

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 930**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/EP2012/069166**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045600**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12778971 (7)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2760881**

54 Título: **Nuevos derivados de péptidos como antibióticos**

30 Prioridad:

28.09.2011 EP 11183034
28.09.2011 US 201161540085 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

73 Titular/es:

NOSOPHARM (50.0%)
110, allée Charles Babbage, Espace Innovation 2
30000 Nimes, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

GUALTIERI, MAXIME;
VILLAIN-GUILLOT, PHILIPPE;
GIVAUDAN, ALAIN y
PAGES, SYLVIE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkingen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 657 930 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 derivados de péptidos como antibióticos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos antibióticos y a composiciones que comprenden los mismos, a una cepa de *Xenorhabdus nematophila* que puede producir dichos compuestos antibióticos y a la utilización de dichos compuestos y composiciones de los mismos en el tratamiento de una enfermedad microbiana.

Antecedentes de la invención

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales problemas de salud pública con un efecto significativo sobre la morbilidad, la mortalidad y los costes asociados a la atención sanitaria. El problema se ha visto empeorado por la restricción aplicada a programas de descubrimiento y desarrollo de fármacos antibióticos. Actualmente, los patógenos bacterianos multirresistentes más relevantes son *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA), enterococos resistentes a la vancomicina (VRE), formadores de β -lactamasa de espectro extendido (ESBL), especies de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* multirresistentes. Para estas bacterias, solo son eficaces unos pocos de los antibióticos existentes. Existe la necesidad urgente de nuevos compuestos antibacterianos para asegurar que puedan tratarse eficazmente en el futuro infecciones bacterianas. Los organismos vivos han demostrado ser una fuente fiable de productos químicos bioactivos con actividad antimicrobiana (Berdy J., J. Antibiot. 58, 1-26 (2005)). Los microbios ambientales siguen siendo recursos prometedores para la identificación de nuevas moléculas.

Sumario de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones. En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



en la que

Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₈ y Xaa₁₀ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en lisina, 3-hidroxilisina, 4-hidroxilisina, 5-hidroxilisina, 3,4-dihidroxilisina, 3,5-dihidroxilisina, 4,5-dihidroxilisina, ornitina, 3-hidroxiornitina, 4-hidroxiornitina, 3,4-dihidroxiornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, arginina, histidina, serina y treonina;

Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina

Xaa₆ es prolina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, ácido aziridin-2-carboxílico, ácido azetidín-2-carboxílico, ácido pipercolico, 4-oxaprolina, 3-tiaprolina, 4-tiaprolina, 3,4-deshidroprolina, 4-aminoprolina, 4-fluoroprolina, α -metilprolina o α -alilprolina; Xaa₇ es histidina; Xaa₉ es arginina, 2,3-deshidroarginina, citrulina, 2,3-deshidrocitrulina, canavanina o 2,3-deshidrocanavanina;

n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

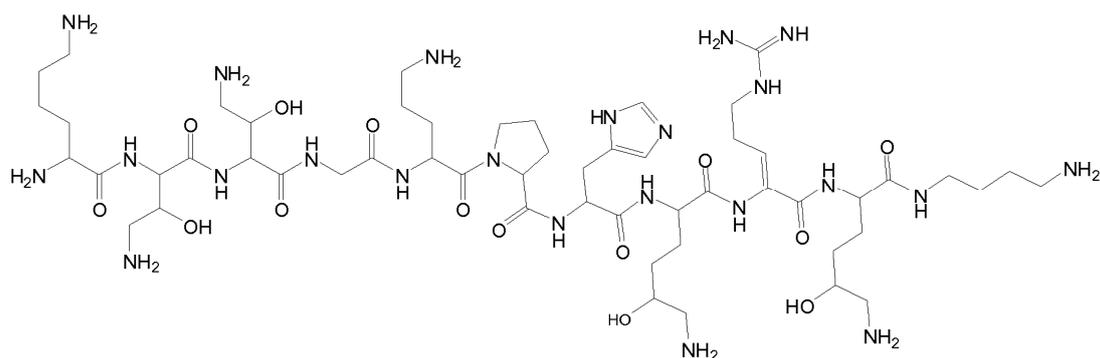
R es -OH, -NH₂ o -COOH.

En una forma de realización, Xaa₁ es lisina; Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico; Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina; Xaa₆ es prolina; Xaa₇ es histidina; y Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina.

En otra forma de realización, Xaa₁ es lisina; Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico; Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina; Xaa₆ es prolina; Xaa₇ es histidina; Xaa₈ es lisina o 5-hidroxilisina; Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina; y Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxilisina.

