a una concentración final del 1,0 %. MJM5123 utilizó hexosas, pentosas, alcoholes azucarados y disacáridos (Tabla 5).

20

Tabla 5

25

[Tabla 5]

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Utilización de hidratos de carbono |         |
| Utilización de:                    | MJM5123 |
| Glucosa                            | ++      |

| Utilización de hidratos de carbono  |    |
|---|----|
| Arabinosa   | ++ |
| Sacarosa  | ++ |
| Xilosa  | ++ |
| Inositol  | +  |
| Manitol   | ++ |
| Fructosa  | ++ |
| Ramnosa   | ++ |
| Rafinosa  | +  |
| Las características se puntuaron como (++) , positivo; (+) , moderado; (-) , negativo |    |

#### Determinación de los caracteres quimiotaxonómicos

5 Para la caracterización quimiotaxonómica de los componentes de la pared celular, se preparó micelio criodesecado por crecimiento en caldo de soja tripticasa (TSB) en un agitador rotatorio durante 7 días a 28 °C. Se determinaron los esteroisómeros del ácido diaminopicomélico (DAP) y glicina [Becker, B.; Lechevalier, M. P.; Gordon, R. E.; Lechevalier, H.A. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol* 1964, 12, 421-423]. Se precitaron 5 mg de células secas en una ampolla pequeña junto con 1 ml de ácido clorhídrico 6 N. La ampolla se almacenó durante la noche a 100 °C en un horno. El hidrolizado enfriado por aire se filtró a través de un papel de filtro Whatman n.º 1. El filtrado se concentró hasta sequedad y se disolvió en 0,3 ml de agua destilada. 2 µl de la solución se inmunotransfirieron a una placa de TLC (Merck, placa de vidrio TLC de Celulosa F n.º 105718) y se revelaron con el sistema disolvente metanol:agua destilada:HCl 6 N:piridina (80:26:4:10, vol/vol) durante 4 horas. Tras el secado al aire, se pulverizó solución de ninhidrina al 0,2 % (en acetona) y se calentó a 100 °C durante 3 min para revelar las transferencias. 1 µl de D,L-DAP 0,1 M (Sigma Aldrich, N.º D-1377) y 1 µl de glicina 0,1 M (Sigma Aldrich, N.º 50046) se utilizaron como patrones auténticos. Las transferencias de glicina y de D,L-DAP se visualizaron de color gris-verde.

20 Se llevó a cabo el análisis de sacáridos con el método de Lechevalier levemente modificado. 50 mg de células secas se sometieron a ebullición durante 2 horas en una ampolla precintada con 2,0 ml de ácido sulfúrico 1 N. El hidrolizado enfriado se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 50 ml y se ajustó el pH a 5,4 mediante hidróxido de bario saturado. Tras la centrifugación, el sobrenadante se concentró a 0,3 ml y se eliminaron las partículas no resueltas mediante centrifugación. Se cargó 1 µl de la solución sobre una placa TLC (Merck, placa de vidrio TLC Cellulose F n.º 105718). El primer patrón de sacáridos (Sigma Aldrich, car10) que contenía xilosa, arabinosa, galactosa; y el segundo (Sigma Aldrich, CAR10) que contenía ramnosa, ribosa, manosa, glucosa, se aplicaron cada uno a una concentración de 1 % con el sistema disolvente n-butanol:agua destilada:piridina:tolueno (10:6:6:1, vol/vol) durante 4 horas. Tras pulverizar solución de ftalato de anilina, (3,25 g de hidrogenoftalato de anilina (TCI-GR, N.º P0284) disueltos en 100 ml de butanol saturado en agua) la placa de TLC se calentó a 100 °C durante 4 min. La glicina y D,L-DAP eran constituyentes del peptidoglicano de MJM5123 y los azúcares principales en los hidrolizados de células completa fueron xilosa, galactosa, manosa, glucosas (Figura 4).

30 Se extrajeron los lípidos polares y las menaquinonas mediante el método de Minnikin et al. [Minnikin, D. E.; O'Donnella, A. G.; Goodfellowb, M.; Aldersonb, G.; Athalyeb, M.; Schaala, A.; Parlett, J. H. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 1984, 2, 233-241]. 2 ml de metanol:agua destilada (100:10, vol/vol) y 2 ml de éter de petróleo se añadieron a 50 mg de células secas y se mezclaron durante 15 min. La capa superior se transfirió a un nuevo vial. Se añadió 1 ml de éter de petróleo a la capa inferior y se mezcló. Las capas superiores combinadas se evaporaron con nitrógeno gaseoso a temperatura ambiente y el residuo se usó para el análisis de menaquinonas. Los lípidos polares se extrajeron de la capa inferior. La capa inferior se calentó en un baño de agua en ebullición durante 5 min. Después se enfrió a 37 °C, se añadieron 2,3 ml de cloroformo:metanol:agua (90:100:30 vol/vol) y se mezcló durante 60 min. Tras la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La capa inferior se extrajo mezclándola con 0,75 ml de una solución de cloroformo:metanol:agua (50:100:40, vol/vol) durante 5 min y el sobrenadante separado se combinó con el tubo anterior. Esta etapa se repitió una vez más. El sobrenadante recogido se mezcló intensamente con 1,3 ml de cloroformo y 1,3 ml de una solución de cloruro de sodio al 0,3 %. Tras repartir mediante centrifugación, se descartó la capa superior y se secó la capa inferior bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. El extracto de lípidos polares se disolvió en 60 µl de cloroformo:metanol (2,1, vol/vol), y 10 µl de solución se transfirieron a una placa TLC (Merck, placa de vidrio TLC con gel de sílice 60 F254 n.º 105729) y se identificó según un método TLC bidimensional utilizando cloroformo:metanol:agua destilada (65:25:4, vol/vol) y cloroformo:ácido acético:metanol:agua destilada (40:7.5:6:2, vol/vol) como disolventes de revelado. Se visualizaron los lípidos polares mediante pulverización con cuatro reactivos, solución de ácido fosfomolibdico al 5 % (Sigma Aldrich, P4869), solución de ninhidrina al 0,2 % en butanol saturado con agua (Sigma Aldrich, N4876), ácido a-naftol sulfúrico y azul de molibdeno (Sigma Aldrich, M1942).

El análisis de los lípidos polares reveló que el lípido polar de MJM5123 comprendía fosfatidiletanolamina (PE), difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidil-monometiletanolamina (PME), fosfatidilinositol manósido (PIM), un fosfolípido

desconocido (PL) y un lípido polar desconocido (L) (Figura 5).

Se analizaron los ácidos grasos celulares utilizando el sistema de identificación microbiano (MIDI, versión 4.5) combinado con cromatografía de gases y se identificó con la base de datos ACTIN6. El principal ácido graso celular fue iso-C16:0 (25,5 %); se detectaron también otros ácidos grasos diversos (Tabla 6).

5

Tabla 6

[Tabla 6]

| La composición de ácidos grasos de MJM5123 |              |
|--|--------------|
| Ácido graso                                | MJM 5123 (%) |
| 16:0 ISO                                   | 25,5         |
| 17:1 CIS 9                                 | 10,5         |
| 15:00                                      | 10,1         |
| 16:00                                      | 9,6          |
| 15:0 ISO                                   | 9,3          |
| 16:1 CIS 9                                 | 4,3          |
| 17:0 10 METILO                             | 3,9          |
| 17:00                                      | 3,0          |
| 16:0 ISO 2OH                               | 2,9          |
| 16:1 ISO G                                 | 2,6          |
| 14:00                                      | 2,4          |
| 14:0 ISO                                   | 2,2          |
| 16:0 10 METILO                             | 1,6          |
| 17:0 ANTEISO                               | 1,6          |
| 17:0 ISO                                   | 1,4          |
| 15:0 ANTEISO                               | 1,2          |

10

Los valores son porcentajes de los ácidos grasos celulares totales. No se muestran las cantidades traza menores de 1,0 %

#### Análisis filogenético

15

Se amplificó el ADN<sub>r</sub> de 16S procedente del ADN genómico de MJM5123 con una pareja de cebadores de 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', SEQ. ID. NO: 1) y 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', SEQ. ID. NO: 2). Se secuenció el ADN amplificado utilizando los mismos cebadores que anteriormente en un secuenciador de ADN capilar ABI 3730XL (Applied Biosystems, EE.UU.). La comparación asistida por ordenador del ADN<sub>r</sub> de 16S se llevó a cabo utilizando el NCBI BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

20

Se construyó un árbol filogenético mediante un método de reunión de vecinos utilizando el programa informático MEGA4.0. Se generó el soporte de las ramas del árbol filogenético mediante un arranque de 1.000 replicaciones.

25

De acuerdo con la búsqueda BLAST, la secuencia del ADN<sub>r</sub> de 16S mostró un 98 % de similitud con *Nonomuraea rubra* DSM 43768T, *Nonomuraea roseola* DSM 43767T y un 97 % de similitud con *Nonomuraea dietziae* DSM 44320T. El análisis filogenético reveló que MJM5123 pertenecía a la familia *Nonomuraea*, pero se localizó en un subclado diferente de las cepas relacionadas estrechamente.

30

Se obtuvieron las distancias (usando las opciones de distancia de acuerdo con el modelo Kimura-2) y se llevó a cabo el agrupamiento, utilizando el método de reunión de vecinos, usando el paquete informático MEGA versión 4.0. Los valores de arranque, basados en 1.000 replicaciones, se relacionan como porcentajes en el punto de ramificación. La barra indica 0,002 sustituciones por nucleótido (Figura 6).

35

#### Relación del ADN con cepas estrechamente relacionadas

Se evaluó la relación ADN-ADN con cepas estrechamente relacionadas mediante el análisis fluorométrico utilizando el método de hibridación en microplacas. Los valores de la relación ADN-ADN fueron 34-65 % indicando que MJM5123 representaba una especie genómica separada (Tabla 7).

40

Tabla 7

[Tabla 7] Hibridación DNA-DNA

| Taxón   | MJM5123 (%) |
|---------|-------------|
| MJM5123 | 100         |

| Taxón                                     | MJM5123 (%) |
|---|-------------|
| <i>N. dietziae</i> DSM 44320 <sup>T</sup> | 65          |
| <i>N. roseola</i> DSM 43767 <sup>T</sup>  | 65          |
| <i>N. rubra</i> DSM 43768 <sup>T</sup>    | 34          |

Los presentes inventores han depositado la *Nonomuraea* sp. MJM5123 en la Korean Collection for Type Cultures (KCTC) del Korea Research Institute of Biotechnology and Bioscience (KRIBB) el 3 de abril de 2012 (n.º de acceso: KCTC 12178BP).

5

#### Ejemplo 4: Optimización del proceso de fermentación

Para mejorar la productividad de los péptidos anti-TB, se desarrolló un proceso de fermentación y un medio económico. La cepa MJM5123 puede utilizar una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno tales como glucosa, fructosa, maltosa, galactosa, xilosa, sacarosa, glicerol, aceite de soja, almidón, dextrina, aminoácidos, extracto de levaduras, caseína pancreática digerida, extracto de carne, peptona, extracto de malta, harina de avena, harina de soja, harina de soja digerida enzimáticamente, harina de semillas de algodón, líquido de maceración de maíz, sales inorgánicas y similares. MJM5123 creció en un amplio intervalo de temperaturas y pH (entre 20°C y 40°C, pH 5,0-9,0). Es por tanto ventajoso ajustar el pH del medio inicial a 7,2 antes de la inoculación. El crecimiento y título más eficaces se consiguieron cuando la temperatura de la fermentación se mantuvo a 34 °C. Se desarrollaron un procedimiento de fermentación en tres etapas y los medios para cada etapa para conseguir una producción económica y fácil de procesar posteriormente, de la siguiente forma;

10

15

Tabla 8

20

[Tabla 8] Medio de activación (AM)

| Ingrediente                          | Cantidad (%) |
|--------------------------------------|--------------|
| Almidón soluble                      | 2,000        |
| Extracto de levadura                 | 0,500        |
| Extracto de carne                    | 0,300        |
| Triptona                             | 0,500        |
| CaCO <sub>3</sub>                    | 0,200        |
| CoCl <sub>2</sub>                    | 0,0001       |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,050        |
| NE-302                               | 0,05         |

Tabla 9

[Tabla 9]

| Medio de cultivo iniciador (SC)                 |              |
|---|--------------|
| Ingrediente                                     | Cantidad (%) |
| Glucosa   | 1,000 %      |
| Dextrina  | 3,000 %      |
| Soytone   | 1,000 %      |
| Harina de semillas de maíz                      | 0,500 %      |
| Extracto de levadura                            | 0,500 %      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 0,100 %      |
| CaCO <sub>3</sub>                               | 0,400 %      |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,086 %      |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0,010 %      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,100 %      |
| Aceite de soja                                  | 0,080 %      |
| NE-302  | 0,050 %      |

25 Tabla 10

[Tabla 10]

| Medio de fermentación principal (MF) |              |
|--------------------------------------|--------------|
| Ingrediente                          | Cantidad (%) |
| Glucosa                              | 2,000 %      |
| Almidón soluble                      | 6,000 %      |
| Licor de maíz fermentado             | 1,600 %      |

| Medio de fermentación principal (MF) |         |
|--------------------------------------|---------|
| Harina de semillas de maíz           | 0,600 % |
| Extracto de levadura                 | 0,800 % |
| Soytone                              | 1,250 % |
| CaCO <sub>3</sub>                    | 0,300 % |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,100 % |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,086 % |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 0,010 % |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,001 % |
| L-Valina                             | 0,050 % |
| NE-302                               | 0,050 % |

5 Para un procesamiento rutinario y reproducible, los micelios vegetativos congelados (FVM) se prepararon de la siguiente forma; Se inoculó un único micelio en crecimiento sobre medio ISP 3 durante 7 días a 28 °C en un matraz con pantallas deflectoras de 500 ml que contenía 70 ml de medio SC y se incubó a 34 °C con una velocidad de agitación de 200 rpm durante 3 días. El caldo de cultivo completo se mezcló intensamente con glicerol al 50 % y la mezcla de micelios vegetativos-glicerol se almacenó a -80 °C hasta el uso.

