

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 205**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 7/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2010 PCT/EP2010/064523**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11051073**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2010 E 10765613 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2493493**

54 Título: **Nuevos antibióticos de bacitracina**

30 Prioridad:

28.10.2009 US 255517 P

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

31.10.2016

73 Titular/es:

XELLIA PHARMACEUTICALS APS (100.0%)

P.O. Box 1736

2300 København S, DK

72 Inventor/es:

**MÅNSSON, MARTIN y
SENSTAD, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 588 205 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

Nuevos antibióticos de bacitracina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos con actividad antibiótica.

Antecedentes de la invención

10

Un grupo de antibióticos de péptidos estrechamente relacionados, producidos de forma natural por *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* se denominan Bacitracinas. Las Bacitracinas son generalmente activas contra muchas especies Gram positivas y unas pocas bacterias Gram negativas.

15

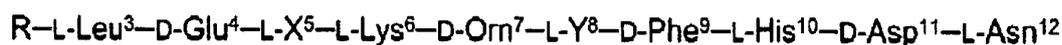
Se identificaron varias bacitracinas de las que la bacitracina A es de importancia primaria y es altamente activa (Biochemistry, vol. 39 núm. 14, 2000, páginas 4037-45 de Epperson y Ming). La Bacitracina A es un antibiótico dodecapéptidolactamo cíclico ramificado que se sintetiza a través del mecanismo thiotemplate de la síntesis del péptido no ribosomal (J. Am Chem Soc. vol. 128, 2006, páginas 10513-10520 de Wagner y otros y Eur J Biochem, vol. 192 núm. 1, 1990, páginas 1-15 de Kleinkauf y von Döhren).

20

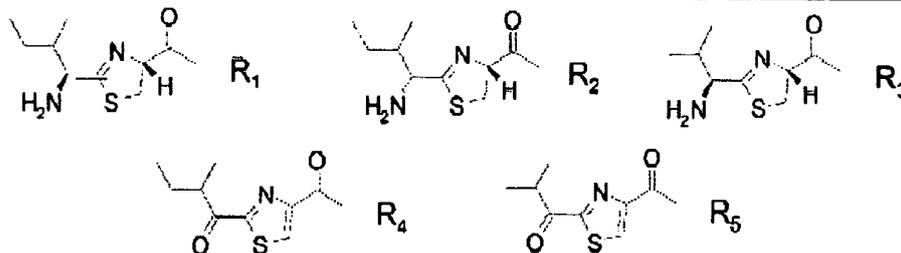
La estructura primaria de la Bacitracina A es NH₂-L-Ile₁-L-tiazolina₂-L-Leu₃-D-Glu₄-L-Ile₅-L-Lys₆-D-Orn₇-L-Ile₈-D-Phe₉-L-His₁₀-D-Asp₁₁-L-Asn₁₂-COOH que se cicla entre el grupo ε-amino de L-Lys₆ y el grupo R-carboxilo de L-Asn₁₂ (J. Am Chem Soc. vol 128 páginas 10513-10520, 2006 de Wagner y otros).

25

Ming y otros (Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 91, 2002) describió las Bacitracinas como compuestos peptídicos con la fórmula siguiente:



30



35

40

en donde
X es Ile o Val
y
Y es Ile o Val

45

Notoriamente, R₁ y R₃ son las porciones N-terminales de las Bacitracinas activas, mientras que R₄ y R₅ son las porciones N-terminales oxidadas de las Bacitracinas menos activas. R₂ es sin embargo un estereoisómero inactivo.

Técnica anterior

50

Ikai y otros sugirieron que la actividad de las Bacitracinas puede depender de la hidrofobicidad:

55

"La comparación de los MIC y las estructuras propuestas de los componentes menores sugieren que la ubicación de la valina afecta la actividad de cada componente en el siguiente orden decreciente: N-terminal, el anillo del péptido de siete miembros, y la porción peptídica de la cadena lateral. Debido a que este orden se refiere al orden de elución de los componentes menores en la HPLC, la actividad puede depender de la hidrofobicidad del componente respectivo." (ver Journal of Antibiotics, vol. 48 núm. 3, 1995, páginas 233-242 por Ikai y otros).

60

Wagner y otros sugirieron la incorporación de nuevos heterociclos en la Bacitracina A para superar las limitaciones existentes para la aplicación de la Bacitracina (Journal of the American Chemical Society, vol. 128 núm. 32, 2006, páginas 10513-10520).

El documento de patente WO97/47.313 A1 se refiere a los métodos para sintetizar polipéptidos de bacitracina y análogos y sus derivados.

65

Varios péptidos sintetizados de manera no ribosomal comprenden aminoácidos inusuales. Por ejemplo, la ciclosporina A comprende ácido 2(S)-amino-3(R)-hidroxi-4(R)-metilo-6(E)-octenoico que es crucial para la unión al receptor intracelular

para ciclofilina, y por lo tanto para su actividad inmunosupresora (Journal of Biological Chemistry, vol. 268 núm. 35, 1993 de Offenzeller y otros).

Varios aminoácidos no comunes se asemejan a la estructura de la isoleucina:

- 5
- El ácido 2-amino-5-metil-5-hexenoico, un nuevo análogo de la metionina, se aisló a partir de un caldo de fermentación de *Streptomyces* (Journal of Antibiotics vol. 32 núm. 11, páginas 1118-1124, 1979 de Takeuchi y otros).
- 10
- La 4 metilen-norleucina y el ácido 2-aminohept-6-enoico son compuestos con la fórmula: $C_7H_{13}NO_2$.
 - La 4 metil-norleucina es un derivado de isoleucina que puede incorporarse en una proteína recombinante. (J Pharm Biomed Anal, vol 31. núm. 5, 2003, páginas 979-987 de Muramatsu y otros).
- 15
- El ácido 2-amino-3-metil-4-pentenoico es un análogo de isoleucina insaturado que puede incorporarse en las proteínas (Chembiochem vol. 7 núm. 1, 2006, páginas 83-87 de Mock y otros).
 - Las norleucinas no saturadas de *Amanita solitaria*. Estudios químicos y farmacológicos describen un ácido 2-Amino-Hex-5-enoico (Lloydia vol. 36 núm.2, 1973, páginas 69-73 de Chilton y otros).
- 20
- Beta-metilnorleucina, un antimetabolito producido por *Serratia marcescens* (J Antibiot, vol. 34 núm. 10, 1981 páginas 1278-82 de Sugiura y otros)

25 El documento de patente WO93/08.822 A1 se refiere al tratamiento de la infección con sales de bacitracina de metales divalentes.

Saberwal y Nagaraj, 1994, Biochimica et Biophysica Acta, 1197 (2), 109-131 proporciona una discusión de los péptidos antibacterianos y líticos celulares distintos de bacitracina, que actúan perturbando la función de barrera de las membranas: las facetas de sus características conformacionales, correlaciones estructura-función y capacidades que perturbaban la membrana.

Resumen de la invención

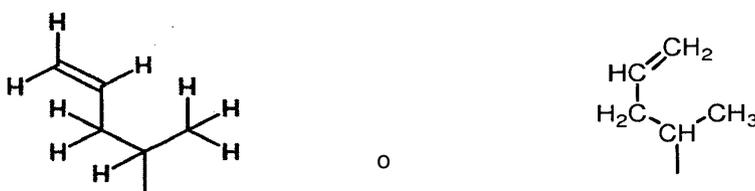
35 En un aspecto, esta invención se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina. Más específicamente, se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina que comprenden una cadena lateral de aminoácido hasta ahora desconocido.

En *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, sin estar atado por la teoría, especulamos que esta cadena lateral es resultante de una modificación química en la Bacitracina o de la incorporación de un aminoácido natural hasta ahora desconocido.

40 El nombre sistemático de un compuesto de ácido α -amino que comprende la nueva cadena lateral es ácido 2-amino-3-metil-5-hexenoico y su fórmula molecular es $C_7H_{13}NO_2$.

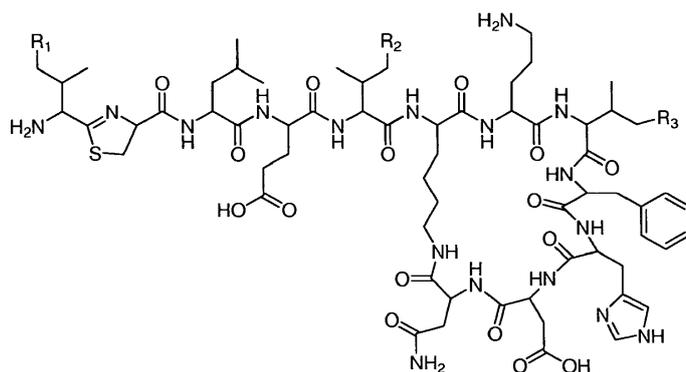
45 Proponemos y usamos el nombre 5-metilen-isoleucina para el ácido 2-amino-3-metil-5-hexenoico. En consecuencia, la cadena lateral de la 5-metilen-isoleucina tiene la estructura $-CH(CH_3)CH_2CH=CH_2$

50 Por lo tanto, la invención se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina con actividad antibacteriana que comprende al menos un residuo de 5-metilen-isoleucina. Tales bacitracinas comprenden al menos una cadena lateral de 5-metilen-isoleucina. La cadena lateral de 5-metilen-isoleucina podría representarse:



60 La invención se refiere a compuestos de Bacitracina con actividad antibacteriana que comprenden una o más cadenas laterales de 5-metilen-isoleucina.

Las Bacitracinas de conformidad con la invención comprenden al menos un residuo 5-metilen-isoleucina en la posición 1 y/o 5 y/u 8. Tales compuestos tienen la siguiente estructura:



5

10

15

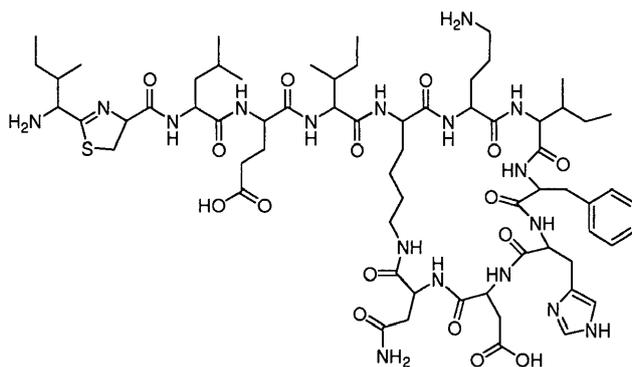
en donde
al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es -CH=CH₂,
y en donde
R₁, R₂ y R₃ son independientemente -H, -CH₃, o -CH=CH₂

20

La estructura anterior debe interpretarse como que cubre Bacitracina A si R₁, R₂ y R₃ son todos -CH₃.

En consecuencia, la Bacitracina A sería representada:

25



30

35

40

Proponemos y usamos el nombre Bacitracina J1 para las Bacitracinas de conformidad con la invención que comprenden un residuo de 5-metilen-isoileucina en la posición 5. Esta nomenclatura se basa en el orden de elución a partir de una columna C18.

45

Proponemos y usamos el nombre Bacitracina J2 para las Bacitracinas de conformidad con la invención que comprenden un residuo de 5-metilen-isoileucina en la posición 8. Esta nomenclatura se basa en el orden de elución a partir de una columna C18.

50

Proponemos y usamos el nombre Bacitracina J3 para las Bacitracinas de conformidad con la invención que comprenden un residuo de 5-metilen-isoileucina en la posición 1. Esta nomenclatura se basa en el orden de elución a partir de una columna C18.

55

Proponemos y usamos el nombre Bacitracina K1 para las Bacitracinas de conformidad con la invención que comprenden los residuos 5-metilen-isoileucina en la posición 5 y 8. Esta nomenclatura se basa en el orden de elución esperado a partir de una columna C18.

60

Proponemos y usamos el nombre Bacitracina K2 para las Bacitracinas de conformidad con la invención que comprenden los residuos 5-metilen-isoileucina en la posición 1 y 5. Esta nomenclatura se basa en el orden de elución a partir de una columna C18.

65

Proponemos y usamos el nombre Bacitracina K3 para las Bacitracinas de conformidad con la invención que comprenden los residuos 5-metilen-isoileucina en la posición 1 y 8. Esta nomenclatura se basa en el orden de elución esperado a partir de una columna C18.

Proponemos y usamos el nombre Bacitracina L para las Bacitracinas de conformidad con la invención que comprenden

los residuos 5-metilen-isoleucina en la posición 1, 5 y 8. Esta nomenclatura se basa en el orden de elución esperado a partir de una columna C18.

La invención se define en las reivindicaciones de patente adjuntas.

5

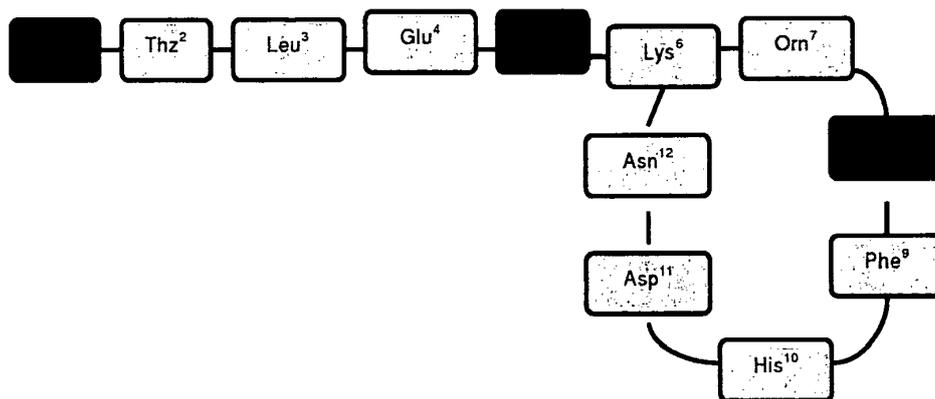
Descripción detallada de la invención

Definiciones:

10

Las "Bacitracinas" son compuestos peptídicos que comprenden la siguiente estructura (con la numeración del residuo de aminoácido superíndice):

15

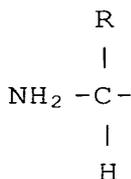


20

25

30

en donde X es



35

y en donde R es la cadena lateral del residuo de aminoácidos de isoleucina, valina o 5-metilen-isoleucina;

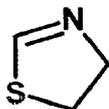
40

y en donde Y y Z son independientemente el residuo de aminoácido de isoleucina, valina o 5-metilen-isoleucina;

45

y en donde Thz es un anillo de tiazolina

50



2' acoplado a X y 4' acoplado al carbono α en Leu;

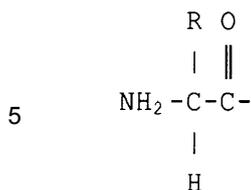
55

y en donde
 Leu es un residuo de aminoácido de leucina
 Glu es un residuo de aminoácido de glutamina
 Lys es un residuo de aminoácido de lisina que forma enlaces peptídicos con Y y Orn mientras que su ε-amina se acopla al grupo α-carboxilo de asparagina mediante un enlace peptídico Orn que es un residuo de aminoácido de Ornitina.
 Phe es un residuo de aminoácido de fenilalanina
 His es un residuo de aminoácido de histidina
 Asp es un residuo de aminoácido de ácido aspártico
 Asn es un residuo de aminoácido de asparagina que forma enlaces peptídicos con Asp mientras que su grupo α-carboxilo se acopla a la ε-amina de lisina mediante un enlace peptídico;

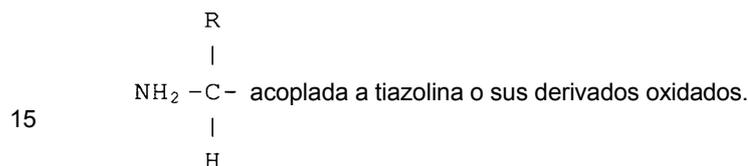
65

Cuando se usa en esta solicitud; "Bacitracinas" pretende abarcar cualquier compuesto que tenga la estructura anterior sin tener en cuenta el método de producción. Por lo tanto, el término "Bacitracinas" incluye los compuestos antibióticos