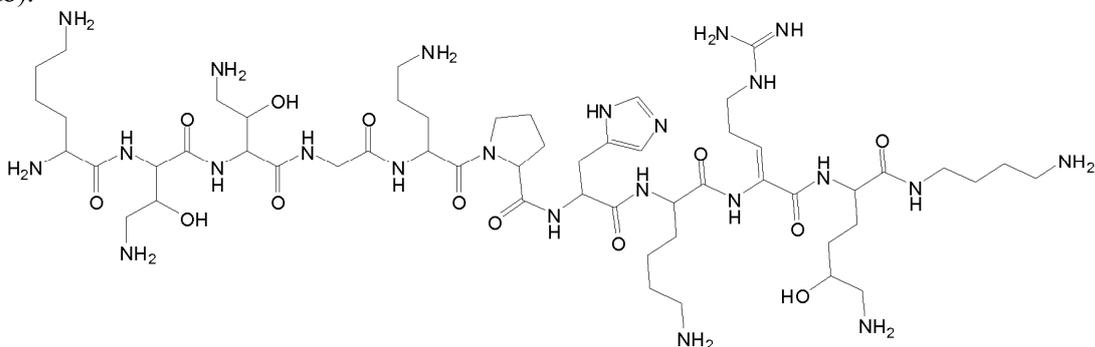
En otra forma de realización, Xaa₁ es lisina; Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico; Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina; Xaa₆ es prolina; Xaa₇ es histidina; Xaa₈ es lisina o 5-hidroxilisina; Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina; Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxilisina; n es 4 y R es NH₂.

En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (Ia):



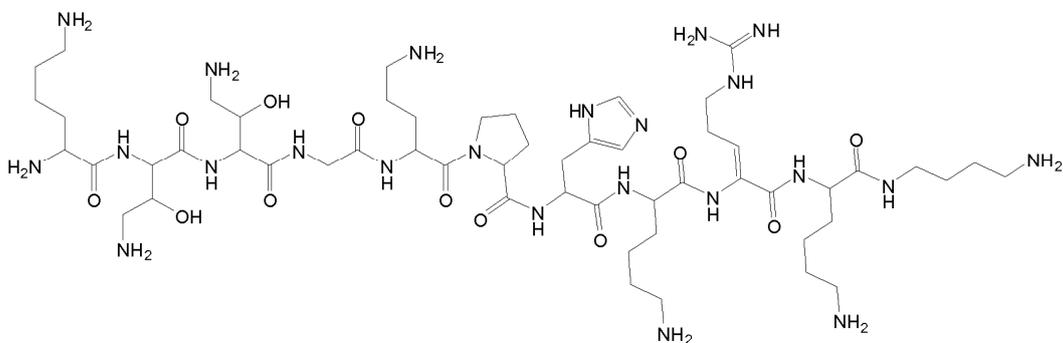
En otra forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (Ib):

(Ib):



5

En otra forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (Ic):



10

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto, no siendo el compuesto ni (Ia), ni (Ib), ni (Ic).

15

Preferentemente, los compuestos de la presente invención están aislados. Preferentemente, el compuesto tiene una pureza superior a aproximadamente el 90%. De forma más preferida, el compuesto tiene una pureza superior a aproximadamente el 95%. De forma incluso más preferida, el compuesto tiene una pureza superior a aproximadamente el 98%. De forma incluso más preferida, el compuesto tiene una pureza superior a aproximadamente el 99%.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto tal como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un segundo compuesto antibiótico. Preferentemente, el segundo compuesto antibiótico es un antibiótico aminoglucósido. Preferentemente, el segundo compuesto antibiótico es kanamicina. Preferentemente, el segundo compuesto antibiótico es gentamicina.

25

La presente invención se refiere también a un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un sujeto que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I):



en la que

5 Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₈ y Xaa₁₀ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en lisina, 3-hidroxislisina, 4-hidroxislisina, 5-hidroxislisina, 3,4-dihidroxislisina, 3,5-dihidroxislisina, 4,5-dihidroxislisina, ornitina, 3-hidroxiornitina, 4-hidroxiornitina, 3,4-dihidroxiornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, arginina, histidina, serina y treonina;

10 Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina;

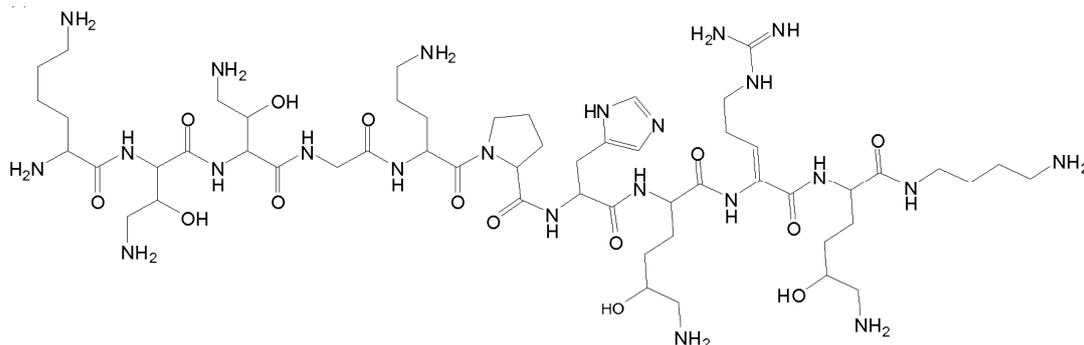
Xaa₆ es prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, ácido aziridin-2-carboxílico, ácido azetidin-2-carboxílico, ácido pipercolico, 4-oxaprolina, 3-tiaprolina, 4-tiaprolina, 3,4-deshidroprolina, 4-aminoprolina, 4-fluoroprolina, α-metilprolina o α-alilprolina; Xaa₇ es histidina;

15 Xaa₉ es arginina, 2,3-deshidroarginina, citrulina, 2,3-deshidrocitrulina, canavanina o 2,3-deshidrocanavanina; n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

20 R es -OH, -NH₂ o -COOH, o una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, a un sujeto con necesidad de ello.