10 El FVM a un 10 % en v/v se usó para iniciar el cultivo de activación. La etapa de activación se llevó a cabo a 34 °C con una velocidad de agitación de 200 rpm durante 54 horas. A lo largo de esta etapa de activación, el volumen del micelio empaquetado (PMV) fue del 15 % y el pH estaba a 7,58. El caldo de cultivo vegetativo activo inicial se usó para sembrar el cultivo a un 10 % v/v. El segundo cultivo iniciador se mantuvo a 34 °C con una velocidad de agitación de 200 rpm durante 60 horas. El PMV y el pH fueron 43 %, 7,48, respectivamente. El caldo de cultivo iniciador se transfirió al medio de fermentación principal a un 10 % en v/v. La fermentación principal se llevó a cabo a 34 °C con una velocidad de agitación de 600 rpm y 0,3 vvm durante 144 horas. El PMV final fue del 80 % a pH de 8,20 y el azúcar total fue inferior al 1,8 %. El proceso de fermentación dio como resultado 373 mg/l de H-14 (Figura 7).

#### **Ejemplo 5: Aislamiento de novedosos péptidos anti-TB, H-14 y H-16, derivados de *Nonomuraea sp.* MJM5123**

##### 20 Ejemplo de aislamiento 1:

La cepa MJM5123, una de las 20 cepas de actinomicetos priorizadas, se fermentó a gran escala y sus fracciones activas se aislaron en el ejemplo 1 con el método descrito a continuación.

25 El extracto metanólico micelial a gran escala de la cepa E5123 se sometió a procesos de fraccionamiento químico, en paralelo con la caracterización biológica usando la toxicidad celular de células MABA, LORA y Vero para realizar un seguimiento la actividad y el índice de selectividad. El fraccionamiento y el aislamiento de los componentes activos implicaron tres etapas de separación cromatográfica. La cromatografía líquida al vacío (VLC) del extracto (128,7 g) sobre gel de sílice en fase invertida usando un gradiente de agua/metanol en etapas del 20 % dio como resultado siete fracciones químicamente distintas VC-1 a 7. Se observaron MIC de < 0,76, 0,74 µg/ml para fracciones de VC-6 y 7 eluyendo con metanol al 100 % y cloroformo al 100 %, respectivamente. VC-6 y 7 se recombinaron (8,47 g) y se separaron adicionalmente en 81 fracciones en una columna Sephadex LH-20 abierta con metanol al 100 % como eluyente, dando como resultado un panel de 11 fracciones recombinadas, S-1 a 11 (mediante TLC). Los MIC fueron < 0,21 µg/ml para las subfracciones S-2 y S-3. S-3 (374 mg) se separó en 110 fracciones mediante cromatografía a alta velocidad en contracorriente (HSCCC) seleccionándose HEMWat+2 como el sistema disolvente más adecuado mediante el método GUESS [Kubo, I. Recent applications of counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products. J Chrom 1991, 538, 187-191]. Estas fracciones se recombinaron en un panel de 11 fracciones de H'-1 a H'-11. Los MIC fueron < 0,391 µg/ml para las subfracciones H-4, H-6, H-8, y H-9. S-2 (177 mg) se separó adicionalmente en 140 fracciones mediante HSCCC con HEMWat+2, y se recombinó en un panel de 26 fracciones, H-1 a H-24. Los MIC fueron < 0,51 µg/ml para H-3, H-5, H-7, H-9 a H-23. Entre las fracciones de péptidos activos, H-14 y H-16 (8 mg, rendimiento = 0,4 mg/l) fueron las más puras según el análisis de RMN <sup>1</sup>H y, por tanto, se seleccionaron para elucidación estructural. Tras recombinar H-11 a H-15 y H'-6 a H'-8 de acuerdo con la similitud de sus espectros de RMN <sup>1</sup>H, se obtuvieron 189 mg de H-14 (aprox. 80 % puro) (rendimiento = 9,45 mg/l). La cantidad total de péptidos activos es aproximadamente de 369 mg, rendimiento = 18 mg/l.

##### Ejemplo de aislamiento 2:

50 Los compuestos anti-TB producidos por fermentación de MJM5123 se retienen principalmente en el interior de la célula. Los compuestos anti-B se extrajeron de la torta micelial; esta última se recogió del procedimiento de fermentación, como se ha descrito anteriormente, mediante filtración del caldo de fermentación completo. La extracción de la torta micelial fue más eficaz con metanol, pero se pueden emplear otros disolventes orgánicos tales como etanol, n-propanol, isopropanol, acetonitrilo, acetona, diclorometano, acetato de etilo, cloroformo, y similares.

Los compuestos activos contra la tuberculosis brutos se recuperaron de la solución de extracción mediante un proceso rutinario que incluye la evaporación del extracto en un volumen adecuado y el reparto disolvente-disolvente.

5 El extracto de metanol se concentró al vacío a 37 °C y se añadió agua desionizada a la solución concentrada para conseguir metanol al 70 %. La mezcla de agua se desgrasó por reparto con n-hexano y la solución desgrasada se diluyó con un volumen de agua desionizada. Esta se extrajo con un volumen de cloroformo y la capa de cloroformo que contenía los compuestos activos contra la tuberculosis se limpió mediante agitación con agua desionizada. El secado de la capa de cloroformo proporcionó un sólido de color amarillento que se disolvió a continuación en metanol al 100 % y se aplicó a Sephadex™ LH-20 equilibrada con metanol al 100 %. Los compuestos activos contra la tuberculosis se combinaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño con una elución de metanol al 100 %. H-14 y H-16, que demostraron una potente actividad anti-TB, se purificaron completamente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento utilizando una columna C-18 en fase invertida y una solución acuosa de acetonitrilo al 35 % tamponada con fosfato de sodio 20 mM (pH 8,0) como fase móvil. Las fracciones purificadas se evaporaron para eliminar el acetonitrilo y extraerse con cloroformo. Finalmente, las capas de cloroformo se concentraron hasta sequedad, y las H-14 y H-16 muy purificadas se sometieron a estudio adicional que incluía la determinación de la estructura y la actividad contra la tuberculosis *in vitro*.

#### Ejemplo 6: Elucidación de la estructura de los péptidos H-14 cíclicos anti-TB

20 H-14 es un metabolito de *Nonomuraea sp.* MJM5123 que se obtiene mediante extracción de MeOH de los micelios. La fórmula molecular de H-14 es C<sub>83</sub>H<sub>134</sub>O<sub>17</sub>N<sub>14</sub> tal como se determina mediante RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y datos de espectrometría de masas de alta resolución.

25 Se aisló H-14 como un polvo de color amarillo claro ópticamente activo. El espectro de masas de alta resolución mostró un pico del ion positivo [M+H]<sup>+</sup> a 1600,0189 *m/z*, y un pico del ion positivo [M+Na]<sup>+</sup> a 1621,9982 *m/z*, indicando una masa exacta de 1599,0111. El espectro IR sugiere la presencia de múltiples restos amida (1632,16 cm<sup>-1</sup>). El espectro UV sugiere que H-14 es un péptido con restos aromáticos, con bandas de absorción a 211 nm (= 54209 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 48, 25°C, en metanol), 219 nm (= 55266 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 48, 25°C, en metanol), 263 nm (= 7925 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 48, 25°C, en metanol), 281 nm (= 6465 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 48, 25°C, en metanol), y 291 nm (= 5839 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 48, 25°C, en metanol). El espectro CD sugiere que H-14 es un péptido de estructura en lámina β antiparalela, con elipticidad molar de 1918530 deg cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup> a 220 nm (25°C, en acetonitrilo) y 616094 deg cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup> a 196 nm (25°C, en acetonitrilo).

35 A pesar del tamaño relativamente grande de esta molécula, el espectro de RMN mostró una dispersión de la señal aceptable y ha sido por tanto una fuente valiosa de información estructural. El espectro de RMN <sup>1</sup>H en metanol-*d*<sub>3</sub> presentó 8 señales de protón intercambiables entre 9,20 y 7,72 ppm que se desvanecieron tras el intercambio en metanol completamente deuterado. Además, aparecieron señales en la región aromática que codificaban un grupo fenilo y otro sistema aromático, y se encontraron dobletes a 0,73 a 1,33 ppm que correspondían a 20 grupos metilo alifáticos. De forma sorprendente para el caso de un péptido, aparecieron siete singletes a 2,16, 2,31, 3,14, 3,23, 3,26, 3,33, y 3,82 ppm indicando 8 grupos N-metilo y/o metoxi, debido a que un singlete a 2,31 ppm está integrado por 2 grupos metilo. La distribución de señales con dobletes en la región protónica de la amida y señales que cubren el intervalo completo entre 5,4 y 0,7 ppm es una indicación clara de que el compuesto investigado es indudablemente un péptido.

45 La evidencia espectroscópica adicional que respalda la clasificación del compuesto como un péptido se derivó del espectro de RMN <sup>13</sup>C, que reveló un total de 12 señales carbonilo (amida-) en el intervalo entre 170,92 y 175,14 ppm, que corresponde a 13 carbonos carbonilo. Utilizando los experimentos de DEPT135 y HSQC, se identificaron 34 señales metino, 3 metileno, y 28 metilo. Estas señales, junto con 5 señales de carbono cuaternario a 155,23, 142,68, 140,04, 118,36, y 112,47 ppm indicaron un total de 83 carbonos presentes en H-14.

50 El análisis extenso de los espectro 2D de RMN de H-14, especialmente los basados en los experimentos COSY, TOCSY, HSQC, HMBC y en los experimentos de HMBC semiselectivos dio como resultado la elucidación de 15 sistemas de espines discretos <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H:: N,N-Me<sub>2</sub>-Val, Val<sup>1</sup>, N-Me-*L-allo*-Ile, *L*-Thr, N-Me-*L*-Thr, *L*-Val<sup>2</sup>, N-Me-*L*-Leu, *L*-Val<sup>3</sup>, N-Me-*L*-Val, N-Me-4-OMe-*L*-Trp a, N-Me-4-OMe-*L*-Trp b, *L*-Val<sup>4</sup>, *R*-β-OH-*L*-Phe a, *R*-β-OH-*L*-Phe b and *L*-Val<sup>5</sup>. En la Tabla 11 se proporciona la asignación <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C detallada. Las señales de <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H de los grupos metilo de los extremos se encuentran en regiones densamente pobladas. Los espectros de RMN <sup>13</sup>C presentaron 14 señales de carbono que representaban 14 carbonos en un intervalo de 0,94 ppm entre 19,10 ppm y 20,04 ppm, y los espectros de RMN <sup>1</sup>H presentaron 17 señales de protones que representaban 47 protones en un intervalo de 0,14 ppm entre 0,85 ppm y 1,09 ppm. La resolución de los experimentos de HSQC y HMBC no es suficientemente alta para establecer una conectividad entre estas señales, de tal manera que los inventores introdujeron el experimento de HMBC semiselectivo, con rendimientos de alta resolución en la dimensión <sup>13</sup>C indirecta suprimiendo las modulaciones de acoplamiento de protones homonucleares. La conectividad H-C directa se desarrolló usando correlaciones de enlace simple <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H extraídas de un experimento de HMBC semiselectivo. Se observaron dichas correlaciones con una constante de acoplamiento de alrededor de 126 Hz a lo largo de la dirección F2. Los grupos metilo estaban conectados a sus sistemas de espines utilizando respectivamente correlaciones a larga distancia de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C entre las señales de protones del metilo y normalmente señales de β-carbono, y las señales de carbono del

metilo y normalmente señales de  $\beta$ -protones, extraídos de un experimento de HMBC semiselectivo.