- que se producen de manera natural por *Bacillus licheniformis* pero además los compuestos (sintéticos) y compuestos semisintéticos producidos *in vitro* que tienen la estructura primaria anterior. "Bacitracinas" además pretende abarcar cualquier compuesto que tenga la estructura anterior sin tener en cuenta la carga que varía con el pH. "Bacitracinas" además pretende abarcar cualquier compuesto que tenga la estructura primaria anterior sin tener en cuenta la estereoquímica. "Bacitracinas" pretende abarcar además, las sales e hidratos de los compuestos que tengan la estructura primaria anterior.
- "Bacitracinas que comprenden al menos un residuo de 5-metilen-isoleucina" pretende abarcar cualquier Bacitracina que comprende la estructura que se puede generar si un residuo(s) de isoleucina o valina se sustituye con el residuo(s) de 5-metilen-isoleucina en las posiciones 1 y/o 5 y/u 8.
- "Bacitracinas que comprenden al menos un residuo de 5-metilen-isoleucina" pretende abarcar cualquier Bacitracina que comprende la estructura que se puede generar si un residuo(s) de isoleucina o valina se sustituye con el residuo(s) de 5-metilen-isoleucina en las posiciones 1 y/o 5 y/u 8.
- "Bacitracinas que comprenden la cadena lateral de al menos un 5-metilen-Isoleucina" pretende abarcar "Bacitracinas que comprenden al menos un residuo de 5-metilen-isoleucina"
- Cuando se oxida el grupo amino N-terminal y/o el anillo tiazolina de las Bacitracinas, se pierde una cantidad sustancial de actividad antibacteriana. Por ejemplo, el compuesto de baja actividad Bacitracina F, comprende una porción ceto-tiazol en lugar de la porción amino-tiazolina (J. Org. Chem, vol. 22, 1957, páginas 1345-1353 de Craig y otros).
- Los aminoácidos en configuración D son comunes en péptidos bacterianos sintetizados por vía no-ribosomal y menos común en proteínas sintetizadas por vía ribosomal. Por ejemplo en las Bacitracinas sintetizadas por la vía no ribosomal, los residuos de aminoácidos en posición 4, 7, 9 y 11 están usualmente en configuración D (Glu, Orn, Phe y Asp).
- La 5-metilen-isoleucina comprende dos átomos de carbono quirales que pueden estar independientemente en configuración R o S.
- Un "residuo de aminoácido" es la unidad en un péptido que comprende
 -NH-CHR-COOH (residuo C-terminal)
 o
 NH₂-CHR-CO- (residuo N-terminal)
 o
 -NH-CHR-CO- (residuo interno)
- en donde R es
 -H en glicina,
 -CH₃ en alanina,
 -OH en serina,
 -CH₂SH en cisteína,
 -CH(CH₃)CH₂CH₃ en isoleucina,
 -CH₂CH(CH₃)₂ en leucina
 -CH(CH₃)₂ en valina
 etc.
- Una "cadena lateral de aminoácido" es el grupo R de un "residuo de aminoácido". Por ejemplo, el grupo R es
 -CH(CH₃)CH₂CH=CH₂ en 5-metilen-Isoleucina
 -CH(CH₃)CH₂CH₃ en isoleucina,
 -CH₂CH(CH₃)₂ en leucina
 -CH(CH₃)₂ en valina
- "Actividad antibacteriana" es cualquier actividad que
- inhibe el crecimiento, el metabolismo o la reproducción de bacterias, o
 - aumenta la mortalidad de las bacterias, o
 - reduce la patogenicidad de las bacterias.
- La potencia es la actividad antibacteriana *in vitro*. Puede medirse y expresarse como IU/mg.
- Las "posiciones" de los residuos de aminoácidos en las Bacitracinas se numeran a partir del N-terminal que puede ser isoleucina, valina o 5-metilen-isoleucina en la posición 1 (el extremo izquierdo en todas las figuras muestran Bacitracinas en esta solicitud). De aquí que, Lys está en la posición número 6 y Asn está en la posición número 12.
- En las Bacitracinas, la "posición 1" es especial, debido a que este residuo de aminoácido se incorpora parcialmente dentro del anillo Tiazolina. Por lo tanto, el residuo de aminoácido en la posición 1 en las Bacitracinas no comprende la unidad N-terminal usual:



pero comprende en su lugar:



20 Una "composición" es cualquier mezcla que comprende más de dos compuestos diferentes. Por ejemplo, una mezcla de dos ingredientes farmacéuticos activos, o una mezcla de un ingrediente farmacéutico activo y uno o más excipientes farmacéuticos.

25 El término "componente" o "componentes" que se usa en esta solicitud se refieren a un compuesto específico en una composición. En consecuencia, "Componentes menores" son compuestos que se encuentran en cantidades relativamente pequeñas en una composición.

30 Una "composición" es por ejemplo cualquier composición adecuada para usar *in vivo*. Tales composiciones pueden por lo tanto administrarse de manera cutánea, de manera subcutánea, de manera intravenosa, de manera parenteral, de manera oral etc.

La invención se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina que comprenden la cadena lateral de al menos un residuo de 5-metilen-isoleucina.

35 Más específicamente, la invención se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina con actividad antibacteriana que comprenden al menos un residuo de 5-metilen-isoleucina.

Aún más específicamente, se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina con una mejor actividad antibacteriana que comprenden al menos un residuo (s) de 5-metilen-isoleucina en la posición 1 o 5 u 8.

40 Aún más específicamente, se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina con actividad antibacteriana que comprenden un residuo de 5-metilen-isoleucina en la posición 1 o 5 u 8.

La invención además se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina con actividad antibacteriana que comprenden dos residuos de 5-metilen-isoleucina en la posición 1 y 5.

45 La invención además se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina con actividad antibacteriana que comprenden dos residuos de 5-metilen-isoleucina en la posición 1 y 8.

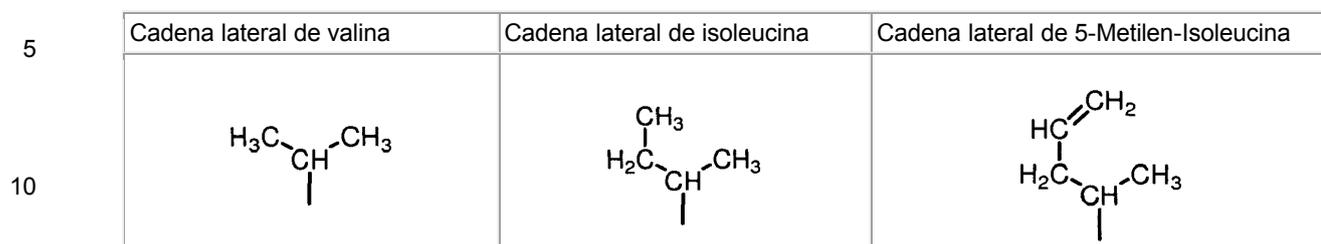
50 La invención además se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina con actividad antibacteriana que comprenden dos residuos de 5-metilen-isoleucina en la posición 5 y 8.

La invención además se refiere a nuevos compuestos de Bacitracina con actividad antibacteriana que comprenden tres residuos de 5-metilen-isoleucina en la posición 1 y 5 y 8.

55 Las Bacitracinas que comprenden al menos un residuo 5-metilen-isoleucina en las posiciones 1, 5 u 8 se pueden usar para inhibir el crecimiento bacteriano no deseado tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos compuestos pueden por lo tanto, tener efecto terapéutico si se administran a un animal o un humano con una infección bacteriana.

60 Cuando 5-metilen-isoleucina se incorpora en las bacitracinas en la posición 1, 5 u 8, la cadena lateral de aminoácido resultante es insaturada y comprende 5 átomos de carbono. Las cadenas laterales de los residuos de isoleucina y valina comprenden 4 o 3 átomos de carbono, respectivamente. El orden de elución a partir de una columna C18 es Bacitracina A, Bacitracina J1, Bacitracina J2 y Bacitracina J3 (ver Cromatogramas de la Figura 1). Por lo tanto, es razonable que la sustitución de una cadena lateral de isoleucina con la cadena lateral 5-metilen-isoleucina resulta en Bacitracinas más hidrofóbicas.

65



15 Los compuestos preferidos de esta invención son Bacitracina J1-3 producida de forma natural por *Bacillus licheniformis*; por ejemplo Bacitracina J1, Bacitracina J2 y Bacitracina J3 como se visualiza en la Figura 8A-8C.

20 Los compuestos preferidos de esta invención son Bacitracinas J1-3 con la misma estereoquímica que el producto de la fermentación natural, Bacitracina A.

Los compuestos preferidos de esta invención son las Bacitracinas J1-3, Bacitracinas K1-3 o Bacitracina L con residuos de aminoácidos en la posición 4, 7, 9 y 11 están en la configuración D (Glu, Orn, Phe y Asp).

25 Abreviaturas:

Mil = 5-Metilen-Isoleucina

Thz = Thiazolina

Ala = Alanina

Arg = Arginina

Asn = Asparagina

30 Asp = Ácido Aspártico

Cys = Cisteína

Gln = Glutamina

Glu = Glutamato

Phe = Fenilalanina

35 Gly = Glicina

His = Histidina

Ile = Isoleucina

Lys = Lisina

Leu = Leucina

40 Met = Metionina

Pro = Prolina

Ser = Serina

Thr = Treonina

Trp = Triptófano

45 Tyr = Tirosina

Val = Valina

LC-MS = cromatografía líquida-espectrometría de masa

NMR = Resonancia Magnética Nuclear

V = volumen

50 M = Molar

La producción de las Bacitracinas descrita en esta solicitud, puede hacerse por síntesis en fase sólida como se describe en J Org Chem, vol. 61 núm. 12, 1996, páginas 3983-3986 de Lee y otros).

55 El documento de patente WO 199.747.313 describe la síntesis de péptidos de Bacitracina que podrían usarse para producir las nuevas Bacitracinas de esta invención.

Alternativamente, las nuevas bacitracinas pueden producirse a partir de las cepas de *Bacillus licheniformis* que producen Bacitracina y obtenerse por purificación.

60

Breve descripción de las figuras

65 La Figura 1A muestra un cromatograma UV a 254 nm de un lote comercial de Xellia (BANN 211412) obtenido usando una columna YMC-Pack Pro C18 (5 µm, 250 x 2,0 mm) a 30 °C. La fase móvil consistió de metanol/acetoneitrilo/0,1 M de acetato de amonio pH 6,0/agua 58:5:10:27, v/v/v/v. Las condiciones isocráticas se usaron a la velocidad de flujo de 0,2 ml/min. El volumen de inyección fue 10 µl. Excepto para Bacitracina A, se marcan tres componentes menores

denominados Bacitracina J1, Bacitracina J2 y Bacitracina J3, todos con peso molecular de 12 Da más que Bacitracina A.

La Figura 1B muestra el cromatograma MS TIC correspondiente con denominaciones como en la Figura 1A.

La Figura 2A muestra la estructura de Bacitracina A, donde las asignaciones de los iones del fragmento se hacen para los iones característicos en el espectro iónico del producto más abajo.

La Figura 2B muestra el espectro (MS/MS) iónico del producto de Bacitracina A, donde el ion precursor en m/z 712,0 ($[M+2H]^{2+}$) se aisló y fragmentó.

La Figura 3A muestra la estructura de la parte cíclica de Bacitracina A, donde las asignaciones de los iones del fragmento se hacen para los iones característicos en el espectro iónico del producto de segunda generación más abajo.

La Figura 3B muestra el espectro (MS^3) iónico del producto de segunda generación de Bacitracina A, donde los iones precursores consecutivos fueron m/z 712,0 ($[M+2H]^{2+}$) y m/z 869,6 ($[M+H]^+$).

La Figura 4A muestra la estructura de Bacitracina J1, donde las asignaciones de iones del fragmento se hacen para los iones característicos en el espectro iónico del producto más abajo.

La Figura 4B muestra el espectro (MS/MS) iónico del producto de Bacitracina J1, donde el ion precursor en m/z 718,0 ($[M+2H]^{2+}$) se aisló y fragmentó.

La Figura 5A muestra la estructura de Bacitracina J2, donde las asignaciones de iones del fragmento se hacen para los iones característicos en el espectro iónico del producto más abajo.

La Figura 5B muestra el espectro (MS/MS) iónico del producto de la Bacitracina J2, donde el ion precursor en m/z 718,0 ($[M+2H]^{2+}$) se aisló y fragmentó.

La Figura 6A muestra la estructura de la parte cíclica de la Bacitracina J2, donde las asignaciones de iones del fragmento se hacen para los iones característicos en el espectro iónico del producto de segunda generación más abajo.

La Figura 6B muestra el espectro (MS^3) iónico del producto de segunda generación de Bacitracina J2, donde los iones precursores consecutivos fueron m/z 718,0 ($[M+2H]^{2+}$) y m/z 881,6 ($[M+H]^+$).

La Figura 7A muestra la estructura de Bacitracina J3, donde las asignaciones de iones del fragmento se hacen para los iones característicos en el espectro iónico del producto más abajo.

La Figura 7B muestra el espectro (MS/MS) iónico del producto de Bacitracina J3, donde el ion precursor en m/z 718,0 ($[M+2H]^{2+}$) se aisló y fragmentó.

La Figura 8A muestra la estructura de Bacitracina con un residuo 5-metilen-isoleucina en la posición 5 (= Bacitracina J1)

La Figura 8B muestra la estructura de Bacitracina con un residuo 5-metilen-isoleucina en la posición 8 (= Bacitracina J2)

La Figura 8C muestra la estructura de Bacitracina con un residuo 5-metilen-isoleucina en la posición 1 (= Bacitracina J3)

La Figura 8D muestra la estructura de Bacitracina con residuos 5-metilen-isoleucina en las posiciones 5 y 8 (= Bacitracina K1)

La Figura 8E muestra la estructura de Bacitracina con residuos 5-metilen-isoleucina en las posiciones 1 y 5 (= Bacitracina K2)

La Figura 8F muestra la estructura de Bacitracina con residuos 5-metilen-isoleucina en las posiciones 1 y 8 (= Bacitracina K3)

La Figura 8G muestra la estructura de Bacitracina con residuos 5-metilen-isoleucina en las posiciones 1 y 5 (= Bacitracina L)

La invención se define por las reivindicaciones y no por los siguientes ejemplos ilustrativos

EJEMPLOS

Experimento 1: LC-MSⁿ

Las muestras usadas fueron lotes comerciales de Axellia Pharmaceuticals. Las muestras se disolvieron en agua a la concentración de 2 mg/ml y después se filtraron a través de filtros de 0,45 μ m (VWR) antes del análisis LC-MSⁿ.