Se estableció la conectividad dentro de las unidades de N-Me-4-OMe-L-Trp y R- $\beta$ -OH-L-Phe utilizando correlaciones a larga distancia de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  extraídas del experimento de HMBC. Dichas correlaciones de HMBC se observaron para N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^4$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^\beta$ , R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{H}^2$  / R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{C}^\beta$ , y R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{H}^5$  / R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{C}^\beta$ .

Se determinó también la posición del grupo metoxi de N-Me-4-OMe-L-Trp analizando las correlaciones de HMBC. Se observaron correlaciones de HMBC para N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^{12}$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^{10}$ , N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^8$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^6$ , N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^7$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^{11}$ , N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^9$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^{11}$ .

Se determinaron las posiciones de los grupos N-metilo analizando las correlaciones de HMBC. Se observaron las correlaciones de (i, i)  $\text{H}^{\text{NMe}}$ ,  $\text{C}\alpha$  y/o (i, i-1)  $\text{H}^{\text{NMe}}$ ,  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , se observaron correlaciones HMBC para N,N-Me<sub>2</sub>-Val  $\text{H}^6(7)$  / N,N-Me<sub>2</sub>-Val  $\text{C}^\alpha$ , N-Me-L-*allo*-Ile  $\text{H}^7$  / Val<sup>1</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-*allo*-Ile  $\text{H}^7$  / N-Me-L-*allo*-Ile  $\text{C}^\alpha$ , N-Me-L-Thr  $\text{H}^5$  / L-Thr  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Thr  $\text{H}^5$  / N-Me-L-Thr  $\text{C}^\alpha$ , N-Me-L-Leu  $\text{H}^7$  / L-Val<sup>2</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Leu  $\text{H}^7$  / N-Me-L-Leu  $\text{C}^\alpha$ , N-Me-L-Val  $\text{H}^6$  / L-Val<sup>3</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Val  $\text{H}^6$  / N-Me-L-Val  $\text{C}^\alpha$ , N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^{13}$  / N-Me-L-Val  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^{13}$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^\alpha$ .

La mayoría de los restos aminoácidos individuales se enlazaron con posterioridad secuencialmente mediante correlaciones a larga distancia de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , excepto las unidades N,N-Me<sub>2</sub>-Val and / N-Me-L-Leu. Para cada resto aminoácido se observaron dos correlaciones entre  $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , (i, i)  $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{C}^{\text{C=O}}$  e (i, i-1)  $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , que determinan junto la conectividad de unión al péptido; mientras que solo se observó una correlación entre  $\text{H}^\beta$ ,  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , que determina el grupo carbonilo del resto. De nuevo se empleó un experimento de HMBC semiselectivo, debido a que los experimentos de HMBC no pueden resolver la región carbonilo densamente poblada con señales  $^{13}\text{C}$  presentadas en un intervalo de 4,23 ppm entre 170,91 ppm a 175,14 ppm. Se observaron correlaciones para N,N-Me<sub>2</sub>-Val  $\text{H}^\alpha$  / N,N-Me<sub>2</sub>-Val  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N,N-Me<sub>2</sub>-Val  $\text{H}^\beta$  / N,N-Me<sub>2</sub>-Val  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , Val<sup>1</sup>  $\text{H}^\alpha$  / Val<sup>1</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , Val<sup>1</sup>  $\text{H}^\beta$  / Val<sup>1</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-*allo*-Ile  $\text{H}^\alpha$  / N-Me-L-*allo*-Ile  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-*allo*-Ile  $\text{H}^\beta$  / N-Me-L-*allo*-Ile  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Thr  $\text{H}^\alpha$  / L-Thr  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Thr  $\text{H}^\beta$  / L-Thr  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Thr  $\text{H}^\alpha$  / N-Me-L-Thr  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Thr  $\text{H}^\beta$  / L-Thr  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Thr  $\text{H}^\beta$  / N-Me-L-Thr  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>2</sup>  $\text{H}^\alpha$  / L-Val<sup>2</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>2</sup>  $\text{H}^\beta$  / L-Val<sup>2</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N,N-Me-L-Leu  $\text{H}^\alpha$  / N-Me-L-Leu  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Leu  $\text{H}^\beta$  / N-Me-L-Leu  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>3</sup>  $\text{H}^\alpha$  / L-Val<sup>3</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>3</sup>  $\text{H}^\beta$  / L-Val<sup>3</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Val  $\text{H}^\alpha$  / N-Me-L-Val  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Val  $\text{H}^\beta$  / L-Val<sup>3</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-L-Val  $\text{H}^\beta$  / N-Me-L-Val  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^\alpha$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{H}^\beta$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>4</sup>  $\text{H}^\alpha$  / L-Val<sup>4</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>4</sup>  $\text{H}^\beta$  / N-Me-4-OMe-L-Trp  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>4</sup>  $\text{H}^\beta$  / L-Val<sup>4</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{H}^\alpha$  / R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{H}^\beta$  / L-Val<sup>4</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{H}^\beta$  / R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>5</sup>  $\text{H}^\alpha$  / L-Val<sup>5</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>5</sup>  $\text{H}^\beta$  / R- $\beta$ -OH-L-Phe  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , L-Val<sup>5</sup>  $\text{H}^\beta$  / L-Val<sup>5</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ . Las señales de  $^{13}\text{C}$  de los grupos carbonilo procedentes de NMe<sub>2</sub>-Val y NMe-L-Leu se solaparon a 173,29 ppm, dejando la conectividad de Val<sup>1</sup>  $\text{H}^\alpha$  and L-Val<sup>3</sup>  $\text{H}^\alpha$  con los grupos carbonilo sin determinar, quedando de esta manera dos posibles estructuras para H-14.

Además, se observó una correlación de HMBC entre L-Thr  $\text{H}^\beta$  y L-Val<sup>5</sup>  $\text{C}^{\text{C=O}}$ , sugiriendo que H-14 era un depsipéptido cíclico ciclado entre el carboxilo del extremo C y la cadena secundaria de un resto de L-Thr.

Estos datos, junto con un peso molecular de 1599,0111 determinado mediante espectrometría de masas de alta resolución son consistentes con la fórmula molecular  $\text{C}_{83}\text{H}_{134}\text{N}_{14}\text{O}_{17}$ .

Sin embargo, la conexión entre N,N-Me<sub>2</sub>-Val y L-Val<sup>1</sup> se confirmó con el análisis del espectro de masas en tándem de H-14 que muestra el fragmento iónico  $[\text{N,N-Me}_2\text{-Val} + \text{L-Val}^1 + / \text{N-Me-L-}i\text{-allo-Ile}]^+ \text{ at } m/z \text{ 354.32}$ .

Los siguientes fragmentos que ayudaron a establecer la secuencia de la molécula se detectaron en el espectro de masas en tándem:  $m/z$  (int. rel.) 1600,23  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (8), 1246,95  $[\text{M} - \text{N,N-Me}_2\text{-Val-L-Val}^1 - / \text{N-Me-L-}i\text{-allo-Ile} + 2\text{H}]^+$  (48), 990,86  $[\text{M}-\text{N,N-Me}_2\text{-Val-L-Val}^1 - / \text{N-Me-L-}i\text{-allo-Ile} - \text{L-Thr} - \text{L-Val}^5 + 2\text{H}]^+$  (7), 800,60  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  (50), 610,41  $[\text{N,N-Me}_2\text{-Val} + \text{L-Val}^1 + / \text{N-Me-L-}i\text{-allo-Ile} + \text{L-Thr} + \text{L-Val}^5]^+$  (36), 354,32  $[\text{N,N-Me}_2\text{-Val} + \text{L-Val}^1 + / \text{N-Me-L-}i\text{-allo-Ile}]^+$  (87).

Tabla 11

[Tabla 11]

| Datos de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de H-14 en $\text{CD}_3\text{OD}$ |   |                           |                 |                    |   |                           |                 |
|--|---|---------------------------|-----------------|--------------------|---|---------------------------|-----------------|
| Aminoácido   |   | $^1\text{H}$ J (Hz)       | $^{13}\text{C}$ | Aminoácido         |   | $^1\text{H}$ J (Hz)       | $^{13}\text{C}$ |
| N,N-Me <sub>2</sub> -Val   | 1 |                           | 173,29          | L-Val <sup>3</sup> | 1 |                           | 173,39          |
|  | 2 | 2,67 (d, 9,2)             | 75,62           |                    | 2 | 4,59 (d, 8,9)             | 55,34           |
|  | 3 | 2,04 (ddd, 9,2, 6,6, 6,6) | 28,83           |                    | 3 | 2,03 (ddd, 8,9, 6,6, 6,8) | 32,88           |
|  | 4 | 2,31 (s)                  | 42,24           |                    | 4 | 0,92 (d, 6,6)             |                 |

ES 2 575 981 T3

| Datos de RMN de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de H-14 en CD <sub>3</sub> OD |    |                                  |                 |                    |       |  |
|--|----|----------------------------------|-----------------|--------------------|-------|--|
| Aminoácido   |    | <sup>1</sup> H J (Hz)            | <sup>13</sup> C | Aminoácido         |       | <sup>13</sup> C                              |
|  | 5  | 2,31 (s)                         | 42,24           |                    | 5     | 0,86 (d, 6,8)                                |
|  | 6  | 0,85 (d, 6,6)                    | 19,36           |                    | NH    | 9,07 (d, 9,5) <sup>b</sup>                   |
|  | 7  | 0,98 (d, 6,6)                    | 20,04           |                    |       |  |
| L-Val <sup>1</sup>   | 1  |                                  | 174,93          | N-Me-L-Va 1        | 1     | 170,91                                       |
|  | 2  | 4,67 (d, 8,8)                    | 55,78           |                    | 2     | 3,07 (d, 7,6)                                |
|  | 3  | 2,10 (ddd, 8,8, 6,8,6,7)         | 31,65           |                    | 3     | 2,58 (ddd, 7,6, 6,5, 6,8)                    |
|  | 4  | 0,99 (d, 6,8)                    | 19,61           |                    | 4     | 0,98 (d, 6,8)                                |
|  | 5  | 1,06 (d, 6,7)                    | 19,36           |                    | 5     | 1,09 (d, 6,5)                                |
|  | NH | 8,17 (d, 8,2) <sup>b</sup>       |                 |                    | 6     | 3,14 (s)                                     |
| N-Me-L -allo-Ile   | 1  |                                  | 172,62          | N-Me-4-0 MeL-Trp   | 1     | 171,62                                       |
|  | 2  | 4,92 (d, 11,2)                   | 59,24           |                    | 2     | 4,10 (dd, 11,2, 4,7)                         |
|  | 3  | 1,95 (dddd, 11,2, 0,5, 2,9, 6,6) | 34,32           |                    | 3     | 3,54 (dd, 11,2, 13,7)                        |
|  | 4  | 0,99 (ddd, 0,5, -12,2,7,3)       | 26,61           |                    |       | 3,69 (dd, 4,7, -13,7)                        |
|  |    | 1,26 (ddd, 2,9, -12,2,7,6)       |                 |                    | 4     | 112,5  |
|  | 5  | 0,75 (dd, 7,3, 7,6)              | 11,48           |                    | 5     | 6,69 (d, 2,0, 0,5)                           |
|  | 6  | 0,74 (d, 6,6)                    | 15,09           |                    | NH    | 10,22 (d, 2,0)                               |
|  | 7  | 3,23 (s)                         | 31,40           |                    | 6     | 140  |
|  |    |                                  |                 |                    | 7     | 6,92 (d, 0,5, 0,7,8,2)                       |
|  |    |                                  |                 |                    | 8     | 6,98 (dd, 8,2, 7,8)                          |
|  |    |                                  |                 |                    | 9     | 6,44 (d, 0,7, 7,8)                           |
|  |    |                                  |                 |                    | 10    | 155,2  |
|  |    |                                  |                 |                    | 11    | 118,4  |
|  |    |                                  |                 |                    | 12    | 3,83 (s)                                     |
|  |    |                                  |                 |                    | 13    | 2,16 (s)                                     |
| L-Thr  | 1  |                                  | 171,95          | L-Val <sup>4</sup> | 1     | 174,14                                       |
|  | 2  | 5,17 (d, 2,3)                    | 53,57           |                    | 2     | 4,53 (d, 7,9)                                |
|  | 3  | 5,78 (dd, 2,3, 6,5)              | 69,84           |                    | 3     | 2,20 (ddd, 7,9, 6,7, 6,8)                    |
|  | 4  | 1,31 (d, 6,5)                    | 16,76           |                    | 4     | 1,03 (d, 6,7)                                |
|  | NH | 8,50 (d, 9,1) <sup>b</sup>       |                 |                    | 5     | 0,99 (d, 6,8)                                |
|  |    |                                  |                 |                    | NH    | 7,85 (d, 9,6) <sup>b</sup>                   |
| N-Me-L -Thr  | 1  |                                  | 171,21          | R-β-OH-L-Phe       | 1     | 173,76                                       |
|  | 2  | 5,02 (d, 3,7)                    | 62,90           |                    | 2     | 4,85 (d, 1,9)                                |
|  | 3  | 4,46 (dd, 3,7, 6,5)              | 66,90           |                    | 3     | 5,34 (d, 1,9)                                |
|  | 4  | 0,91 (d, 6,5)                    | 19,91           |                    | 4     | 142,8  |
|  | 5  | 3,33 (s)                         | 34,32           |                    | 5, 9  | 7,26 <sup>a</sup>                            |
|  |    |                                  |                 |                    | 6, 8, | 7,24 <sup>a</sup>                            |
|  |    |                                  |                 |                    | 7 NH  | 7,20 <sup>a</sup> 8,30 (d, 7,8) <sup>b</sup> |
| L-Val <sup>2</sup>   | 1  |                                  | 174,75          | L-Val <sup>5</sup> | 1     | 175,14                                       |
|  | 2  | 4,84 (d, 8,9)                    | 56,78           |                    | 2     | 4,40 (d, 8,9)                                |
|  | 3  | 2,35 (ddd, 8,9, 6,7, 7,0)        | 31,78           |                    | 3     | 1,97 (m, 8,9, 6,8,6,4)                       |
|  | 4  | 1,09 (d, 6,7)                    | 19,64           |                    | 4     | 0,92 (d, 6,4)                                |
|  | 5  | 0,98 (d, 7,0)                    | 19,70           |                    | 5     | 0,93 (d, 6,8)                                |
|  | NH | 7,73 (d, 8,6) <sup>b</sup>       |                 |                    | NH    | 9,02 (d, 9,9) <sup>b</sup>                   |
| N-Me-L -Leu  | 1  |                                  | 173,28          |                    |       |  |
|  | 2  | 5,11 (dd, 6,2, 8,4)              | 55,59           |                    |       |  |
|  | 3  | 1,24 (ddd, 8,4, -13,3,5,8)       | 39,33           |                    |       |  |
|  |    | 1,45 (ddd, 6,2, -13,3, 8,2)      |                 |                    |       |  |

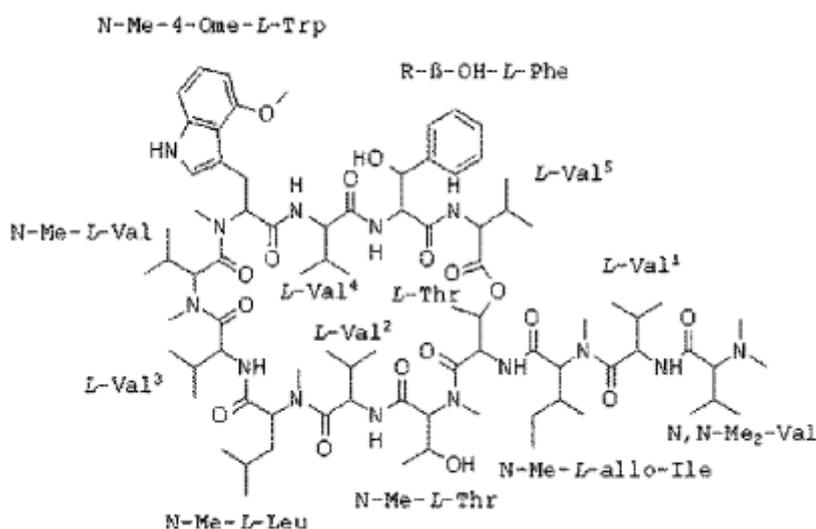
| Datos de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de H-14 en $\text{CD}_3\text{OD}$ |   |                                 |                 |            |                     |                 |
|--|---|---------------------------------|-----------------|------------|---------------------|-----------------|
| Aminoácido   |   | $^1\text{H}$ J (Hz)             | $^{13}\text{C}$ | Aminoácido | $^1\text{H}$ J (Hz) | $^{13}\text{C}$ |
|  | 4 | 0,96 (dddd, 8,2, 5,8, 6,5, 6,6) | 25,64           |            |                     |                 |
|  | 5 | 0,17 (d, 6,6)                   | 21,69           |            |                     |                 |
|  | 6 | 0,33 (d, 6,5)                   | 23,48           |            |                     |                 |
|  | 7 | 3,26 (s)                        | 31,63           |            |                     |                 |

<sup>a</sup> La multiplicidad de las señales es incierta debido al solapamiento.  
<sup>b</sup> Datos obtenidos del experimento de RMN  $^1\text{H}$  en metanol-*d*.

La estructura del H-14 aislado y purificado de MJM5123 (*Nonomuraea* sp.) se muestra en la fórmula 1. La figura 11 muestra la disposición estructural del péptido H-14 cíclico.

5

[Fórmula 1]



#### Cristalización y determinación de la estructura

10

Se obtuvo un cristal en forma de aguja de H-14 en MeOH: MeCN: Agua = (1:1:0,5) usando un método de evaporación lenta durante 57 días. Las dimensiones del cristal fueron aproximadamente 0,1 x 0,15 x 0,5 mm. Los datos de rayos X se recogieron a temperatura ambiente en un sistema de rayos X Bruker 08, y el cristal difractó los rayos X a 0,83. El cristal pertenecía al grupo espacial ortorrómbico  $P2_12_12$  con parámetros de la celdilla unidad,  $a=71,64$ ,  $b=11,43$ ,  $c=12,70$ . Existe una molécula en la unidad asimétrica (Figura 8 y Tabla 12).

15

Tabla 12

[Tabla 12] Estadística de recogida de datos

|  |   |
|--|---|
| Longitud de onda de los rayos X (Å)    | Mo K $\alpha$ ( $\lambda = 0,71073$ Å) (Bruker) |
| Temperatura (K)                        | 296,15  |
| Grupo espacial                         | $P2_12_12$                                      |
| Parámetros de la celdilla unitaria (Å) | $a = 71,64$ Å                                   |
|  | $b = 11,43$ Å                                   |
|  | $c = 12,70$ Å                                   |
| Límite de resolución (Å)               | 0,83  |

20

El problema de fase se resolvió mediante métodos iterativos directos de espacio doble partiendo de una distribución aleatoria de átomos con el programa informático ShelxD. El modelo inicial generado a partir de ShelxD se corrigió de acuerdo con la estructura 2D de H-14 y se añadieron las moléculas de agua según un mapa de densidad electrónica inicial generado con un programa gráfico, WinCoot. Finalmente, se obtuvo un modelo refinado reduciendo el factor R a 0,1723 con los programas de refinamiento ShelXL o Refmac. Como se muestra en la Figura 9, la estructura global de H-14 es similar a una estructura antiparalela de tipo horquilla doble. Cinco enlaces H entre los grupos C=O y N-H de la cadena principal estabilizan la estructura global. Además, las moléculas de agua circundantes también participan en la formación de enlaces H. A partir de esta estructura de rayos X y el resultado del método de Marfey

25

(no se muestran los datos), los investigadores concluyeron que H-14 consiste en su totalidad de L-aminoácidos o sus análogos. Todos los aminoácidos no convencionales sugeridos por el análisis de RMN también se confirmaron mediante examen de la posición de cada átomo usando el mapa de densidad electrónica (Figura 9 y Figura 10).

5 **Ejemplo 7: Elucidación de la estructura de los péptidos H-16 cíclicos anti-TB**

H-16 es otro metabolito de *Nonomuraea sp.* M5123 que se obtiene del extracto MeOH de los micelios. La fórmula molecular de H-16 es C<sub>83</sub>H<sub>134</sub>O<sub>16</sub>N<sub>14</sub> tal como se determina mediante RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y datos de masa de alta resolución.

10 H-16 se obtuvo en forma de un polvo amorfo de color amarillo. [El espectro de masas de alta resolución mostró un pico del ion positivo [M+H]<sup>+</sup> a 1584,0227 m/z, y un pico del ion positivo [M+Na]<sup>+</sup> a 1606,0035 m/z, indicando una masa exacta de 1583,0149. El espectro de masas de alta resolución y los datos de RMN <sup>13</sup>C fueron consistentes con la fórmula molecular C<sub>83</sub>H<sub>134</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>. Los datos de RMN <sup>1</sup>H indicaron que H-16 también era un péptido. Las asignaciones detalladas de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se proporcionan en la Tabla 13. La identificación mediante espectroscopia de RMN de H-16 se realizó de forma análoga a la de H-14. En el proceso, los sistemas de espín de los restos de aminoácidos identificaron, de nuevo, mediante interpretación de los espectros de RMN 2D, incluyendo los espectros COSY, TOCSY, HSQC y HMBC. Los restos de aminoácidos individuales se vincularon secuencialmente sin ambigüedad a través de correlaciones de HMBC y HMBC semiselectivas. Se observaron ese tipo de correlaciones para N,N-Me<sub>2</sub>-Val H<sup>α</sup>/N,N-Me<sub>2</sub>-Val C<sup>C=O</sup>, N,N-Me<sub>2</sub>-Val H<sup>β</sup>/N,N-Me<sub>2</sub>-Val C<sup>C=O</sup>, Val<sup>1</sup>H<sup>α</sup>/Val<sup>1</sup>C<sup>C=O</sup>, Val<sup>1</sup>H<sup>α</sup>/N,N-Me<sub>2</sub>-Val C<sup>C=O</sup>, Val<sup>1</sup>H<sup>β</sup>/Val<sup>1</sup>C<sup>C=O</sup>, N-Me-IleH<sup>α</sup>/N-Me-Ile C<sup>C=O</sup>, N-Me-Ile H<sup>α</sup>/ Val<sup>1</sup> C<sup>C=O</sup>, N-Me-IleH<sup>β</sup> / N-Me-Ile C<sup>C=O</sup>, Thr H<sup>α</sup>/Thr C<sup>C=O</sup>, Thr H<sup>α</sup> / N-Me-Ile C<sup>C=O</sup>, Thr H<sup>β</sup>/Thr C<sup>C=O</sup>, N-Me-Thr H<sup>α</sup> / N-Me-Thr C<sup>C=O</sup>, N-Me-Thr H<sup>α</sup>/Thr C<sup>C=O</sup>, N-Me-Thr H<sup>β</sup> / N-Me-Thr C<sup>C=O</sup>, Val<sup>2</sup>H<sup>α</sup>/Val<sup>2</sup>C<sup>C=O</sup>, Val<sup>2</sup>H<sup>α</sup> / N-Me-Thr C<sup>C=O</sup>, Val<sup>2</sup>H<sup>β</sup>/Val<sup>2</sup>C<sup>C=O</sup>, N-Me-Leu H<sup>α</sup> / N-Me-Leu C<sup>C=O</sup>, N-Me-Leu H<sup>α</sup>/Val<sup>2</sup>C<sup>C=O</sup>, N-Me-Leu H<sup>β</sup> / N-Me-Leu C<sup>C=O</sup>, Val<sup>3</sup>H<sup>α</sup>/Val<sup>3</sup>C<sup>C=O</sup>, Val<sup>3</sup>H<sup>α</sup> / N-Me-Leu C<sup>C=O</sup>, Val<sup>3</sup>H<sup>β</sup>/Val<sup>3</sup>C<sup>C=O</sup>, N-Me-Val H<sup>α</sup> / N-Me-Val C<sup>C=O</sup>, N-Me-Val H<sup>α</sup>/Val<sup>3</sup>C<sup>C=O</sup>, N-Me-Val H<sup>β</sup> / N-Me-Val C<sup>C=O</sup>, N-Me-4-OMe-Trp H<sup>α</sup> / N-Me-4-OMe-Trp C<sup>C=O</sup>, N-Me-4-OMe-Trp H<sup>α</sup>/NMe-Val C<sup>C=O</sup>, N-Me-4-OMe-Trp H<sup>β</sup> / N-Me-4-OMe-Trp C<sup>C=O</sup>, Val<sup>4</sup>H<sup>α</sup>/Val<sup>4</sup>C<sup>C=O</sup>, Val<sup>4</sup>H<sup>α</sup> / N-Me-4-OMe-Trp C<sup>C=O</sup>, Val<sup>4</sup>H<sup>β</sup>/Val<sup>4</sup>C<sup>C=O</sup>, Phe H<sup>α</sup>/Phe C<sup>C=O</sup>, Phe H<sup>α</sup>/Val<sup>4</sup>C<sup>C=O</sup>, Phe H<sup>β</sup>/ Phe C<sup>C=O</sup>, Val<sup>5</sup>H<sup>α</sup>/Val<sup>5</sup>C<sup>C=O</sup>, Val<sup>5</sup>H<sup>α</sup>/Phe C<sup>C=O</sup>, Val<sup>5</sup>H<sup>β</sup>/Val<sup>5</sup>C<sup>C=O</sup>.