El sistema HPLC Surveyor consistió en una bomba cuaternaria, desgasificador, automuestreador termostatzado (ajustado a 5 °C) y un compartimento termostatzado de columnas (ajustado a 30 °C) y un detector de haz de diodos (ajustado a 254 nm). Las condiciones de HPLC fueron las mismas como se describe en Govaerts y otros (Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 17, núm. 12, páginas 1366-1379). Una columna YMC-Pack Pro C18 (5 μ m, 250 x 2.0 mm) se usó. La fase móvil consistió de metanol/acetonitrilo/0,1 M de acetato de amonio pH 6,0/agua 58:5:10:27, v/v/v/v. La solución de acetato de amonio 0,1 M se ajustó a pH 6,0 mediante la adición de ácido acético 0,1 M. Las condiciones isocráticas se usaron a la velocidad de flujo de 0,2 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 μ l. Un

espectrómetro de masas de trampa de iones LXQ lineal (Thermo Fisher) equipado con una interface ESI se conectó al sistema de HPLC. La optimización se realizó en el ion molecular protonado doblemente ($[M+2H]^{2+}$) de Bacitracina A. Se establecieron los parámetros ESI como sigue: gas de impulsión 35 (unidades arbitrarias), gas auxiliar 10 (unidades arbitrarias), voltaje de pulverización 5,0 kV, temperatura del capilar 320 °C, voltaje capilar 9,0 V, voltaje de la lente tubular 95 V. Los parámetros MS se establecieron como sigue: Lente RF compensado -4,25 V, lente 0 voltaje -3,0 V, multipolo 0 compensado -4,5 V, lente 1 voltaje - 8,0 V, voltaje de la lente de entrada -56 V, multipolo 1 compensado -9,5 V, RF multipolo amplitud 400 V, lente frontal voltaje -6,5 V. Los análisis LC-MS/MS- y LC-MS³ se realizaron con anchuras de aislamiento 3 y energías de colisión 16%.

10 Resultados

Los cromatogramas UV y MS de un lote típico (BANN 211412) de Axellia Pharmaceuticals se muestran en la Figura 1A-B. El cromatograma UV es muy similar al cromatograma correspondiente de este lote usando el Ph.Eur incompatible LC-MS. Método HPLC. Excepto para Bacitracina A, se marcan en la Figura 1 tres componentes menores denominados Bacitracina J1, Bacitracina J2 y Bacitracina J3, todos con peso molecular de 12 Da más que Bacitracina A. La elucidación estructural de estos tres componentes se describirá en esta solicitud y su estructura dará la razón fundamental de sus denominaciones.

20 Bacitracina A

El ion molecular doblemente protonado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 712,0) se aisló y fragmentó y el espectro (MS/MS) iónico del producto resultante se muestra en la Figura 2B. El espectro contiene un conjunto completo de iones y^n con m/z 1337,7/669,8²⁺ (pérdida de Ile), m/z 1224,7/613,1²⁺ (pérdida de IleThz), m/z 1111,7 (pérdida de IleThzLeu), m/z 982,6/492,2²⁺ (pérdida de IleThzLeuGlu) y m/z 869,6 (pérdida de IleThzLeuGlu). Estas asignaciones de fragmentos se visualizan en la Figura 2A. Además de los iones b con m/z 554,5 (IleThzLeuGlu) y m/z 441,3 (IleThzLeuGlu), los iones fragmentados que resultan de de escisiones de dobles enlaces pueden observarse en m/z 227,1 (ThzLeu), m/z 356,1 (ThzLeuGlu) y en m/z 469,2 (ThzLeuGlu).

La secuenciación de la parte cíclica de Bacitracina A se realizó además, mediante el aislamiento y fragmentación del ión fragmentado de la parte del anillo en m/z 869,6 con un experimento MS³ (712,0→869,6), ver la Figura 3B. La apertura del anillo preferencial entre Orn e Ile resulta en dos series de iones de fragmentos que se muestran en la Figura 3A. Una serie comprende los iones del producto en m/z 756,5 (pérdida de Ile), m/z 609,4 (pérdida de IlePhe), m/z 472,4 (pérdida de IlePheHis) y en m/z 357,4 (pérdida de IlePheHisAsp). En la otra serie, se encuentran iones del producto en m/z 755,6 (pérdida de Orn), m/z 627,4 (pérdida de OrnLys), m/z 513,4 (pérdida de OrnLysAsn) y en m/z 398,4 (pérdida de OrnLysAsnAsp). Todos estos fragmentos de iones confirman por lo tanto la secuencia bien establecida de Bacitracina A y presenta una posibilidad para dilucidar la secuencia de análogos de Bacitracina desconocidos por comparaciones del patrón de fragmentación.

40 Bacitracina J1

Usando la misma metodología que para Bacitracina A, podría determinarse la ubicación de una modificación responsable de la diferencia +12 Da de Bacitracina A. El ion molecular doblemente protonado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 718,0) se aisló y fragmentó y el espectro (MS/MS) iónico del producto resultante se muestra en la Figura 4B. El espectro contiene un conjunto completo de iones y^n con m/z 1349,7/675,8²⁺ (pérdida de Ile), m/z 1236,7/619,1²⁺ (pérdida de IleThz), m/z 1123,7 (pérdida de IleThzLeu), m/z 994,6/498,1²⁺ (pérdida de IleThzLeuGlu) y m/z 869,6 (pérdida de IleThzLeuGluMil). Estas asignaciones de fragmentos se visualizan en la Figura 4A. Además de los iones b con m/z 566,4 (IleThzLeuGluMil) y m/z 441,3 (IleThzLeuGlu), los iones fragmentados que resultan de escisiones de dobles enlaces se pueden observar en m/z 227,1 (ThzLeu), m/z 356,1 (ThzLeuGlu) y en m/z 481,2 (ThzLeuGluMil).

Un experimento de LC-MS³ (718,0→869,6) dio lugar a iones fragmentados característicos similares a los del experimento correspondiente en la parte cíclica de Bacitracina A. Todos los iones fragmentados son por lo tanto, compatibles con un residuo que pesa 12 Da más que la Ile en la posición 5 en este componente, mientras que el resto de la secuencia parece que es idéntica a la Bacitracina A:s.

55 Bacitracina J2

Con el empleo de la misma metodología que para la Bacitracina A, se puede determinar la ubicación de una modificación responsable de la diferencia de +12 Da de Bacitracina A. El ion molecular doblemente protonado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 718,0) se aisló y fragmentó y el espectro iónico producto resultante (MS/MS) se muestra en la Figura 5B. El espectro contiene un conjunto completo de iones y^n con m/z 1349,7/675,8²⁺ (pérdida de Ile), m/z 1236,7/619,1²⁺ (pérdida de IleThz), m/z 1123,7 (pérdida de IleThzLeu), m/z 994,6/498,1²⁺ (pérdida de IleThzLeuGlu) and m/z 881,6 (pérdida de IleThzLeuGlu). Estas asignaciones de fragmentos se visualizan en la Figura 5A. Además de los iones b con m/z 554,4 (IleThzLeuGlu) y m/z 441,3 (IleThzLeuGlu), los iones fragmentados que resultan de escisiones de dobles enlaces pueden observarse en m/z 227,1 (ThzLeu), m/z 356,1 (ThzLeuGlu) y en m/z 469,2 (ThzLeuGlu). A partir de estos fragmentos se espera que la modificación de +12 Da de Bacitracina A se ubique en la porción del anillo de la molécula.

La secuenciación de la parte cíclica de Bacitracina J2 se realizó además, mediante el aislamiento y fragmentación del ión fragmentado de la parte del anillo en m/z 881,6 con un experimento MS³ (718,0→881,6), ver Figura 6B. La apertura preferencial del anillo entre Orn e Ile resulta en dos series de iones fragmentados que se muestran en la Figura 6A. Una serie comprende los iones productos en m/z 756,4 (pérdida de Mil), m/z 609,5 (pérdida de MilPhe), m/z 472,4 (pérdida de MilPheHis) y en m/z 357,4 (pérdida de MilPheHisAsp). En la otra serie, se encuentran los iones productos en m/z 767,4 (pérdida de Orn), m/z 639,4 (pérdida de OrnLys), m/z 525,4 (pérdida de OrnLysAsn) y en m/z 410,4 (pérdida de OrnLysAsnAsp). Todos estos iones de fragmentos por lo tanto, son compatibles con un residuo que pesa 12 Da más que Ile en la posición 8 en este componente, mientras que el resto de la secuencia parece que es idéntica a la Bacitracina A.

Bacitracina J3

Con el empleo de la misma metodología que para la Bacitracina A, puede determinarse la ubicación de una modificación responsable de la diferencia de +12 Da de Bacitracina A. El ión molecular doblemente protonado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 718,0) se aisló y fragmentó y el espectro iónico producto resultante (MS/MS) se muestra en la Figura 7B. El espectro contiene un conjunto completo de iones y^n con m/z 1337,8/669,8²⁺ (pérdida de Mil), m/z 1224,8/613,2²⁺ (pérdida de (MilThz), m/z 1111,7 (pérdida de MilThzLeu), m/z 982,6/492,2²⁺ (pérdida de MilThzLeuGlu) y m/z 869,6 (pérdida de MilThzLeuGlulle). Estas asignaciones de fragmento se visualizan en la Figura 7A. Además de los iones b con m/z 566,4 (MilThzLeuGlulle) y m/z 453,4 (MilThzLeuGlu), los iones fragmentados que resultan de escisiones de dobles enlaces se pueden observar en m/z 227,1 (ThzLeu), m/z 356,1 (ThzLeuGlu) y en m/z 469,2 (ThzLeuGlulle).

Un experimento de LC-MS³ (718,0→869,6) dio lugar a iones fragmentados característicos similares a los del experimento correspondiente en la parte cíclica de Bacitracina A. Todos los iones fragmentados son por lo tanto, compatibles con un residuo que pesa 12 Da más que la Ile en la posición 1 en este componente, mientras que el resto de la secuencia parece que es idéntica a la Bacitracina A:s.

Experimento 2: Aislamiento de los componentes

Para esclarecer las estructuras de los tres componentes con espectroscopía de NMR, deben prepararse las muestras enriquecidas. Idealmente, cada uno de los tres componentes se debe aislar con aproximadamente 90% de pureza para obtener espectros de NMR "limpios", libre de las señales de interferencia de otros componentes. El aislamiento se hizo en dos etapas. En la primera etapa, se usó una columna LiChroprep RP-18 (25-40 μ m, 35 x 5 cm) para eliminar los componentes que eluyen antes y después de los tres componentes. La fase móvil consistió en metanol/acetronitrilo/0,03 M de formiato de amonio pH 6,0 3,5:31,5:65, v/v /v. De esta manera, se obtuvo el material purificado con una pureza total de aproximadamente 25% para los tres componentes. En la segunda etapa, se usó una columna YMC-Pack ODS-A (5 μ m, 250 x 10 mm) para separar los tres componentes entre sí. La fase móvil consistió de metanol/acetronitrilo/0,025 M de acetato de amonio pH 6,0 58:5:37, v/v/v. El resultado final de esta etapa 2 de purificación fueron 4 muestras (denominadas muestras B, B', C y C'), donde las muestras B y B' fueron similares y contuvieron principalmente Bacitracina J1 y Bacitracina A, y donde las muestras C y C' fueron similares y contuvieron principalmente Bacitracina J2 y Bacitracina J3 (Tabla 1).

LC-MSⁿ se realizó en todas las muestras para verificar que se aislaron los componentes correctos. La pureza de las muestras B y C fue mucho menor que lo que generalmente se piensa que es necesario para el esclarecimiento completo de la NMR. Sin embargo, como el otro componente principal en la muestra B fue Bacitracina A, se decidió intentar una investigación de NMR sin purificación adicional. Mediante la realización de la primera investigación de NMR de una muestra con contenido enriquecido de Bacitracina A (denominada muestra A, anteriormente preparada), se esperaba que, además de servir como compuesto de referencia, las señales de Bacitracina A pueden ser omitidas de los espectros de la muestra B. Como la muestra C contenía una mezcla de Bacitracina J2 y Bacitracina J3, no puede esperarse por anticipado la elucidación estructural completa debido a un alto grado de señales superpuestas.

Sin embargo, como se esperaban que las modificaciones en estos componentes fueran las mismas que en Bacitracina J1 (de los ensayos LC-MSⁿ, ver Experimento 1), todavía se especuló que los experimentos de NMR en combinación con los resultados de LC-MSⁿ, darían suficiente evidencia estructural.

Tabla 1. Las proporciones (área-% a 254 nm) de los componentes de Bacitracina A, Bacitracina J1, Bacitracina J2 y Bacitracina J3 en las muestras A, B, B', C y C'.

Muestra	Bacitracina A área-%	Bacitracina J1 área-%	Bacitracina J2 área-%	Bacitracina J3 área-%
A	93	---	---	---
B	20	63	---	---
B'	12	54	4	2
C	4	2	54	20
C'	---	3	52	20

Experimento 3: Determinación de la masa exacta

Las muestras A, B' y C se analizaron mediante la determinación de la masa exacta (ver Tabla 2). La diferencia de peso molecular entre Bacitracina J1/Bacitracina A fue de 11,9998. Las diferencias de peso molecular entre ambos Bacitracina J2/Bacitracina A y Bacitracina J3/Bacitracina A fueron 12,0000, respectivamente. Esto dio una evidencia adicional de que los componentes de Bacitracina J1, Bacitracina J2 y Bacitracina J3 tuvieron composiciones elementales que constan de un átomo de carbono (masa exacta 12,0000) más que la Bacitracina A.

Tabla 2. Masa exacta obtenida por determinaciones exactas de masa en las muestras A, B' y C.

Muestra	Bacitracina A Masa exacta	Bacitracina J1 Masa exacta	Bacitracina J2 y Bacitracina J3 Masa exacta
A	1421,7560		
B'		1433,7558	
C			1433,7560

Experimento 4: NMR

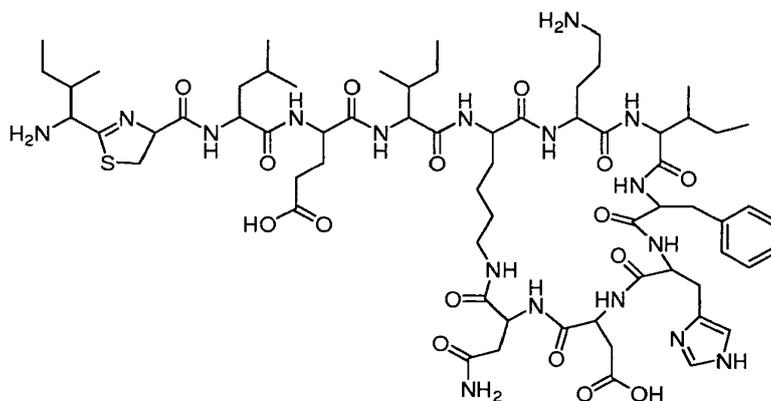
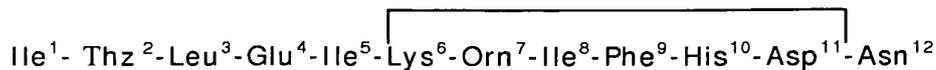
Los espectros de RMN se registraron en soluciones 10 mM de las muestras A, B y C en 95% de tampón fosfato pH 6,5 / 5% de D₂O a 303 K. Se obtuvieron los experimentos en un espectrómetro Bruker 600 MHz utilizando secuencias de pulso estándar para los experimentos de correlación de desplazamiento químico de protones homonuclear bidimensional (DQF-COSY, TOCSY, NOESY), correlación heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC, HMBC) y correlación heteronuclear ¹H-¹⁵N (HSQC). Se usaron tiempos de mezcla de 20 ms y 60 ms para los experimentos de TOCSY y tiempos de 100 ms, 200 ms, 400 ms y 600 ms de mezcla se usaron en los experimentos NOESY. Para la muestra C, se obtuvo un experimento DEPT (135). Los desplazamientos químicos se informan en p.p.m., usando ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfónico (0,5 mM) como referencia interna.

Resultados

Muestra A (Bacitracina A)

Identificación de los sistemas de giro de aminoácidos se realizaron mediante los experimentos de correlación de desplazamiento químico (DQF-COSY y TOCSY) de 2D ¹H-¹H correlación de desplazamiento químico heteronuclear (HSQC) de ¹H-¹³C y ¹H-¹⁵N en el modo detectado ¹H y los datos se resumen en la Tabla 3. Los datos de desplazamiento químico son consistentes con la presencia de residuos de Ile, Thz, Leu, Glu, Ile, Lys, Orn, Ile, Phe, His, Asp y Asn, tanto de las comparaciones de los datos de desplazamiento químico de ¹H en Kobayashi y *otros.* (1992) (ver Tabla 3) como las estadísticas de desplazamiento químico que se encuentran en la base de datos BMRB (ver Tabla 3).

La secuencia de los residuos de aminoácidos se estableció a partir de los experimentos de correlación 2D ¹H-¹H (NOESY, Tabla 4) y ¹H-¹³C (HMBC, Tabla 5). El acoplamiento dipolar (a través del espacio, NOESY) y acoplamiento escalar de largo alcance (HMBC) estuvieron de acuerdo con la secuencia bien establecida de Bacitracina A:



Estructura 1: Bacitracina A.

Tabla 3. Desplazamientos químicos ¹H, ¹³C y ¹⁵N para Bacitracina A (en la muestra A) y Bacitracina J1 (en la muestra B). Los datos se registraron en 95% de tampón fosfato pH 6,5 / 5% D₂O a 303 K. Los desplazamientos químicos se informaron en p.p.m., usando ácido 2,2-Dimetil-2-silapentano-5-sulfónico (0,5 mM) como referencia interna.

Residuo	Nombre atómico ^a	Desplazamiento de Bacitracina A observado	Desplazamiento de Bacitracina J1 observado	Desplazamiento de Bacitracina A de la publicación ^b	Estadística del desplazamiento químico ^c
Ile ¹	H	-	-	-	8,28
	HA	4,30	4,31	4,35	4,18
	HB	2,08	2,09	2,09	1,79
	HG12	1,50	1,50	1,50	1,27
	HG13	1,28	1,28	1,31	1,21
	HG2	1,05	1,06	1,07	0,78
	HD1	0,95	0,96	0,97	0,68
	C	175,2	175,1	-	175,89
Thz ²	CA	60,2	60,2	-	61,63
	CB	39,7	39,6	-	38,61
	CG1	26,6	26,7	-	27,74
	CG2	17,0	16,9	-	17,54
	CD1	13,6	13,6	-	13,46
	N	-	-	-	121,51
	H	-	-	-	-
	HA	5,25	5,24	5,28	-
	HB2	3,79	3,79	3,79	-
	HB3	3,60	3,61	3,59	-
	HG	-	-	-	-
	C	175,6	175,5	-	-
	CA	79,9	79,9	-	-
	CB	38,6	38,6	-	-
	N	-	-	-	-

ES 2 588 205 T3

	Leu ³	H	8,19	8,20	8,16	8,22
5		HA	4,44	4,44	4,52	4,31
		HB2	1,69	1,70	1,61	1,62
		HB3	1,60	1,60	1,61	1,54
		HG	1,58	1,59	1,71	1,51
10		HD1	0,92	0,92	0,94	0,76
		HD2	0,86	0,88	0,89	0,74
		C	177,5	177,6	-	177,01
15		CA	55,4	55,5	-	55,66
		CB	42,9	42,8	-	42,29
		CG	27,1	27,0	-	26,80
		CD1	24,8	24,9	-	24,68
20		CD2	23,5	23,5	-	24,10
		N	124,1	124,2	-	121,85
	Glu ⁴	H	8,82	8,84	8,67	8,33
25		HA	4,26	4,26	4,43	4,25
		HB2	2,06	2,08	2,16	2,03
		HB3	1,94	1,94	2,01	2,00
30		HG2	2,27	2,28	2,46	2,28
		HG3	2,27	2,28	2,46	2,26
		C	176,7	176,5	-	176,93
35		CA	57,1	56,9	-	57,36
		CB	30,1	30,1	-	30,00
		CG	36,2	36,1	-	36,09
		CD	183,8	183,6	-	182,57
40		N	121,4	121,4	-	120,68
	Ile ⁵	H	8,16	-	8,07	8,28
45		HA	4,12	-	4,16	4,18
		HB	1,82	-	1,65	1,79
		HG12	1,37	-	1,39	1,27
		HG13	1,12	-	1,14	1,21
50		HG2	0,82	-	0,85	0,78
		HD1	0,81	-	0,83	0,68
		C	176,0	-	-	175,89
55		CA	61,2	-	-	61,63
		CB	38,5	-	-	38,61
		CG1	27,1	-	-	27,74
		CG2	17,4	-	-	17,54
60		CD1	12,9	-	-	13,46
		N	120,2	-	-	121,51

65

ES 2 588 205 T3

	Lys ⁶	H	8,31	8,33	8,29	8,19
5		HA	4,26	4,27	4,31	4,26
		HB2	1,81	1,81	1,82	1,78
		HB3	1,71	1,70	1,82	1,75
10		HG2	1,38	1,39	1,34	1,37
		HG3	1,29	1,29	1,33	1,36
		HD2	1,51	1,51	1,52	1,61
		HD3	1,51	1,51	1,52	1,60
15		HE2	3,21	3,21	3,28	2,92
		HE3	3,21	3,21	3,20	2,91
		HZ	8,04	8,04	7,83	7,42
20		C	175,7	176,4	-	176,68
		CA	56,9	56,8	-	56,97
		CB	33,1	33,2	-	32,78
25		CG	24,6	24,7	-	24,93
		CD	29,8	29,8	-	28,96
		CE	41,5	41,6	-	41,91
		N	121,0	121,1	-	121,07
30						
	Orn ⁷	H	8,18	8,23	8,11	-
		HA	4,44	4,44	4,48	-
		HB2	1,87	1,87	1,70	-
35		HB3	1,78	1,77	1,70	-
		HG2	1,67	1,68	1,86	-
		HG3	1,67	1,68	1,77	-
40		HD2	3,01	3,01	3,04	-
		HD3	3,01	3,01	3,04	-
		HE	-	-	7,58	-
45		C	175,7	175,7	-	-
		CA	55,4	55,5	-	-
		CB	31,3	31,2	-	-
		CG	26,1	26,1	-	-
50		CD	41,9	41,8	-	-
		N	119,9	120,0	-	-
		NE	-	-	-	-
55						
	Ile ⁸	H	8,31	8,32	8,17	8,28
		HA	4,10	4,09	4,17	4,18
		HB	1,70	1,69	1,72	1,79
60		HG12	1,20	1,21	1,22	1,27
		HG13	0,96	0,97	0,99	1,21
		HG2	0,56	0,56	0,60	0,78
65		HD1	0,75	0,75	0,76	0,68

ES 2 588 205 T3

	C	176,1	176,1	-	175,89
	CA	61,2	61,3	-	61,63
	CB	38,5	38,5	-	38,61
5	CG1	27,1	27,0	-	27,74
	CG2	17,1	17,1	-	17,54
	CD1	13,0	13,0	-	13,46
10	N	124,7	125,0	-	121,51
	Phe ⁹				
	H	8,62	8,65	8,55	8,36
	HA	4,64	4,64	4,65	4,62
15	HB2	3,15	3,16	3,19	3,00
	HB3	2,86	2,86	2,90	2,95
	HD1	7,22	7,23	7,22	7,06
20	HD2	7,22	7,23	7,22	7,06
	HE1	7,33	7,34	7,31	7,09
	HE2	7,33	7,34	7,31	7,08
	HZ	7,28	7,28	7,26	7,01
25	C	175,3	175,3	-	175,48
	CA	57,8	57,8	-	58,13
	CB	39,9	39,9	-	39,93
30	CG	139,0	139,0	-	138,26
	CD1	131,8	131,8	-	131,54
	CD2	131,8	131,8	-	131,60
	CE1	131,5	131,5	-	130,67
35	CE2	131,5	131,5	-	130,76
	CZ	129,9	129,9	-	129,23
	N	125,0	125,1	-	120,51
40	His ¹⁰				
	H	8,54	8,55	8,59	8,23
	HA	4,81	4,82	4,82	4,61
	HB2	3,20	3,22	3,30	3,11
45	HB3	2,96	2,97	3,03	3,05
	HD1	-	-	-	8,85
	HD2	6,97	6,99	8,55	7,03
50	HE1	8,45	8,55	7,03	7,98
	HE2	-	-	-	9,82
	C	174,0	173,8	-	175,28
55	CA	55,2	55,1	-	56,49
	CB	30,6	30,3	-	30,19
	CG	131,4	131,0	-	131,49
	CD2	120,3	120,2	-	120,46
60	CE1	137,0	136,6	-	137,53
	N	119,8	119,6	-	119,56
	ND1	-	-	-	195,69
65	NE2	-	-	-	182,33

ES 2 588 205 T3

	Asp ¹¹	H	8,66	8,69	8,75	8,31
5		HA	4,64	4,65	4,73	4,60
		HB2	2,66	2,68	2,87	2,72
		HB3	2,61	2,61	2,79	2,67
10		C	175,8	175,7	-	176,44
		CA	54,5	54,4	-	54,68
		CB	41,7	41,6	-	40,87
		CG	180,0	180,0	-	179,27
15		N	121,5	121,4	-	120,69
	Asn ¹²	H	8,66	8,66	8,61	8,35
		HA	4,64	4,64	4,70	4,67
20		HB2	2,81	2,82	2,91	2,81
		HB3	2,73	2,74	2,83	2,76
		HD21	7,63	7,63	7,59	7,35
25		HD22	6,97	6,97	7,12	7,14
		C	174,9	174,9	-	175,31
		CA	53,8	53,8	-	53,55
		CB	39,2	39,2	-	38,68
30		CG	177,3	177,3	-	176,77
		N	119,0	118,9	-	118,97
		ND2	113,3	113,3	-	112,79
35		Mil ⁵	H	-	8,19	-
			HA	-	4,11	-
			HB	-	1,98	-
40			HG12	-	2,10	-
			HG13	-	1,90	-
			HG2	-	0,82	-
45			HD	-	5,72	-
			HE1	-	5,06	-
			HE2	-	5,06	-
			C	-	175,7	-
50			CA	-	60,8	-
			CB	-	36,7	-
			CG1	-	38,8	-
55			CG2	-	17,9	-
			CD	-	138,2	-
			CE	-	120,1	-
60			N	-	119,9	-

a. Nomenclatura de acuerdo con recomendaciones de la IUPAC para la presentación de estructuras por NMR de proteínas y ácidos nucleicos.

b. Kobayashi y otros (1992) FEBS Lett. 2, 105-09.

c. Base de datos de BMRB: Las estadísticas calculadas para los desplazamientos químicos seleccionados. http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm

Tabla 4. Datos de protones NOE para Bacitracina A (en la muestra A) y Bacitracina J1 (en la muestra B). Las mediciones se realizaron a partir de experimentos NOESY.

5

10

15

20

25

30

Protón de la cadena principal amida	Protón observado	
	Intraresiduo NOE	Interresiduo NOE
Leu ³	HA	HA de Thz ²
Glu ⁴	HA	HA de Leu ³
Ile ⁵	HA	HA de Glu ⁴
Lys ⁶	HA	HA de Ile ⁵
Orn ⁷	HA	HA de Lys ⁶
Ile ⁸	HA	HA de Orn ⁷
Phe ⁹	HA	HA de Ile ⁸
His ¹⁰	HA	HA de Phe ⁹
Asp ¹¹	HA	HA de His ¹⁰
Asn ¹²	HA	HA de Asp ¹¹
Lys ^{6 a}	HE2/HE3	HA de Asn ¹²
Mil ^{5 b}	HA	HA de Glu ⁴
Lys ^{6 b}	HA	HA de Mil ⁵

a. Protón de la cadena lateral amida.

b. Datos NOE que ocurren sólo para Bacitracina J1.

Tabla 5. Las conectividades inter- e intraresiduo ²J_{H,C} de los carbonos carbonilos de Bacitracina A (en la muestra A) y Bacitracina J1 (en la muestra B). Las medidas fueron hechas de experimentos HMBC.

35

40

45

50

55

60

Carbono de carbonilo	Intraresiduo de protones	Interresiduo de protones
Ile ^{1 a}	HA	HA de Thz ²
Thz ²	HA	H de Leu ³
Leu ³	HA	H de Glu ⁴
Glu ⁴	HA	H de Ile ⁵
Ile ⁵	HA	H de Lys ⁶
Lys ⁶	HA	H de Orn ⁷
Orn ⁷	HA	H de Ile ⁸
Ile ⁸	HA	H de Phe ⁹
Phe ⁹	HA	H de His ¹⁰
His ¹⁰	HA	H de Asp ¹¹
Asp ¹¹	HA	H de Asn ¹²
Asn ¹²	HA	HZ de Lys ⁶
Glu ^{4 b}	HA	H de Mil ⁵
Mil ^{5 b}	HA	H de Lys ⁶

a. Carbono de carbonilo condensado en el anillo de 2-tiazolina.

b. Datos HMBC que ocurren sólo para Bacitracina J1.

65

Muestra B (Bacitracina J1)

La identificación de los sistemas de giro de los aminoácidos se realizaron mediante experimentos de desplazamiento químico 2D ^1H - ^1H (DQF-COSY y TOCSY) y correlación de desplazamiento químico heteronuclear ^1H -(^1H -DQF-COSY y TOCSY) ^{13}C y ^1H - ^{15}N (HSQC) en el modo detectado ^1H y los datos se resumen en la Tabla 3. Los datos de desplazamiento químico para los residuos de Ile, Thz, Leu, Glu, Lys, Orn, Ile, Phe, His, Asp y Asn son casi idénticos a los datos correspondientes para Bacitracina A, lo que indica que los mismos residuos se encuentran sin modificar en el principal componente de la muestra B. Notablemente, el sistema de giro correspondiente a Ile⁵ en Bacitracina A fue significativamente más débil en esta muestra en comparación con la muestra A (recordar que la muestra B contenía aproximadamente 20% de Bacitracina A).

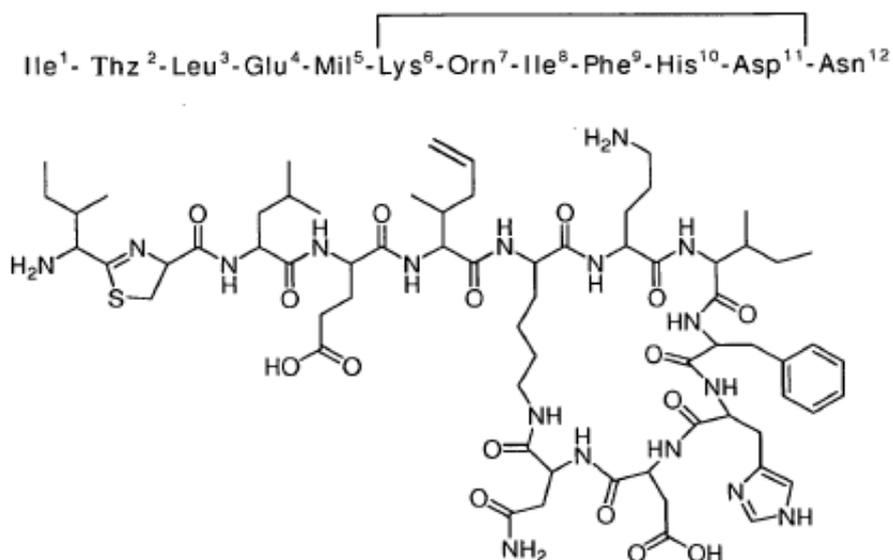
Además de estas señales, un sistema de giro acoplado $^3J_{\text{H,H}}$ se encontró con resonancias en δ 8.19 (protones de la cadena principal amida), 5,72, 5,06, 4,11, 2,10, 1,98, 1,90 y 0,82. Cruzamiento de picos HSQC en δ 5,72/138,2, δ 5,06/120,1, δ 4,11/60,8, δ 2,10/38,8, δ 1,90/38,8, δ 1,98/36,7 y en δ 0,82/17,9 indicó al menos seis grupos CH_x .