30 Tabla 13

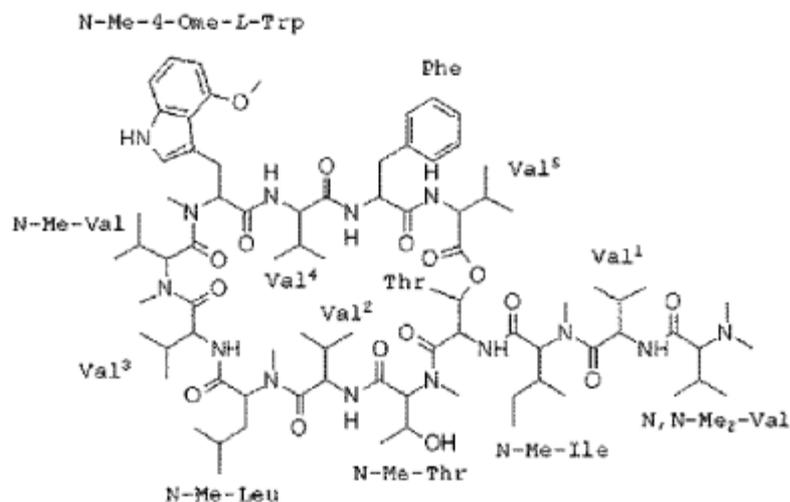
[Tabla 13]

| Datos de RMN de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de H-16 en CD <sub>3</sub> OD |   |                       |                 |                  |        |                       |        |
|--|---|-----------------------|-----------------|------------------|--------|-----------------------|--------|
| Aminoácido   |   | <sup>1</sup> H J (Hz) | <sup>13</sup> C | Aminoácido       |        | <sup>13</sup> C       |        |
| N,N-Me <sub>2</sub> -Val   | 1 |                       | 173,35          | Val <sup>3</sup> | 1      | 173,63                |        |
|  | 2 | 2,67 (d, 8,8)         | 75,78           |                  | 2      | 4,59 (d, 9,2)         | 55,59  |
|  | 3 | 2,07 (m)              | 28,49           |                  | 3      | 2,04 (m)              | 32,74  |
|  | 4 | 2,32 (s)              | 42,40           |                  | 4      | 0,97 (d, 6,2)         | 19,66  |
|  | 5 | 2,32 (s)              | 42,40           |                  | 5      | 0,87 (d, 6,5)         | 19,40  |
|  | 6 | 0,85 (d, 6,6)         | 19,36           |                  |        |                       |        |
|  | 7 | 0,98 (d, 6,6)         | 20,12           |                  |        |                       |        |
| Val <sup>1</sup>   | 1 |                       | 174,96          | N-Me-Val         | 1      | 171,09                |        |
|  | 2 | 4,66 (d, 8,5)         | 55,76           |                  | 2      | 3,06 (d, 7,4)         | 71,60  |
|  | 3 | 2,08 (m)              | 31,57           |                  | 3      | 2,61 (m)              | 31,57  |
|  | 4 | 0,99 (d, 6,8)         | 19,61           |                  | 4      | 0,97 (d, 6,2)         | 19,75  |
|  | 5 | 1,06 (d, 6,7)         | 19,36           |                  | 5      | 1,10 (d, 6,6)         | 22,04  |
|  |   |                       |                 |                  | 6      | 3,13 (s)              | 40,51  |
| N-Me-Ile   | 1 |                       | 172,86          | N-Me-4-O Me-Trp  | 1      | 171,57                |        |
|  | 2 | 4,94 (d, 11,7)        | 61,60           |                  | 2      | 4,09 (dd, 10,8, 4,1)  | 71,09  |
|  | 3 | 1,96 (m)              | 34,42           |                  | 3      | 3,56 (dd, 10,8, 13,5) | 22,87  |
|  | 4 | 1,00 (m)              | 26,36           |                  |        | 3,70 (dd, 4,1, 13,5)  |        |
|  |   | 1,25 (m)              |                 |                  | 4      |                       | 113,30 |
|  | 5 | 0,72 (t, 7,7)         | 19,36           |                  | 5      | 6,70 (d, 2,0)         | 124,90 |
|  | 6 | 0,75 (d, 5,2)         | 15,19           |                  | NH     | 10,22 (d, 2,0)        |        |
|  | 7 | 3,24 (s)              | 31,52           |                  | 6      |                       | 140,90 |
|  |   |                       |                 |                  | 7      | 6,92 (d, 8)           | 107,00 |
|  |   |                       |                 |                  | 8      | 6,98 (dd, 8, 7,8)     | 124,30 |
|  |   |                       |                 |                  | 9      | 6,44 (d, 7,8)         | 100,80 |
|  |   |                       |                 |                  | 10     |                       | 156,00 |
|  |   |                       | 11              |                  | 118,90 |                       |        |
|  |   |                       | 12              | 3,82 (s)         | 55,74  |                       |        |

| Datos de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de H-16 en $\text{CD}_3\text{OD}$ |   |                     |                 |                  |      |                       |
|--|---|---------------------|-----------------|------------------|------|-----------------------|
| Aminoácido   |   | $^1\text{H}$ J (Hz) | $^{13}\text{C}$ | Aminoácido       |      | $^{13}\text{C}$       |
|  |   |                     |                 |                  | 13   | 2,16 (s)              |
| Thr  | 1 |                     | 171,92          | Val <sup>4</sup> | 1    | 174,11                |
|  | 2 | 5,13 (d, 2,5)       | 53,37           |                  | 2    | 4,40 (d, 8,5)         |
|  | 3 | 5,76 (dd, 2,5, 6,3) | 70,80           |                  | 3    | 2,19 (m)              |
|  | 4 | 1,32 (d, 6,7)       | 17,80           |                  | 4    | 0,98 (d, 6,5)         |
|  |   |                     |                 |                  | 5    | 1,04 (d, 6,9)         |
| N-Me-Thr   | 1 |                     | 171,42          | Phe              | 1    | 174,29                |
|  | 2 | 5,04 (d, 3,6)       | 63,92           |                  | 2    | 4,78 (dd, 2,1, 10,4)  |
|  | 3 | 4,44 (m)            | 67,83           |                  | 3    | 3,37 (dd, 2,1, 15,0)  |
|  | 4 | 1,10 (d, 6,6)       | 20,76           |                  |      | 2,84 (dd, 10,4, 15,0) |
|  | 5 | 3,33 (s)            | 35,28           |                  | 4    | 140,90                |
|  |   |                     |                 |                  | 5, 9 | 7,09 (d, 7,0)         |
|  |   |                     |                 |                  | 6,8, | 7,21 (dd, 7,0, 7,55)  |
|  |   |                     |                 |                  | 7    | 7,15 (d, 7,5)         |
| Val <sup>2</sup>   | 1 |                     | 174,93          | Val <sup>5</sup> | 1    | 175,45                |
|  | 2 | 4,82 (d, 9,5)       | 56,87           |                  | 2    | 4,36 (d, 9,2)         |
|  | 3 | 2,40 (m)            | 31,84           |                  | 3    | 1,97 (m)              |
|  | 4 | 1,09 (d, 6,7)       | 19,64           |                  | 4    | 1,04 (d, 6,9)         |
|  | 5 | 0,98 (d, 7,0)       | 19,70           |                  | 5    | 0,98 (d, 6,5)         |
| N-Me-Leu   | 1 |                     | 173,54          |                  |      |                       |
|  | 2 | 5,15 (dd, 6,3, 8,4) | 56,80           |                  |      |                       |
|  | 3 | 1,27 (m)            | 40,50           |                  |      |                       |
|  |   | 1,43 (m)            |                 |                  |      |                       |
|  | 4 | 0,97 (m)            | 26,52           |                  |      |                       |
|  | 5 | 0,21 (d, 6,6)       | 21,96           |                  |      |                       |
|  | 6 | 0,32 (d, 6,2)       | 23,54           |                  |      |                       |
|  | 7 | 3,25 (s)            | 31,63           |                  |      |                       |

La estructura de H-16 aislado y purificado a partir de MJM5123 se muestra en la fórmula 2. La Figura 12 muestra la disposición estructural del péptido H-14 cíclico.

5 [Fórmula 1]



Ejemplo experimental 1: MIC y MBC de H-14 y H-16 contra *M. tuberculosis* en condiciones aerobias

- 10 La actividad inhibidora de H-14 y H-16 contra *M. tuberculosis* se determinó usando el ensayo en microplaca con azul alamar [Collins, L. and S.G. Franzblau, Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium. Antimicrob Agents Chemother, 1997. 41(5): p. 1004-9; Hurdle, J.G., et al., A microbiological assessment of novel Nitrofuranyl amides as anti-tuberculosis agents. J Antimicrob Chemother, 2008. 62(5): p. 1037-45]. Los valores de
- 15 MIC (concentración inhibitoria mínima necesaria para inhibir el crecimiento en un 90 %) y de MBC<sub>99</sub> (concentración

mínima que destruye el 99 % de los organismos) para H-14 y H-16 se midieron en condiciones aerobias con la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv se muestran en la Tabla 14.

El MBC<sub>99</sub> de cada compuesto es solo aproximadamente dos veces mayor que su MIC, por tanto, H-14 y H-16 deberían clasificarse como bactericidas.

Tabla 14

[Tabla 14]

| Valores de MIC y MBC aeróbicos contra <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv |      |      |
|---|------|------|
|   | H-14 | H-16 |
| MIC (µM)  | 0,16 | 0,16 |
| MBC <sub>99</sub> (µM)  | 0,34 | 0,19 |

10 *M. tuberculosis* es un organismo clónico, que no intercambia información genética de una célula a otra. Durante su evolución simultánea con los seres humanos, se generaron varios linajes diferentes, o clados, y son prominentes en diferentes partes del planeta [Filliol, I., et al., Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. J Bacteriol, 2006. 188(2): p. 759-72;

15 Gagneux, S. and P.M. Small, Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. Lancet Infect Dis, 2007. 7(5): p. 328-37].

La Tabla 15 presenta los valores de MIC de H-14 y H-16 contra seis cepas de *M. tuberculosis* que representan diversidad geográfica/genética, con la cepa de laboratorio H<sub>37</sub>Rv como referencia. Los valores de MIC de H-14 y H-16 contra estas seis cepas son comparables con sus valores de MIC contra la H<sub>37</sub>Rv natural, lo que sugiere que son muy eficaces.

Tabla 15

[Tabla 15]

| Valores de MIC contra aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> diferentes genética y geográficamente Clados |   |  |                    |          |      |
|--|---|--|--------------------|----------|------|
| MIC (µM)   | <i>M. tuberculosis</i> Clado              | Situación geográfica                             | Código de la cepa  | MIC (µM) |      |
|  |   |  |                    | H-14     | H-16 |
| vs.  | H <sub>37</sub> Rv                        |  | H <sub>37</sub> Rv | 0,38     | 0,37 |
|  | Océano Índico                             | África Oriental, Sudeste Asiático, Sur de India  | X003899            | 0,23     | 0,19 |
|  | Asia Oriental                             | Asia Oriental, Rusia, Sudáfrica                  | X004439            | 0,29     | 0,19 |
|  |   |  | X004244            | 0,13     | 0,09 |
|  | Euro-americana                            | Américas, Europa, Norte de África, Oriente Medio | X005282            | 0,14     | 0,14 |
|  |   |  | X005319            | 0,36     | 0,34 |
| África oriental India  | África Oriental, Norte de India, Pakistán | X001354  | 0,38               | 0,37     |      |

#### Ejemplo experimental 2: MBC de H-14 y H-16 contra *M. tuberculosis* en condiciones de bajo contenido de oxígeno

La actividad bactericida de H-14 y H-16 contra *M. tuberculosis* no replicante en condiciones de bajo contenido de oxígeno se determinó usando el ensayo de recuperación en condiciones de bajo contenido de oxígeno (LORA) [Cho, S.H., et al., Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against non-replicating Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother, 2007. 51(4): p. 1380-5] con lecturas de ufc. La concentración que consigue un 99 % de reducción en la viabilidad de *M. tuberculosis* tras 10 días de incubación en condiciones sin réplica fue de aproximadamente 1,5 µM para ambos H-14 y H-16. Este valor bajo de MBC sugiere que H-14 y H-16 tienen el potencial de reducir la duración del tratamiento de la tuberculosis inhibiendo una subpoblación de bacterias persistentes no replicantes.