Cruzamiento de picos COSY en δ 8,19/4,11, δ 4,11/1,98, δ 1,98/0,82 y cruzamiento de picos HMBC en δ 8,19/60,8, δ 4,11/175,7, δ 4,11/36,7, δ 4,11/17,9, δ 0,82/60,8 y en δ 0,82/36,7 evidenció el siguiente elemento $\text{NHCH}(\text{CO})\text{CHCH}_3$, que se apoyó además con las correlaciones NOE esperadas.

Cruzamiento de picos COSY en δ 2,10/1,90 y cruzamiento de picos HMBC en δ 4,11/38,8, δ 0,82/38,8, δ 1,90/36,7 y en δ 1,90/17,9 evidenció el siguiente elemento $\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$, que se apoyó además con las correlaciones NOE esperadas.

Cruzamiento de picos COSY en δ 5,72/2,10, δ 5,72/1,90, δ 5,72/5,06 y cruzamiento de picos HMBC en δ 5,72/38,8, δ 1,90/138,2, δ 5,06/38,8 y en δ 1,90/120,1 evidenció el siguiente nuevo elemento $-\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, que se apoyó además con las correlaciones NOE esperadas. Todos los datos de desplazamiento químico de este aminoácido análogo inusual a Ile son similares a los datos predichos generados por ChemDraw (datos no mostrados).

La secuencia de los residuos de aminoácidos se estableció a partir de los experimentos de correlación 2D ^1H - ^1H (NOESY, Tabla 4) y ^1H - ^{13}C (HMBC, Tabla 5). Se encontró que la secuencia de aminoácidos fue la misma que en Bacitracina A, donde el análogo Ile inusual (denominado 5-metilen-Isoleucina) sustituye a Ile en la posición 5. Los datos NMR están por lo tanto, de acuerdo con los resultados de LC-MSⁿ y la determinación de la masa exacta, donde todos los datos indican la presencia del siguiente análogo de Bacitracina A en la muestra A:

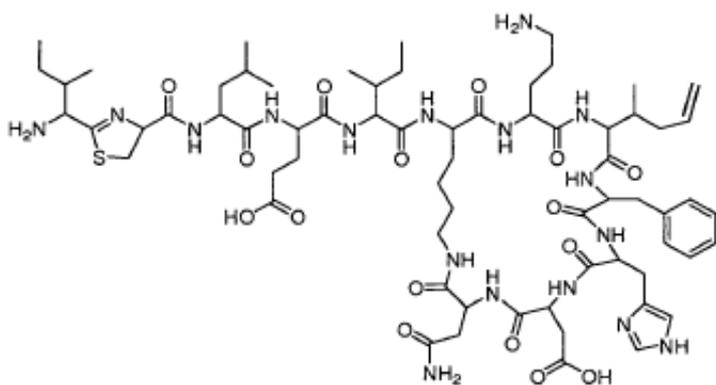
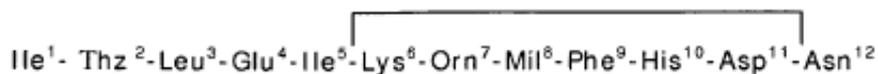


Estructura 2. Bacitracina J1

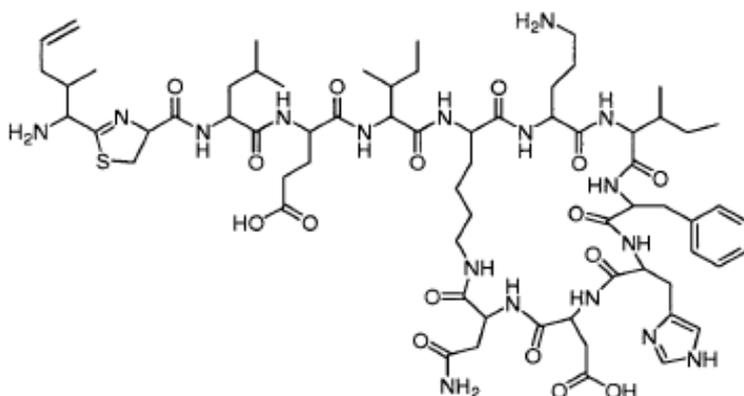
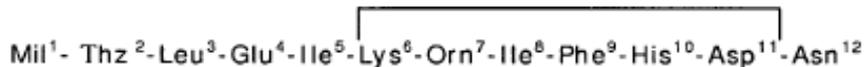
Muestra C (Bacitracina J2 y Bacitracina J3)

Los datos de NMR evidenciaron la presencia de dos residuos del mismo análogo Ile inusual que estuvo presente en la muestra B (ver la Tabla 6). Además de los experimentos 2D que se adquirieron para las muestras A y B, un experimento DEPT(135) se llevó a cabo también en la muestra C (Tabla 6). Este experimento verificó además la estructura de los dos aminoácidos análogos inusuales e idénticos a Ile en la muestra C. Uno de estos análogos Ile se situó en el extremo N-terminal (como se indica por su falta visible de protones de la cadena principal amida), y fue correspondientemente denotado 5-metilen-Isoleucina¹. El otro análogo Ile se encuentra en la posición 8, como se evidenció mediante las correlaciones NOESY y HMBC, y por lo tanto, se denota 5-metilen-Isoleucina⁸. Los datos de NMR están, por lo tanto, de

acuerdo con los resultados de LC-MSⁿ la determinación de la masa exacta. Todos los datos indican la presencia de dos análogos de bacitracina A en la muestra C, donde el análogo Ile inusual reemplaza a Ile en la posición 8 en un análogo de Bacitracina A, y donde el análogo Ile inusual reemplaza a Ile en la posición 1 en el segundo análogo de Bacitracina A:



Estructura 3. Bacitracina J2



Estructura 4. Bacitracina J3

Tabla 6. Desplazamientos químicos ¹H, ¹³C y ¹⁵N y datos DEPT(135) para la Bacitracina J2 y Bacitracina J3 (en la muestra C). Los datos registrados en 95% de tampón fosfato pH 6,5 / 5% D₂O a 303 K. Los desplazamientos químicos se informan en p.p.m., usando ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfónico (0,5 mM) como referencia interna.

ES 2 588 205 T3

Residuo	Nombre atómico ^a	Desplazamiento de Bacitracina J2 observado	Desplazamiento de Bacitracina J3 observa	Señal DEPT(135)	Asignación DEPT(135)
5	Mil ⁸	H	8,26		
		HA	4,12		
		HB	1,87		
10		HG12	1,99		
		HG13	1,77		
		HG2	0,56		
15		HD	5,67		
		HE1	5,03		
		HE2	5,03		
		C	175,8	-	C
20		CA	60,8	Positivo	CH
		CB	36,8	Positivo	CH
		CG1	38,8	Negativo	CH ₂
25		CG2	17,7	Positivo	CH ₃
		CD	138,6	Positivo	CH
		CE	119,7	Negativo	CH ₂
		N	124,5		
30					
	Mil ¹	H		-	
		HA		4,33	
		HB		2,27	
35		HG12		2,26	
		HG13		2,07	
		HG2		1,06	
40		HD		5,82	
		HE1		5,16	
		HE2		5,16	
45		C		174,7	-
		CA		59,6	Positivo
		CB		37,9	Positivo
		CG1		38,2	Negativo
50		CG2		17,2	Positivo
		CD		138,2	Positivo
		CE		120,4	Negativo
55		N		-	

a. Nomenclatura de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC para la presentación de estructuras de NMR de proteínas y ácidos nucleicos.

Experimento 5: Potencia

La actividad antibacteriana de las muestras A, B' y C' (ver la Tabla 1) se midió. La actividad antibacteriana específica (que se enumera en la presente como IU/mg), denominada frecuentemente potencia, se midió mediante la comparación de la actividad antibacteriana de la muestra desconocida con respecto a las muestras conocidas (estándar). Específicamente, un estándar de bacitracina de zinc se disolvió y se diluyó a 2,0, 1,0, y 0,5 UI de bacitracina/ml en 0,07

M de tampón fosfato pH 6,0. Estas tres soluciones estándar se añadieron a placas de agar inoculadas con el organismo de prueba, *Micrococcus luteus*. Las muestras desconocidas se disolvieron, diluyeron y añadieron a la misma placa como los estándares. Después de 16-24 horas a 32-37 C, se midieron las zonas de inhibición y las muestras desconocidas se compararon con los estándares. Los resultados (informados como IU/mg) de cada muestra se enumeran en la Tabla 7.

5

Tabla 7 Potencia (actividad antibacteriana específica, UI/mg) de las muestras aisladas. Organismo Prueba: *Micrococcus luteus*.

10

Muestra	Potencia (IU/mg)
A	72
B'	53
C'	60

15

20

La muestra A contenía, como se enumeró en la Tabla 1, 93% (medido con HPLC a 254 nm) de Bacitracina A (y no Bacitracina J1, J2 o J3). La actividad antibacteriana específica de Bacitracina A se puede calcular después a 77,4 IU/mg. Esta es más baja que la anteriormente informada. Las posibles explicaciones pueden ser agua o contenido de sales, así como los posibles efectos antagonistas de los componentes menores. Como las muestras B' y C' contienen mezclas de diversas Bacitracinas, no es posible informar una actividad antimicrobiana exacta específica (UI/mg) de las Bacitracinas J1, J2 o J3. Sin embargo, los datos disponibles indican fuertemente que las potencias de Bacitracina J1, J2 y J3 son similares o superiores a la de Bacitracina A. También, las muestras B' y C' pueden contener agua, sal y/o componentes que tienen efectos sinérgicos o antagónicos.

25

Reivindicaciones

1. Un compuesto representado por la Fórmula

5

10

15

20

25

30

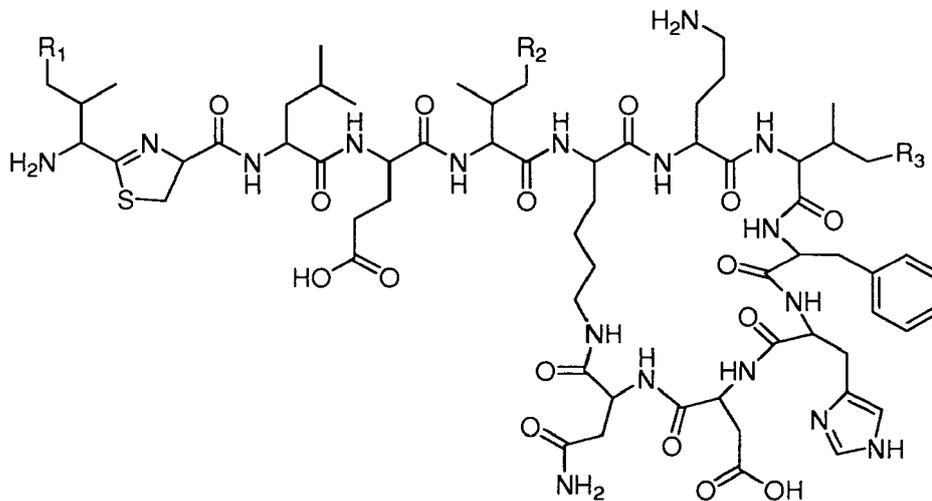
35

40

45

50

55

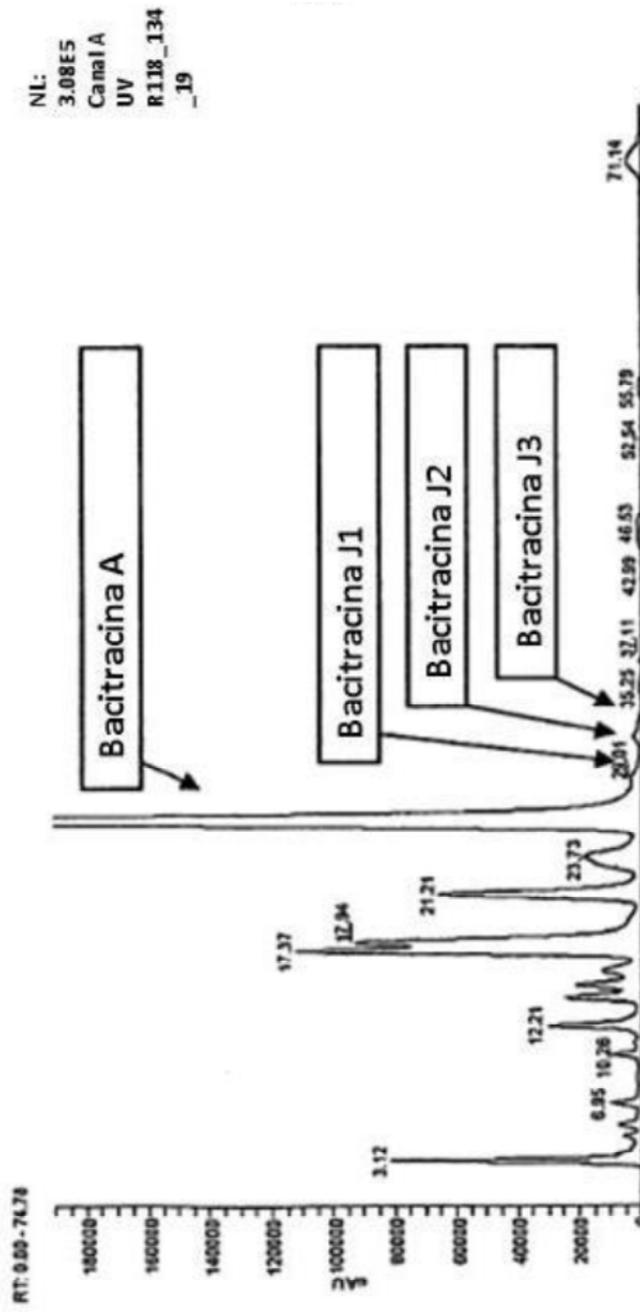


en donde
al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es -CH=CH₂, y

en donde
R₁, R₂ y R₃ son independientemente -H, -CH₃, o -CH=CH₂, y
sales e hidratos de estos.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno de R₁, R₂ y R₃ es -CH₃.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dos de R₁, R₂ y R₃ son -CH₃.
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₁ es -CH=CH₂.
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₂ es -CH=CH₂.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₃ es -CH=CH₂.
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₁ y R₂ son -CH=CH₂.
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₂ y R₃ son -CH=CH₂.
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₁ y R₃ son -CH=CH₂.
10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno de R₁, R₂ y R₃ son -CH=CH₂.
11. Una composición que comprende el compuesto de la reivindicación 1.
12. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1.
13. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación del medicamento para el tratamiento de las infecciones bacterianas.
14. Método para la producción de compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 mediante la sustitución de isoleucina o valina con 5-metilen-isoleucina durante la síntesis *in vitro* de Bacitracina.