#### Ejemplo experimental 3: Selectividades antibacterianas de H-14 y H-16

Las selectividades de H-14 y H-16 se determinaron por cribado de las mismas contra *Escherichia coli*, una bacteria Gram negativa, *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram positiva, *Candida albicans*, una levadura, y seis especies de micobacterias (Tabla 16). Ninguno de los compuestos mostró actividad antimicrobiana con *E. coli*, *S. aureus*, y *C. albicans*. Ambos compuestos son activos contra *M. kansasii* con valores de MIC inferiores a 0,4 µM, contra *M. avium* con valores de MIC inferiores a 1,0 µM, contra *M. chelonae* y *M. marinum* con valores de MIC inferiores a 2,0 µM, contra *M. smegmatis* con valores de MIC inferiores a 4,0 µM, pero son significativamente menos activos contra *M. abscessus*. El resultado sugiere que H-14 y H-16 son compuestos antimicobacterianos selectivos.

Tabla 16

50

[Tabla 16]

| Valores de MIC contra otras especies de micobacterias, y prototipos de especies Gram positivas, Gram negativas, y de levadura (datos de la UIC) |                |                  |                    |                      |                 |                  |                 |              |                |
|---|----------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------|------------------|-----------------|--------------|----------------|
|   | MIC (µM) vs.   |                  |                    |                      |                 |                  |                 |              |                |
|   | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>Mycobacterium</i> |                 |                  |                 |              |                |
|   |                |                  |                    | <i>S. smegmatis</i>  | <i>chelonae</i> | <i>abscessus</i> | <i>kansasii</i> | <i>avium</i> | <i>marinum</i> |
| H-14  | > 32           | > 32             | > 32               | 1,74                 | 0,97            | > 63             | < 0,24          | 0,35         | 0,95           |
| H-16  | > 32           | > 32             | > 32               | 3,64                 | 1,82            | > 32             | < 0,12          | 0,55         | 0,97           |

Ejemplo experimental 4: Unión a proteína y toxicidad contra células de mamíferos

- 5 La unión a proteínas puede afectar la farmacocinética de un compuesto, y finalmente afecta a su eficacia reduciendo la cantidad de principio activo no unido. Los valores de MIC de H-14 y H-16 contra *M. tuberculosis* se determinaron en presencia de albúmina de suero de ternera (BSA) al 4 % y sin suplemento adicional de proteína (BSA al 0,4 %) como referencia (Tabla 17). En presencia de FBS al 10 % o de BSA al 4 %, los valores de MIC solamente aumentaron dos veces, lo que sugiere que la unión a proteínas no debería afectar negativamente a su eficacia.

10

Tabla 17

[Tabla 17]

| Efecto de la unión a proteínas sobre los valores de MIC, medidos con <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv (Datos de la UIC) |                                     |            |             |
|--|-------------------------------------|------------|-------------|
|  | MIC vs. <i>M. tuberculosis</i> (µM) |            |             |
|  | BSA al 0,5 %                        | BSA al 4 % | FBS al 10 % |
| H-14   | 0,16                                | 0,58       | 0,36        |

- 15 Las citotoxicidades de H-14 y H-16 frente a células de mamíferos se evaluaron por ensayo frente a células Vero, una línea celular de riñón de mono verde africano (Tabla 18). No se descubrió citotoxicidad para ninguno de los compuestos, incluso a las mayores concentraciones de ensayo (32 µM).

20

Tabla 18

[Tabla 18]

| Toxicidad frente a células de mamíferos |                                   |                             |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|
|   | Célula Vero CI <sub>50</sub> (µM) | Índice de selectividad (SI) |
| H-14                                    | > 32                              | > 620                       |
| H-16                                    | > 32                              | > 620                       |

Ejemplo experimental 5: Valor de MIC de H-14 y H-16 frente a un panel de cepas de *M. tuberculosis* resistente a monofármaco generadas en el laboratorio

25

H-14 and H-16 se sometieron a ensayo frente a un panel de cepas de *M. tuberculosis*. isogénica para H<sub>37</sub>Rv. resistentes a rifampina (RMP), isoniazida (INH), moxifloxacin (Mox), estreptomycin (SM), kanamicina (KM), cicloserina (CS), o capreomicina (CAP) respectivamente (Tabla 19). Ambos compuestos mantuvieron su nivel de actividad frente a todas estas cepas de *M. tuberculosis* resistentes a monofármaco. lo que sugiere que no existe resistencia cruzada con los fármacos contra la tuberculosis actual y, por tanto, se trata de un novedoso mecanismo de acción que será igualmente adecuado contra las infecciones por *M. tuberculosis* sensibles a fármacos y resistentes a fármacos.

30

Tabla 19

35

[Tabla 19]

| Valores de MIC contra <i>M. tuberculosis</i> resistente a monofármaco generada en el laboratorio. Cepas (Datos de la UIC) |                    |   |        |      |        |        |        |      |
|---|--------------------|---|--------|------|--------|--------|--------|------|
|   | MIC (µM) vs.       |   |        |      |        |        |        |      |
|   | H <sub>37</sub> Rv | <i>M. tuberculosis</i> cepas resistentes a: |        |      |        |        |        |      |
|   |                    | RMP   | INH    | MOX  | SM     | KM     | CS     | CAP  |
| H-14  | 0,16               | 0,19  | < 0,12 | 0,31 | < 0,12 | < 0,12 | < 0,12 | 0,29 |
| H-16  | 0,16               | 0,18  | < 0,12 | 0,3  | < 0,12 | < 0,12 | < 0,12 | 0,3  |

En conclusión, tanto H-14 y H-16 tienen perfiles de actividad *in vitro* anti-TB comparables, si es que no son mejores, que los fármacos de primera línea contra la tuberculosis sin toxicidad celular *in vitro* para células de mamífero a 100

5 veces su valor MBC. Los valores de MIC contra *M. tuberculosis* replicante son 0,16 µM, 0,16 µM, 0,09 µM y 0,47 µM para H14, H16, rifampina e isoniazida, respectivamente. Los índices de selectividad (células VERO, CI<sub>50</sub>/*M. tuberculosis*. MIC) de H-14 y H-16 son, en ambos casos, >620. Este nivel de actividad se mantiene contra cepas isogénicas de *M. tuberculosis* resistente a rifampina, isoniazida, estreptomycin, kanamicina, cicloserina y contra el péptido cíclico, capreomicina, así como para los aislados clínicos representativos de los clados globales. Los valores de MIC contra *M. tuberculosis* replicante son 0,34 µM y 0,19 µM para H-14 y H-16, respectivamente, indicando que ambos son fuertes agentes bactericidas. Ambos compuestos reducen la viabilidad de la *M. tuberculosis* no replicante en una log<sub>10</sub> a aproximadamente 1,5 µM en LORA, lo que sugiere el potencial para reducir la duración del tratamiento contra la TB inhibiendo una subpoblación de *M. tuberculosis* persistentes. Por el contrario, no se observó actividad contra *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* a 31 µM, y la actividad fue inferior contra *M. smegmatis*, lo que implica que la actividad contra la tuberculosis de ambos péptidos es muy selectiva. Esto sugiere también que estos péptidos no se habrían detectado originalmente mediante el cribado con bacterias sustitutas. La unión a proteínas no debería afectar negativamente a su eficacia, ya que los valores de MIC solamente aumentaron dos veces en presencia de BSA al 4 % o FBS al 10 %.

15

<110> B&C BIOPHARM CO., LTD.

20

<120> PÉPTIDO CÍCLICO DERIVADO DE NONOMURAEA SP., PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DEL MISMO, Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA LA PREVENCIÓN O EL TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD RELACIONADA CON MICOBACTERIAS QUE COMPRENDE EL MISMO

<150> US 61/476473

<151> 18-04-2011

25

<150> US 61/513403

<151> 29-07-2011

<150> US 61/555257

<151> 03-11-2011

30

<150> US 61/607934

<151> 07-03-2012

<160> 2

35

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo, 27f, para la amplificación de ADNr de 16S a partir de ADN genómico de MJM5123

45

<400> 1

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2

50

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> cebador inverso, 1492r, para la amplificación de ADNr de 16S a partir de ADN genómico de MJM5123

<400> 2

ggttaccttg ttacgact 19

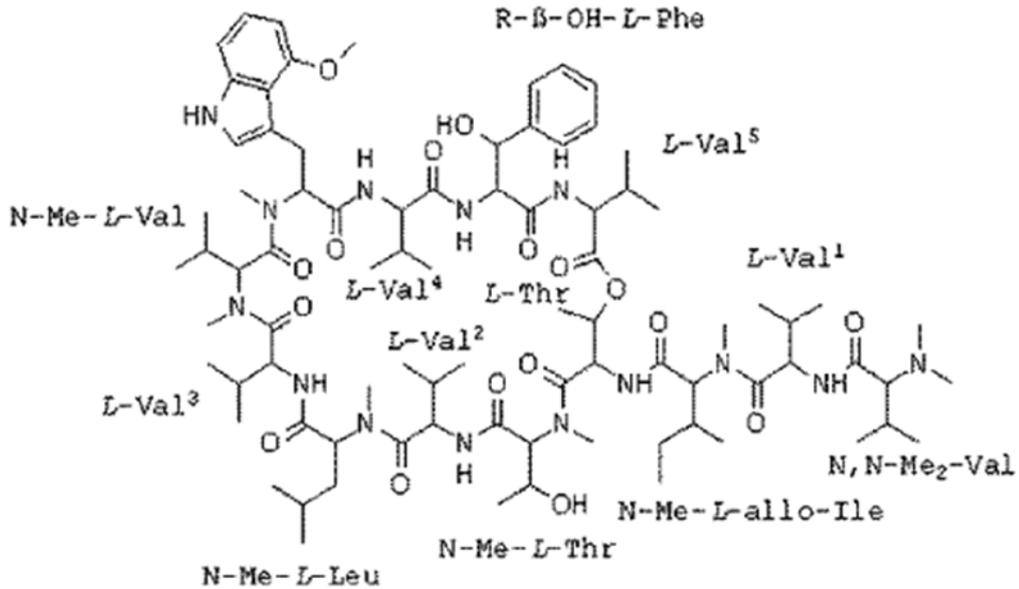
REIVINDICACIONES

1. Un péptido cíclico de Fórmula 1 o Fórmula 2 aislado de una cepa *Nonomuraea* sp. MJM5123 (N.º de acceso: KCTC 12178BP):

5

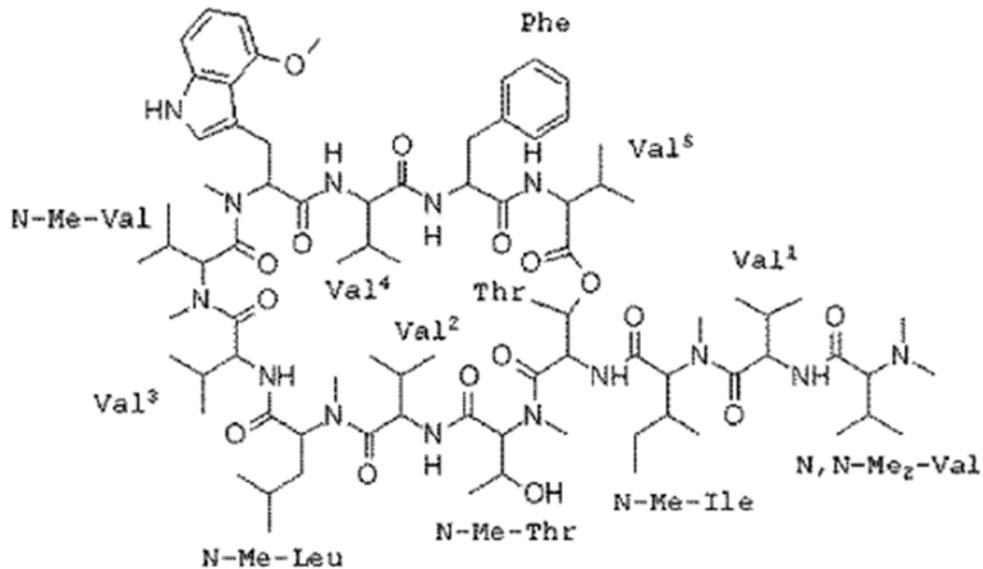
[Fórmula 1: H-14]