Figura 1A



NL:
3.69E6
TIC MS
R118_134
_19

Figura 1B

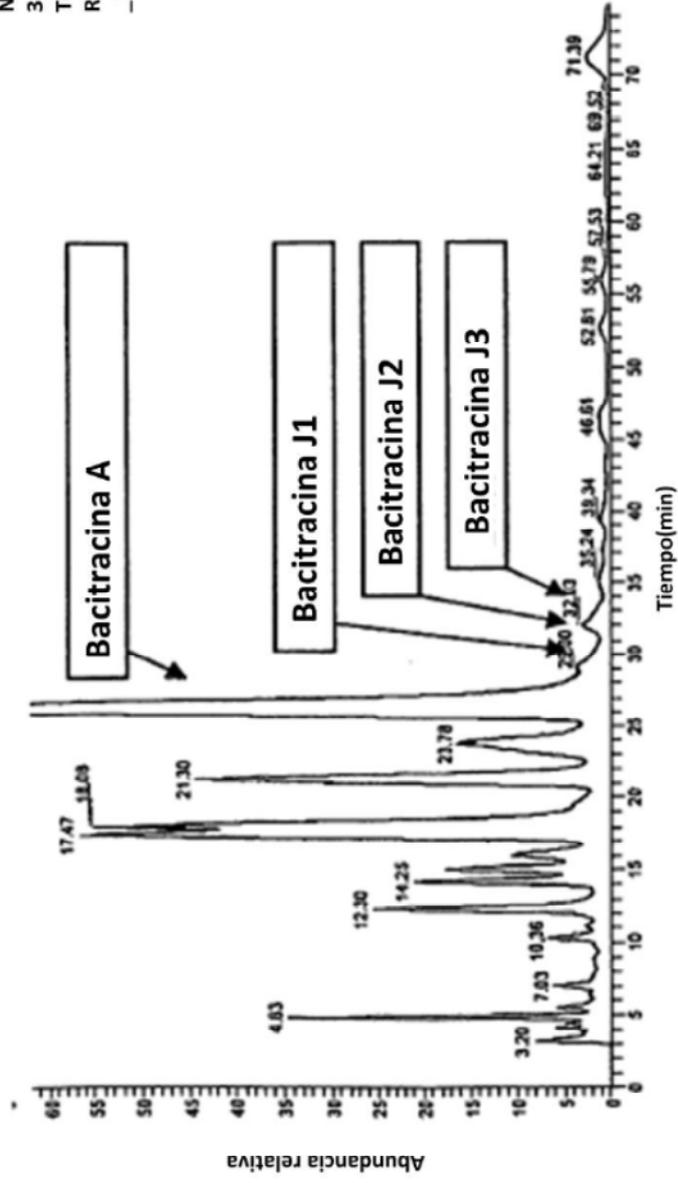


Figura 2A

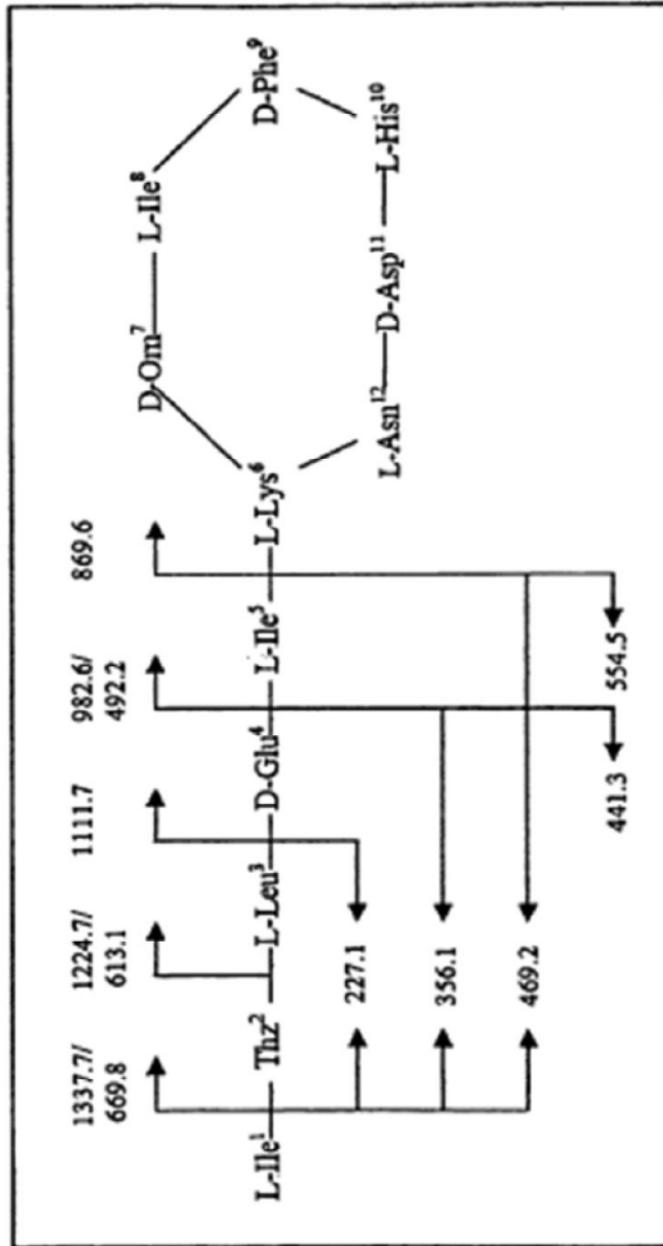


Figura 2B

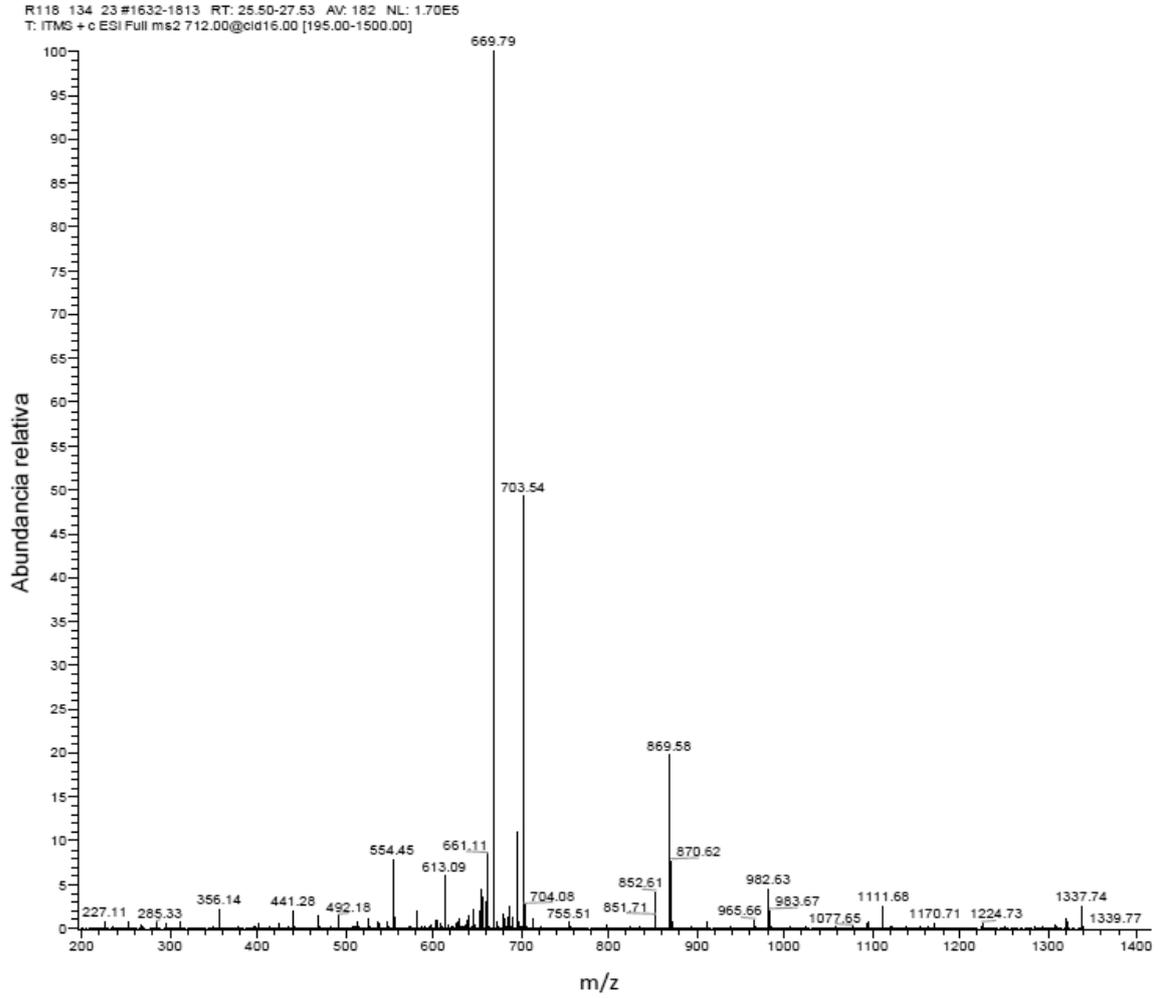


Figura 3A

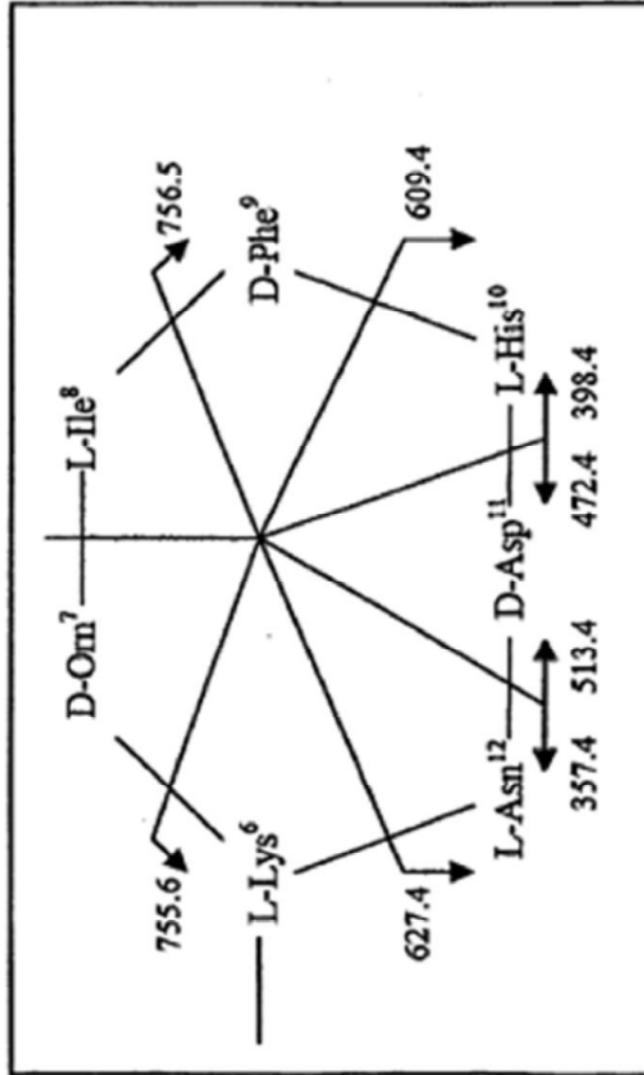


Figura 3B

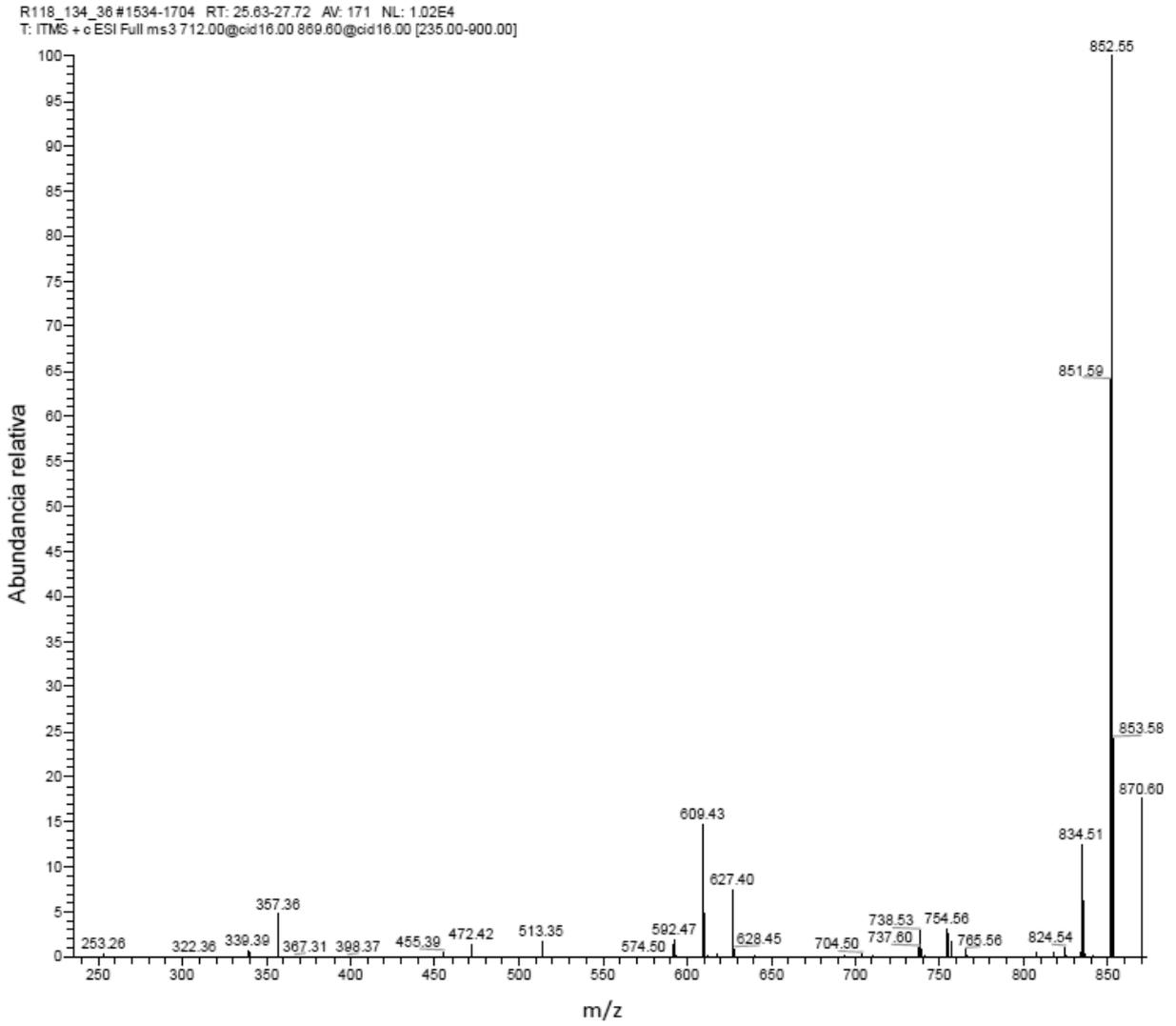


Figura 4A

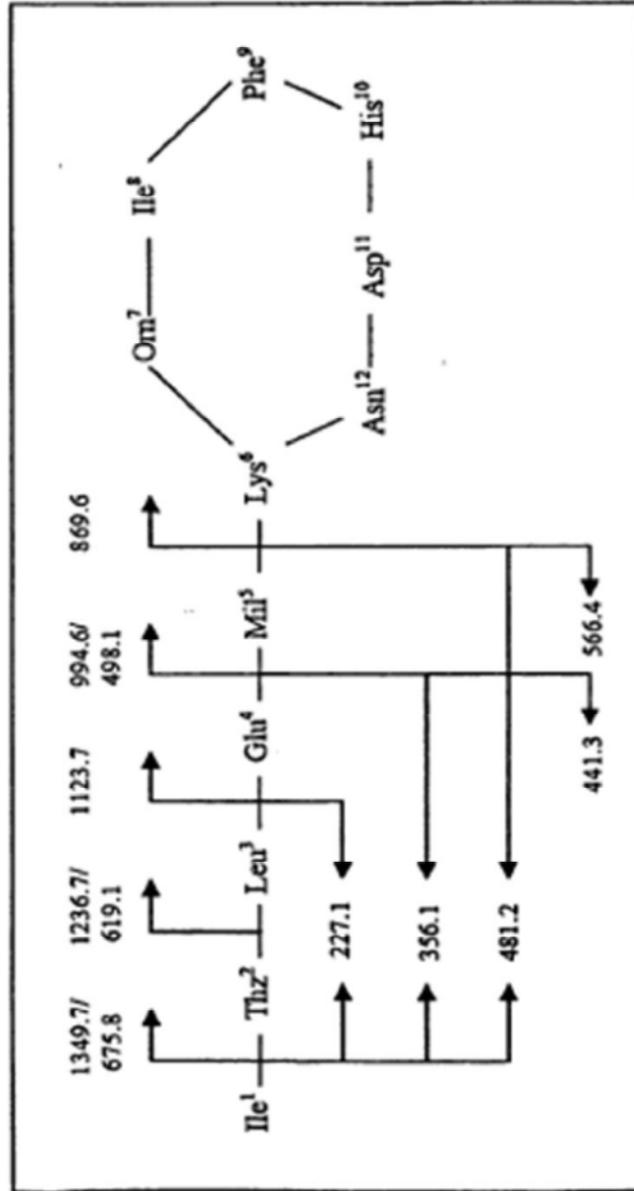


Figura 4B

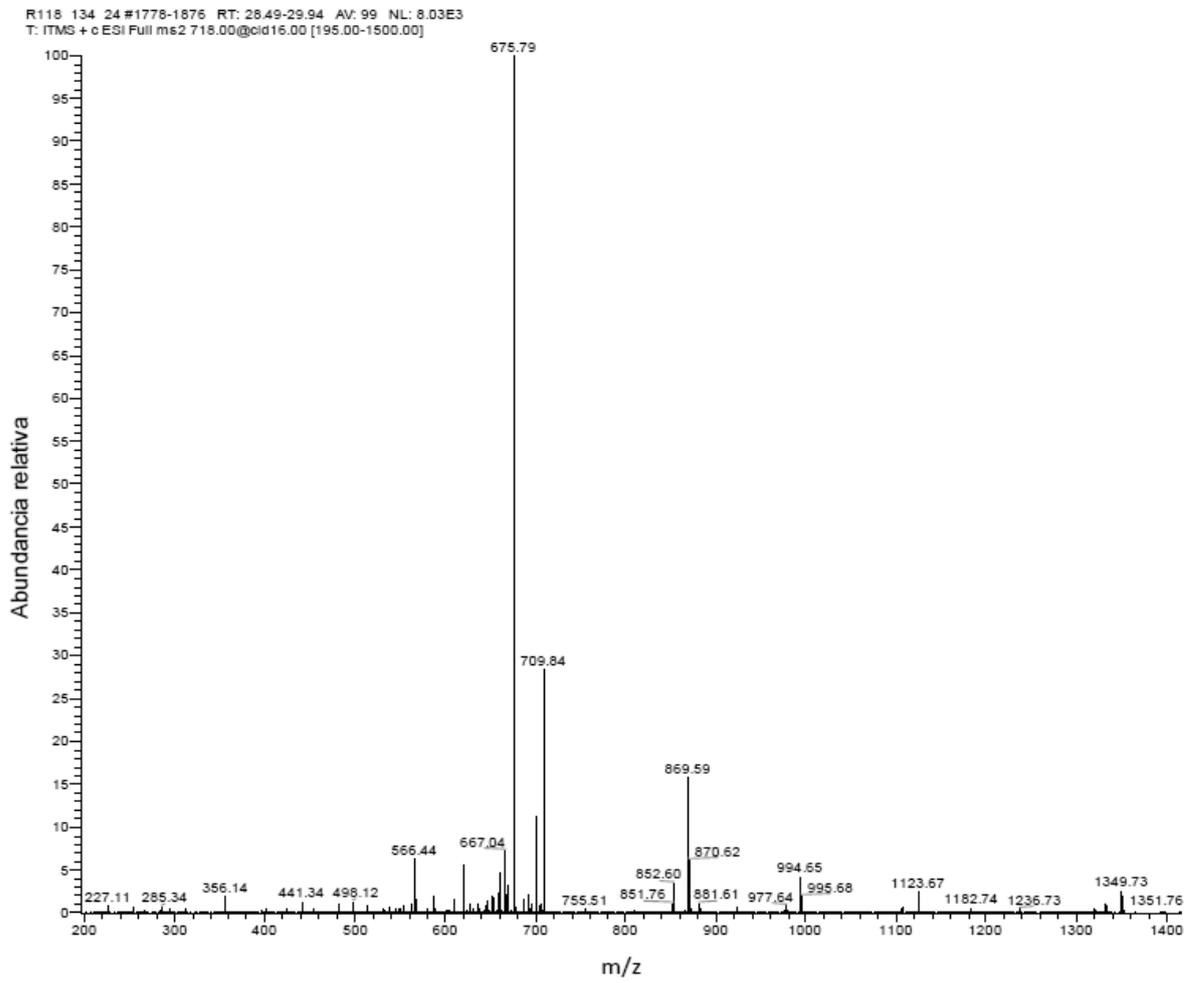


Figura 5A

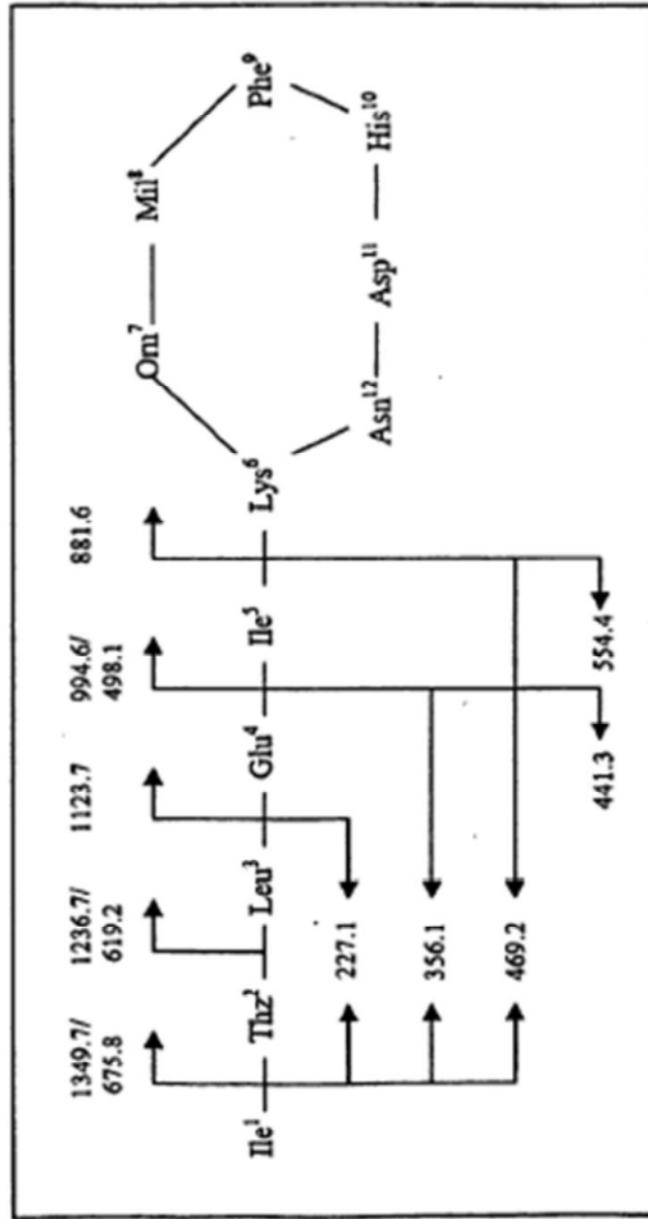


Figura 5B

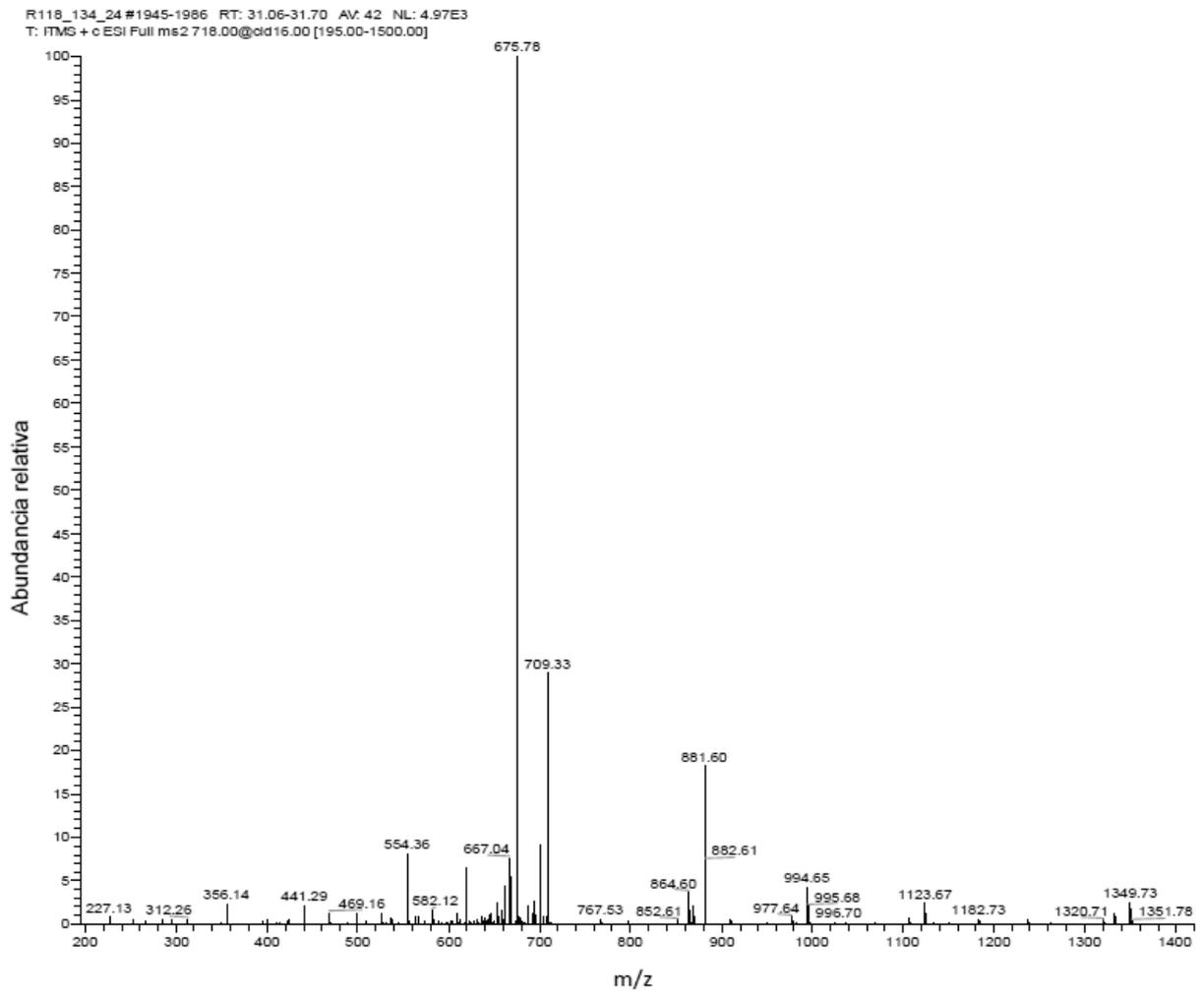


Figura 6A

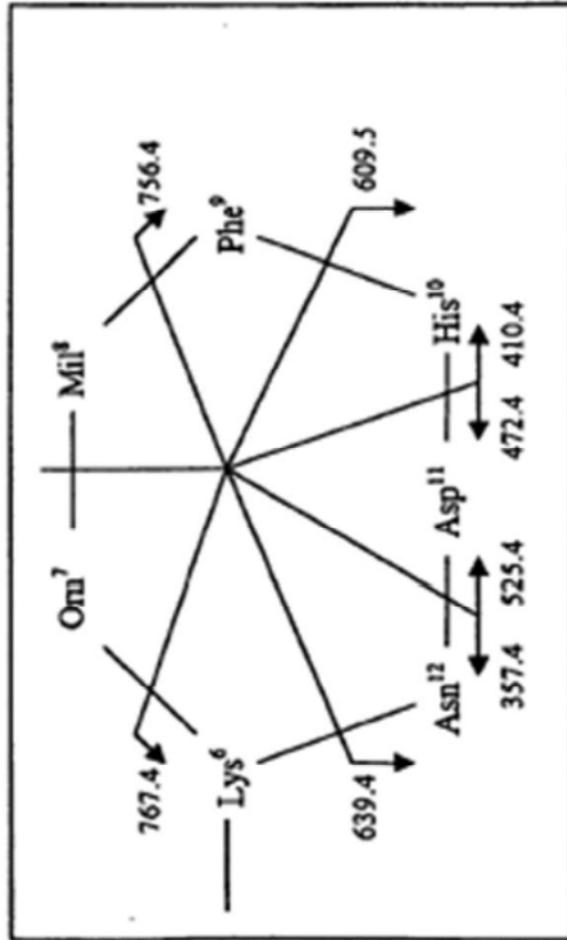
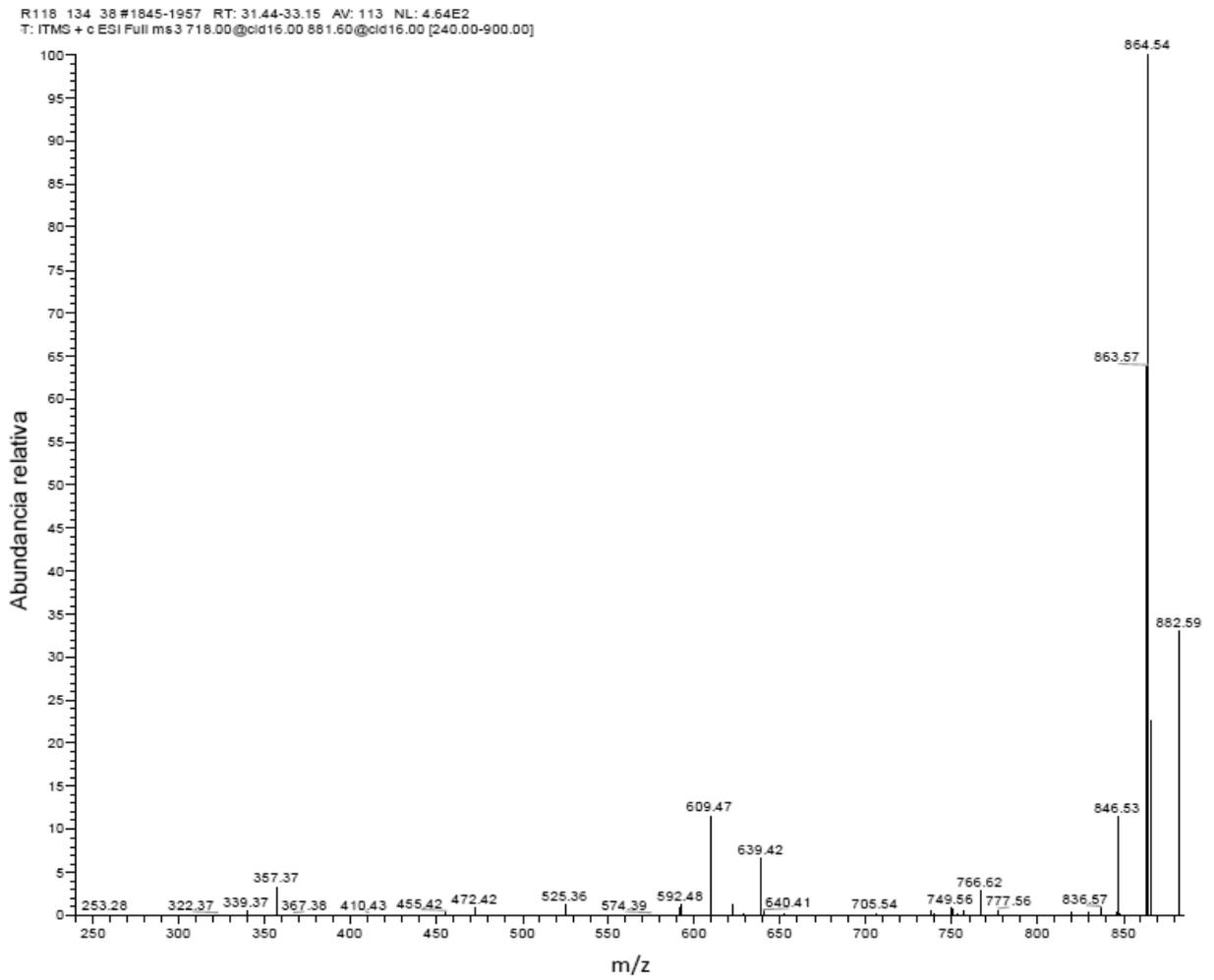