N-Me-4-Ome-L-Trp



[Fórmula 2: H-16]

N-Me-4-Ome-L-Trp

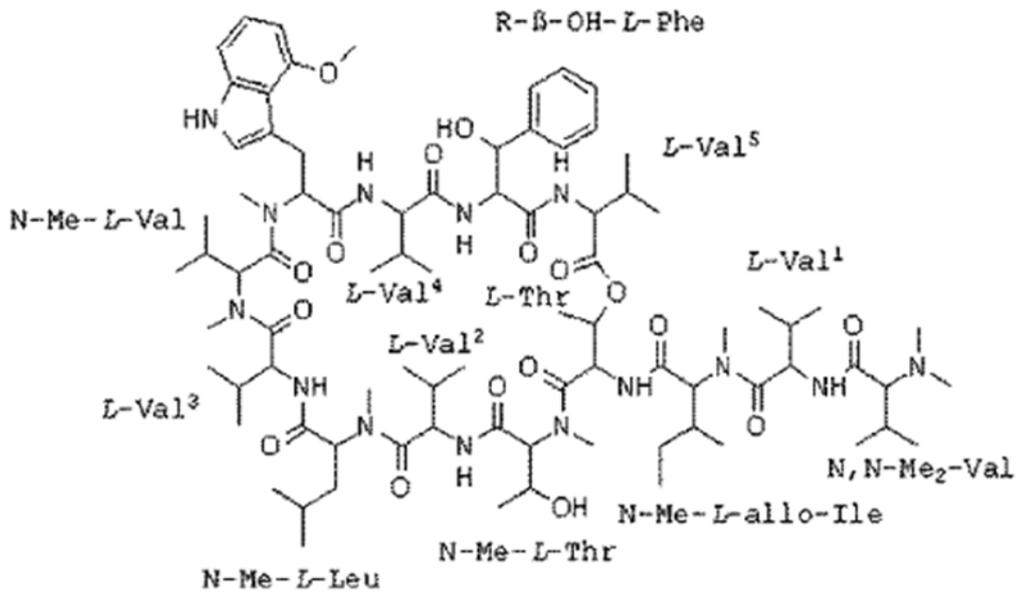


2. La composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de enfermedades relacionadas con *Mycobacterium* spp. que comprenden un compuesto de Fórmula 1 y/o Fórmula 2 como principio activo.

10

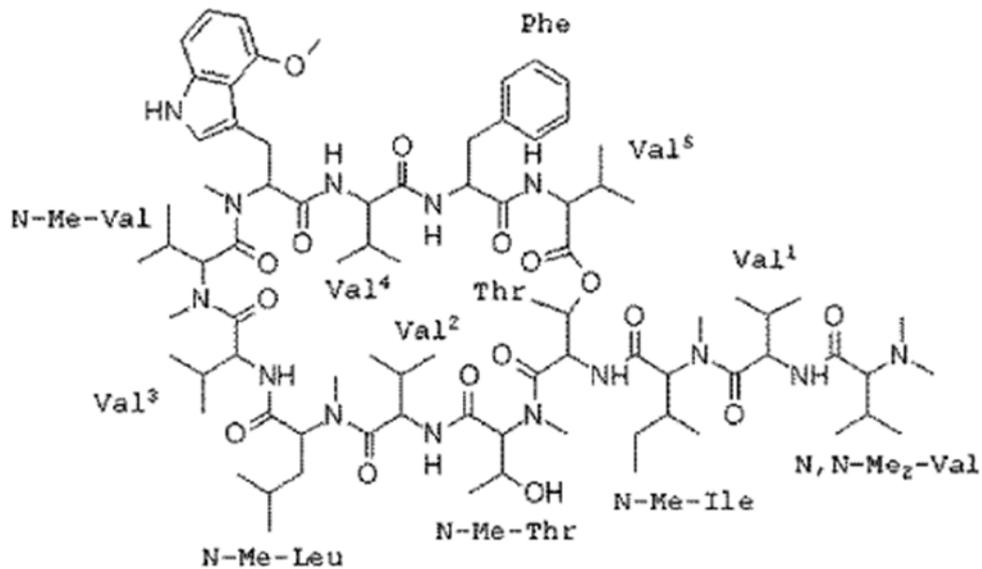
[Fórmula 1: H-14]

N-Me-4-Ome-L-Trp



[Fórmula 2: H-16]

N-Me-4-Ome-L-Trp



3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, donde la enfermedad relacionada con el *Mycobacterium* spp. es tuberculosis.

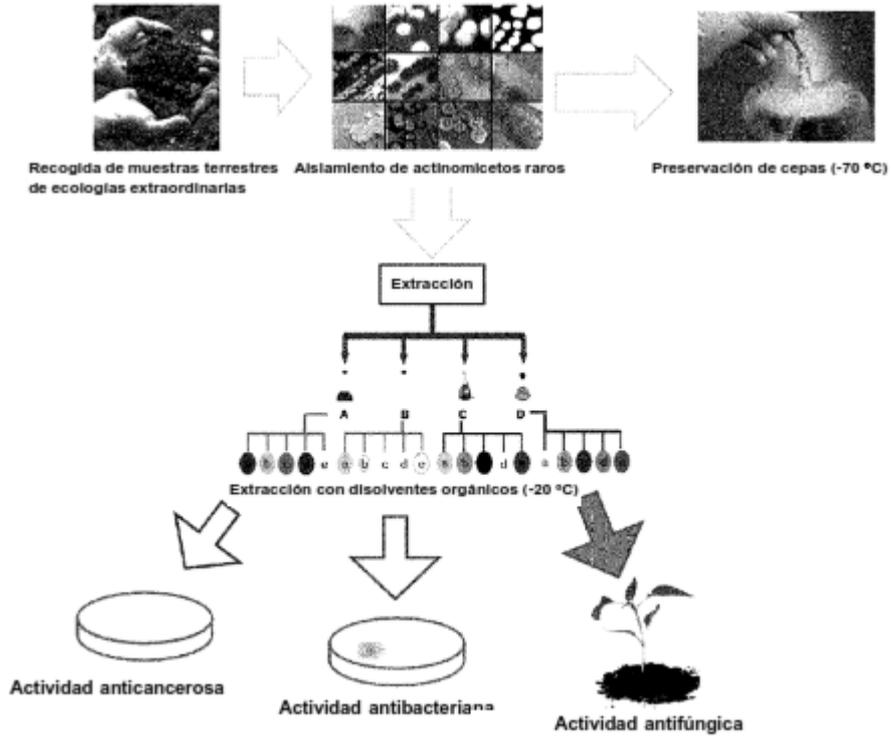
5 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, donde la tuberculosis es tuberculosis RMF o tuberculosis XRD.

10 5. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 2 - reivindicación 4, donde la composición comprende además uno o más agentes antimicobacterianos.

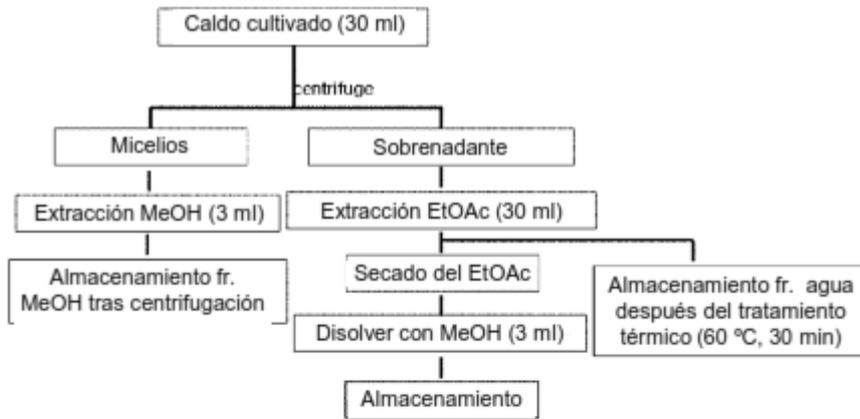
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, donde el agente antimicobacteriano se selecciona del grupo que consiste en un agente de tratamiento oral de primera línea contra la tuberculosis, un

- agente contra la tuberculosis inyectable, una fluoroquinolona, un agente de tratamiento oral de segunda línea contra la tuberculosis, otro agente anti-TB, y un compuesto actualmente en ensayos clínicos para la tuberculosis; donde el agente de tratamiento oral de primera línea contra la tuberculosis se selecciona del grupo que consiste e isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida; el agente contra la tuberculosis inyectable se selecciona del grupo que
- 5 consiste en estreptomycin, amikacina, capreomicina y kanamicina; la fluoroquinolona se selecciona del grupo que consiste en ciprofloxacina, ofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina; el agente de tratamiento oral de segunda línea contra la tuberculosis se selecciona del grupo que consiste en rifabutin, protionamida, etionamida, cicloserina, PAS y tioacetazona; y el otro agente anti-TB se selecciona del grupo que consiste en linezolid, clofazimina, amoxicilina/clavulanato, claritromicina, y un derivado de diaminodifenilsulfona; el compuesto actualmente en ensayos
- 10 clínicos para la tuberculosis se selecciona del grupo que consiste en bedaquilina, PA-824, Dalamanid, SQ-109, Sutezolid, rifapentina y compuestos en desarrollo preclínico, en particular AZD5847, BTZ043, TBA-354, CPZE/ N-45, SQ-641, SQ-609, DC-159a, Q201, THPP, análogos de riminofenazina de clofazimina e inhibidores LeuRS que contienen boro.
- 15 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, donde el compuesto de la fórmula general 1 o 2 y al menos un compuesto adicional se adaptan para la administración simultánea, secuencial o separada.
- 20 8. Un proceso para la fabricación del péptido cíclico contra la tuberculosis de la Fórmula 1 o la Fórmula 2 de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende; cultivar un microorganismo productor de un péptido antimicobacteriano con la cepa *Nonomuraea sp.* MJM5123 en condiciones aerobias en un medio de cultivo acuoso; y aislar el péptido cíclico contra la tuberculosis de acuerdo con la reivindicación 1 a partir de los micelios.
- 25 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la etapa de aislar el péptido cíclico contra la tuberculosis comprende las siguientes etapas: realizar una cromatografía líquida en vacío (VLC) del extracto metanólico de micelios de *Nonomuraea sp.* MJM5123 usando metanol y cloroformo como eluyente; realizar una cromatografía en columna abierta Sephadex LH-20 usando metanol como eluyente; y realizar una cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC) usando HEMWat+2 como disolvente.
- 30 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la etapa de aislar el péptido cíclico contra la tuberculosis comprende extraer los micelios de *Nonomuraea sp.* MJM5123 usando metanol y cloroformo como eluyente; añadir agua hasta el 30 % del metanol para preparar metanol acuoso; desgrasar el extracto de metanol usando hexano; separar la capa acuosa y ajustar hasta el 65 % de metanol acuoso; extraer la capa acuosa usando cloroformo; concentrar y resolver el extracto de cloroformo usando metanol; realizar una cromatografía en columna Sephadex
- 35 LH-20 usando metanol como eluyente; y realizar la HPLC provista de una columna rellena con un gel de fase invertida (RP-18).