Figura 6B



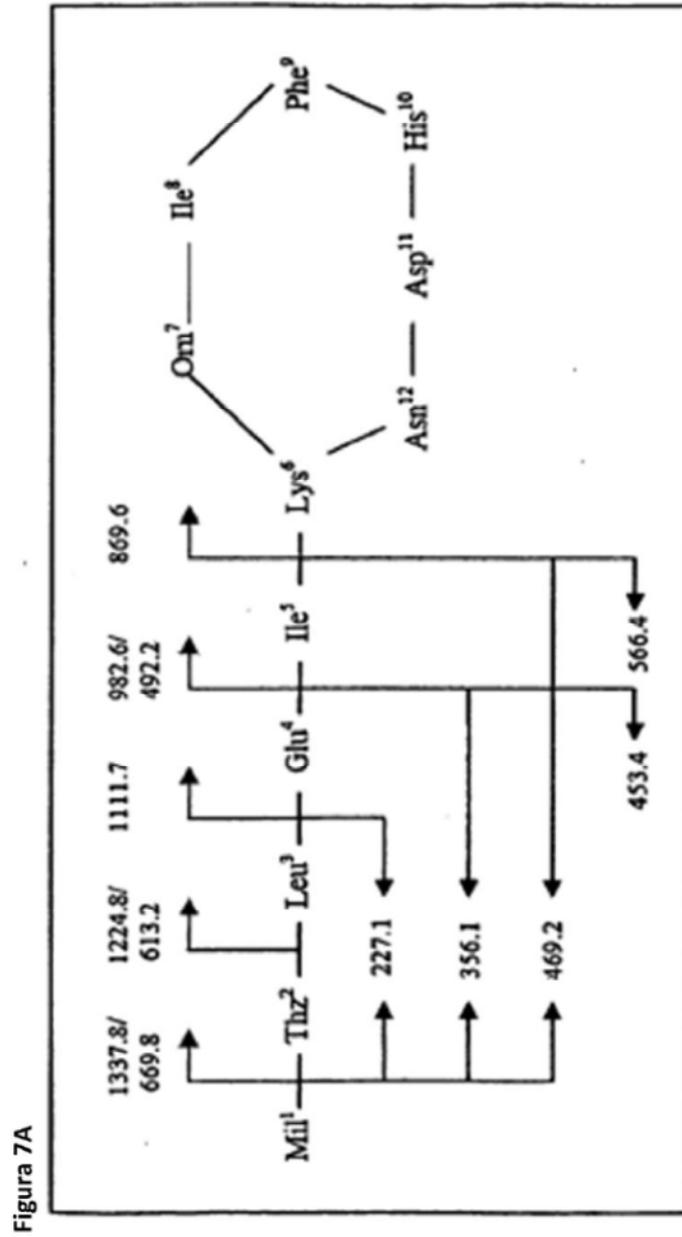


Figura 7B

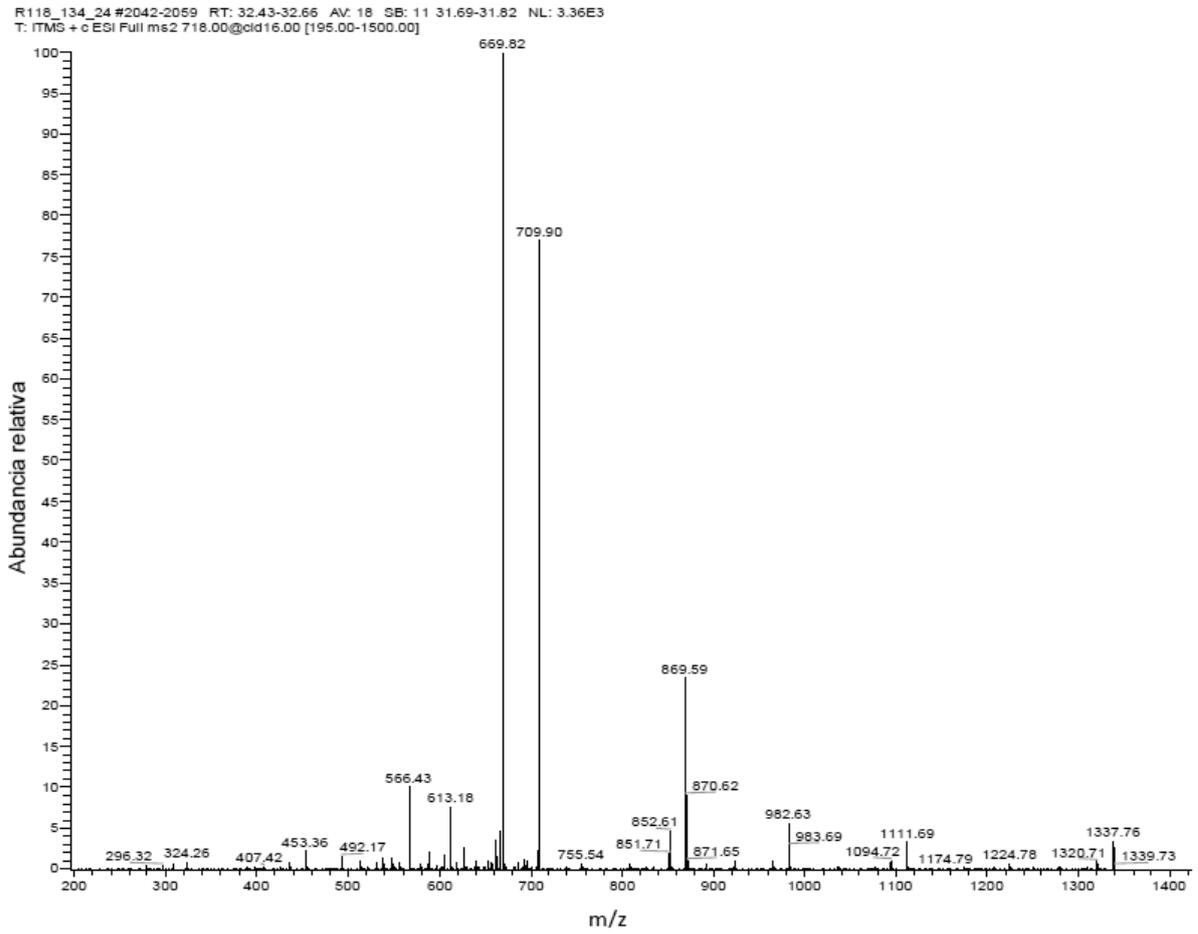


Figura 8A

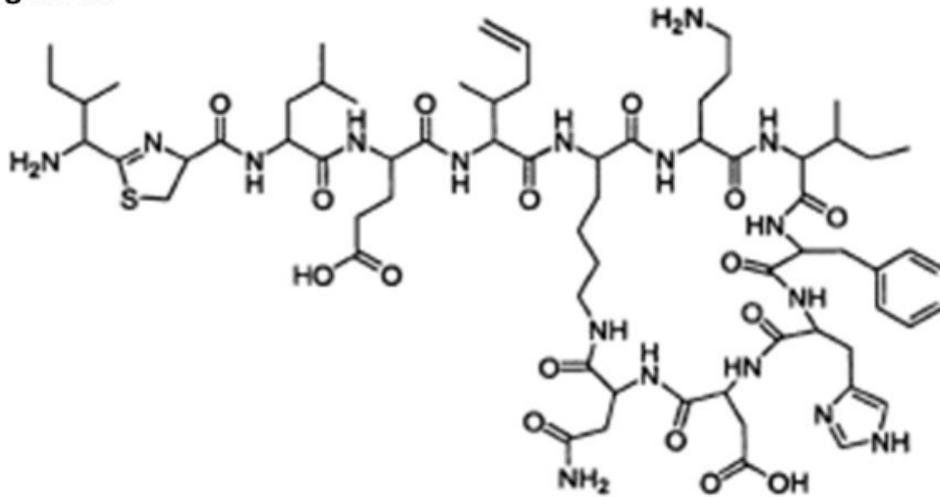


Figura 8B

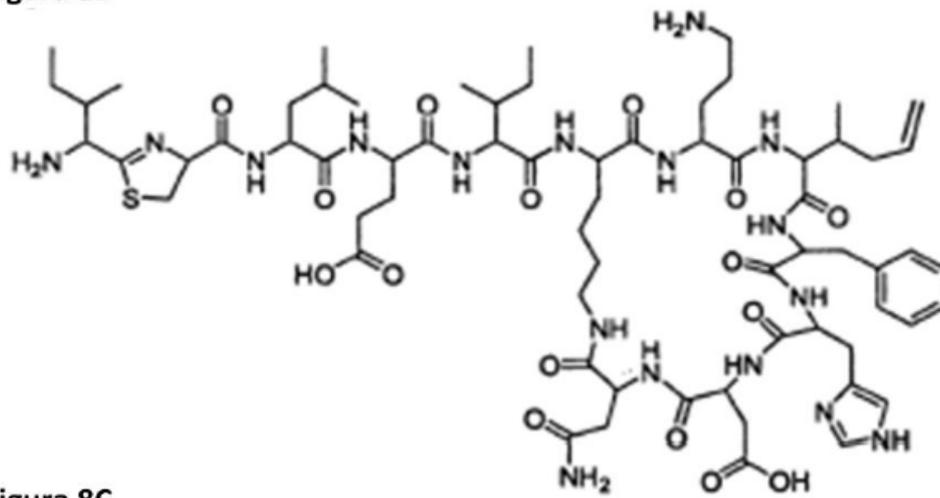


Figura 8C

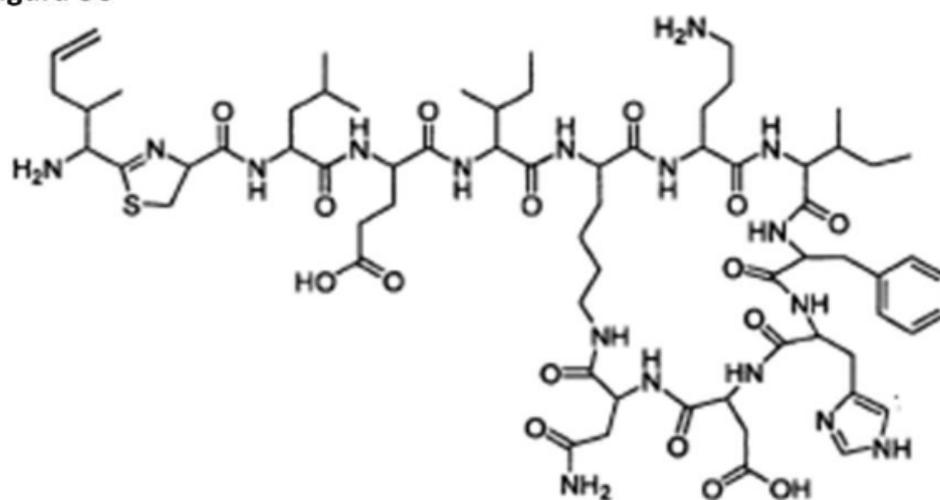


Figura 8D

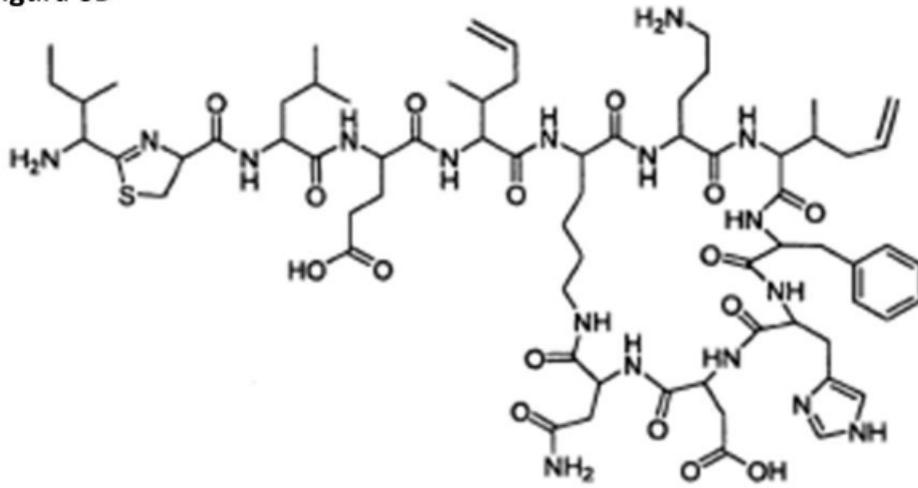


Figura 8E

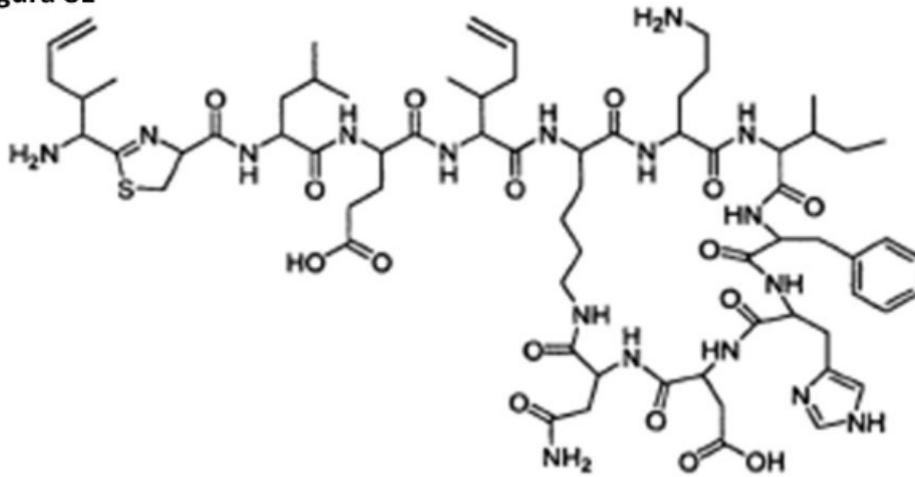


Figura 8F

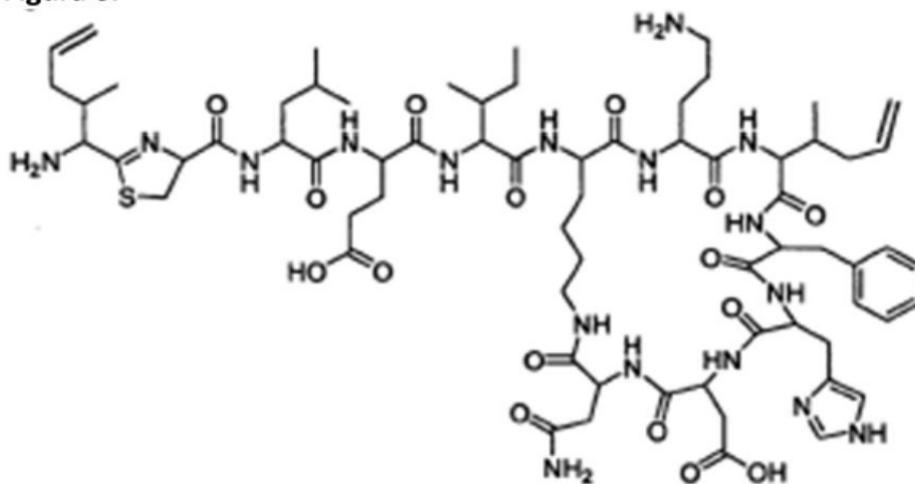


Figura 8G