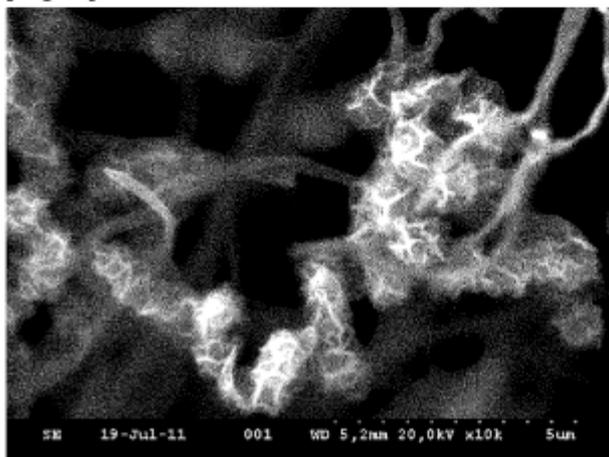
[Fig. 1]



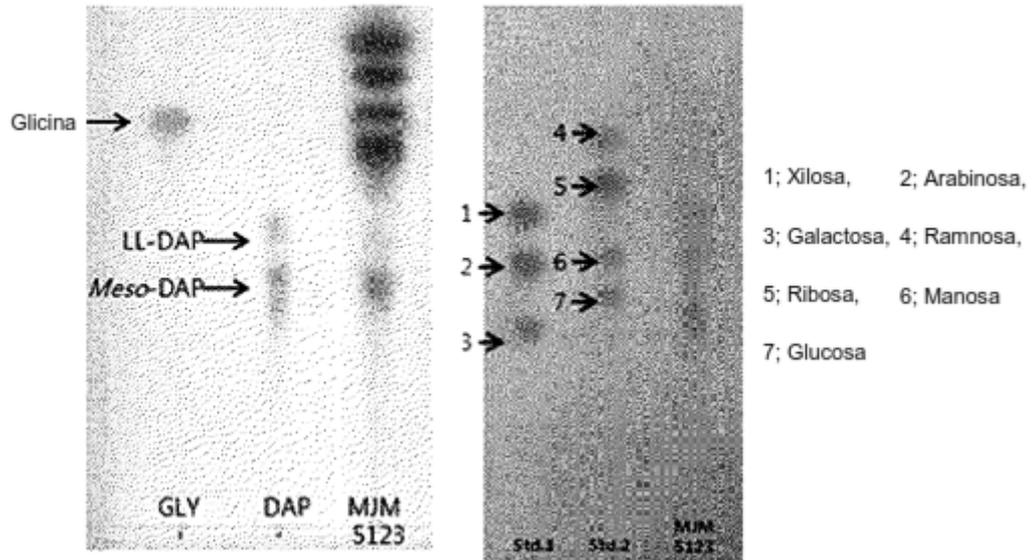
[Fig. 2]



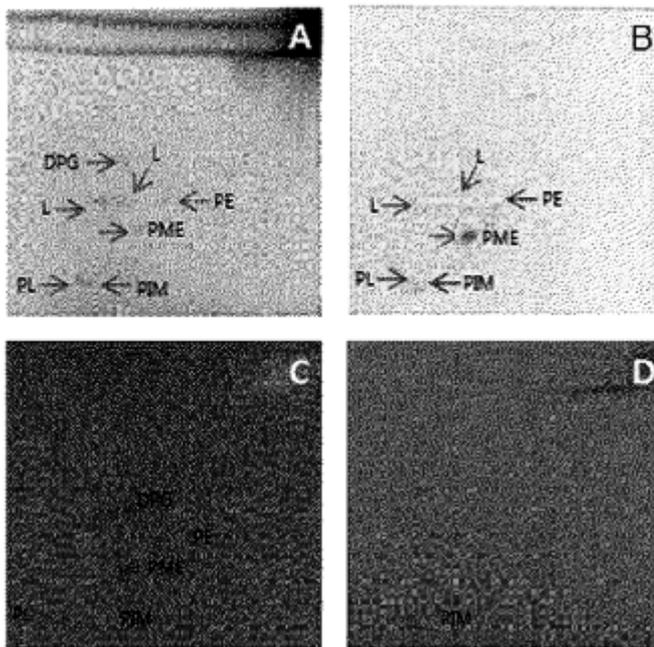
[Fig. 3]



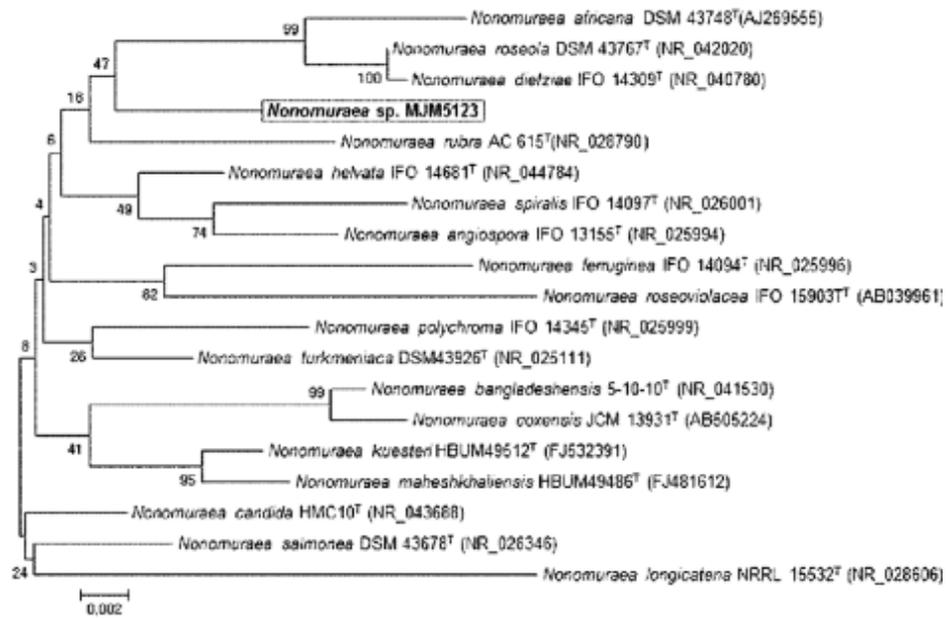
[Fig. 4]



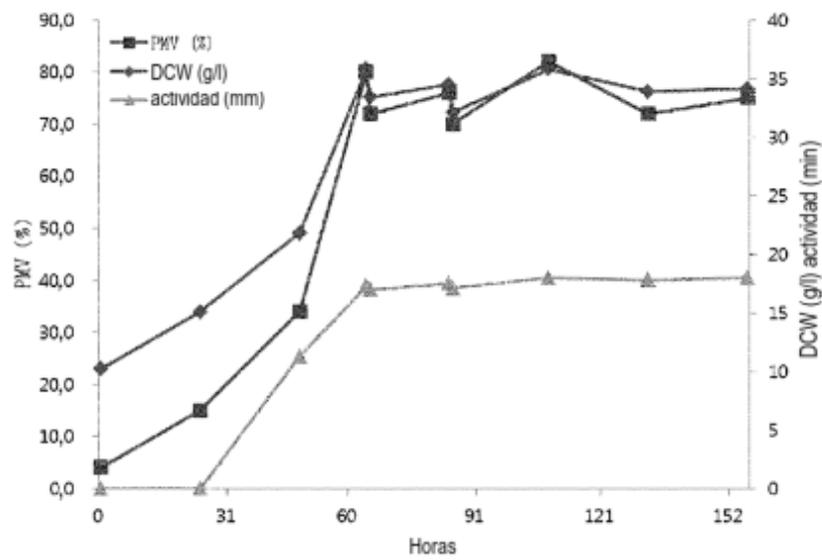
[Fig. 5]



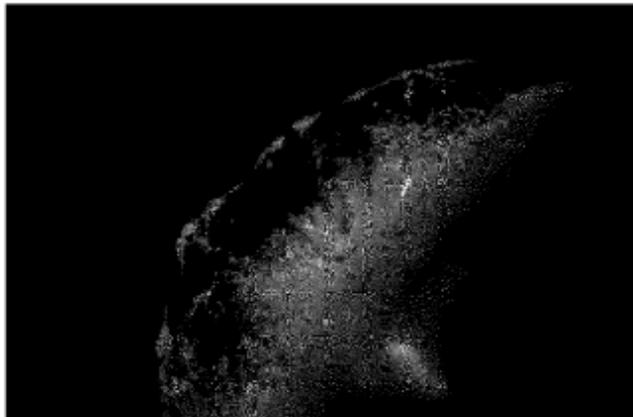
[Fig. 6]



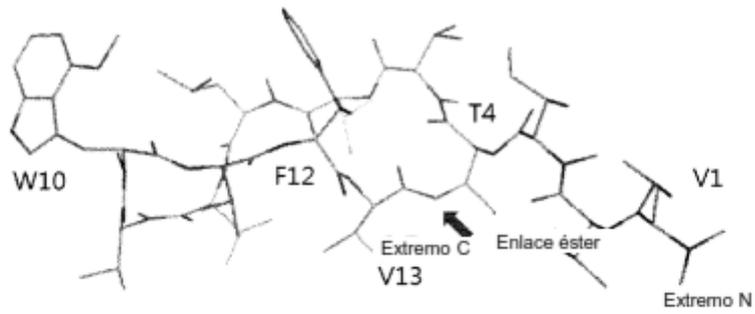
[Fig. 7]



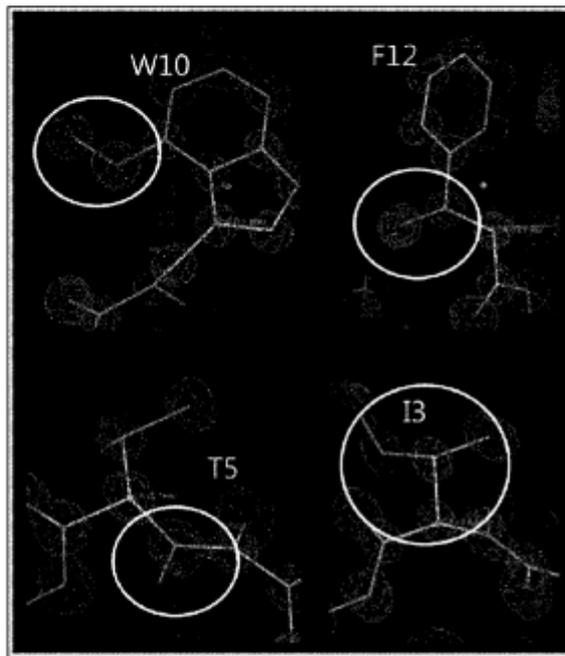
[Fig. 8]



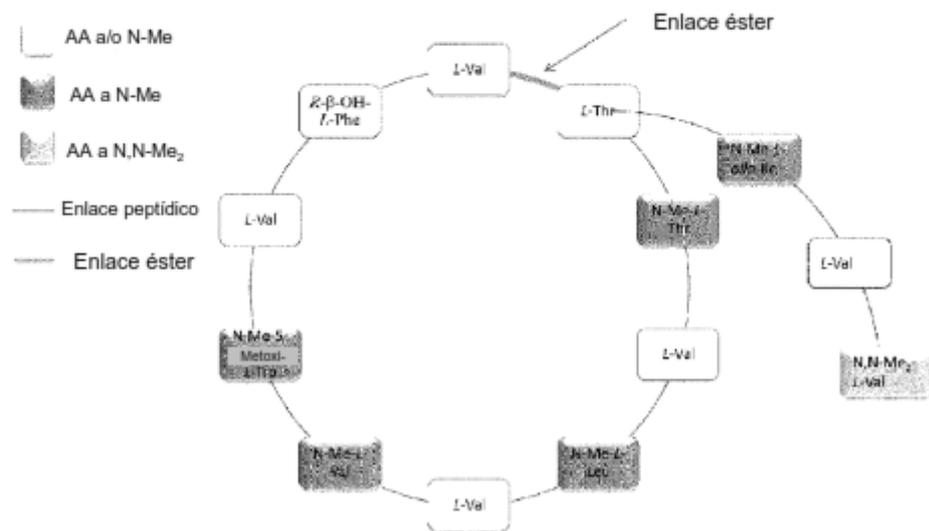
[Fig. 9]



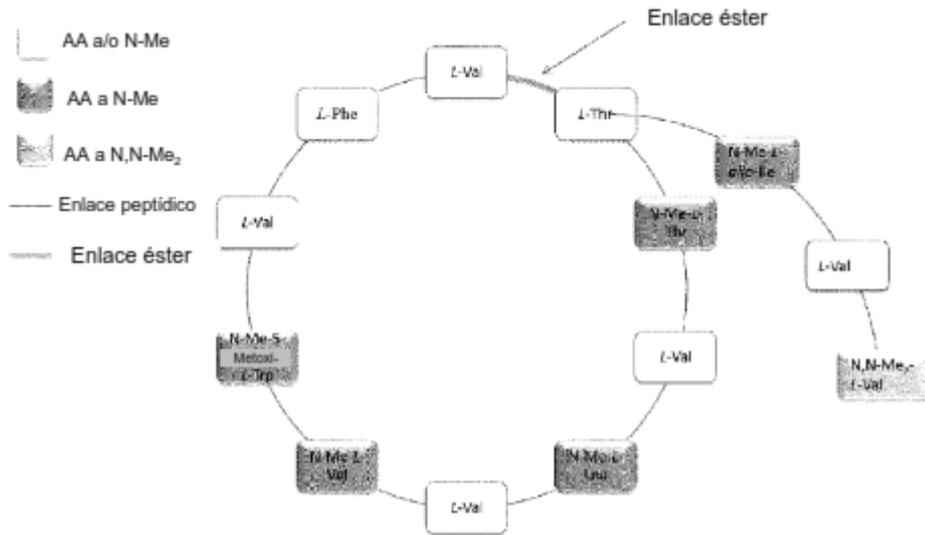
[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]