En los procedimientos de la presente invención se prefiere que Xaa₁ sea lisina; Xaa₂ y Xaa₃ sean cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico; Xaa₄ sea glicina; Xaa₅ sea ornitina; Xaa₆ sea prolina; Xaa₇ sea histidina; Xaa₈ sea lisina o 5-hidroxislisina; Xaa₉ sea 2,3-deshidroarginina; Xaa₁₀ sea lisina o 5-hidroxislisina; n sea 4 y R sea NH₂.

25 En los procedimientos de la presente invención se prefiere que el compuesto de fórmula (I) sea:



30 (Ia).

Preferentemente, los procedimientos de la presente invención comprenden la administración de un segundo compuesto antibiótico. Preferentemente, el segundo compuesto antibiótico es un antibiótico aminoglucósido. Preferentemente, el segundo compuesto antibiótico es kanamicina. Preferentemente, el segundo compuesto antibiótico es gentamicina.

35 En los procedimientos de la presente invención, el sujeto es preferentemente un mamífero. Preferentemente, el sujeto es un ave, un porcino, un bovino o un ser humano. De la forma más preferida, el sujeto es un ser humano.

40 En los procedimientos de la presente invención, el compuesto o la composición es preferentemente eficaz contra bacterias clínicas resistentes a múltiples fármacos.

En los procedimientos de la presente invención, el compuesto o la composición se administra preferentemente por vía intravenosa, parenteral, oral y/o tópica.

45 Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para producir un compuesto de fórmula (I) que comprende las etapas siguientes:

- cultivar la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 en un medio de cultivo líquido; y
- 50 - purificar un compuesto según la fórmula (I):



en la que

Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₈ y Xaa₁₀ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en lisina, 3-hidroxislisina, 4-hidroxislisina, 5-hidroxislisina, 3,4-dihidroxislisina, 3,5-dihidroxislisina, 4,5-dihidroxislisina, ornitina, 3-hidroxiornitina, 4-hidroxiornitina, 3,4-dihidroxiornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, arginina, histidina, serina y treonina;

Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina;

Xaa₆ es prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, ácido aziridin-2-carboxílico, ácido azetidin-2-carboxílico, ácido piperídico, 4-oxaprolina, 3-tiaprolina, 4-tiaprolina, 3,4-deshidroprolina, 4-aminoprolina, 4-fluoroprolina, α-metilprolina o α-alilprolina; Xaa₇ es histidina;

Xaa₉ es arginina, 2,3-deshidroarginina, citrulina, 2,3-deshidrocitrulina, canavanina o 2,3-deshidrocanavanina;

n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

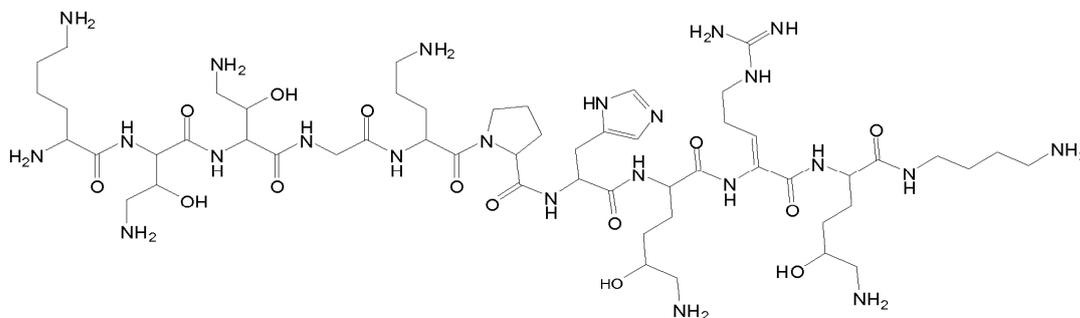
R es -OH, -NH₂ o -COOH.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un compuesto de fórmula (I) en la que Xaa₁ es lisina; Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico; Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina; Xaa₆ es prolina; Xaa₇ es histidina; y Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un compuesto de fórmula (I) en la que Xaa₁ es lisina; Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico; Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina; Xaa₆ es prolina; Xaa₇ es histidina; Xaa₈ es lisina o 5-hidroxislisina; Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina y Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxislisina.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un compuesto de fórmula (I) en la que Xaa₁ es lisina; Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico; Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina; Xaa₆ es prolina; Xaa₇ es histidina; Xaa₈ es lisina o 5-hidroxislisina; Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina y Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxislisina; n es 4 y R es NH₂.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un compuesto de fórmula (I), siendo el compuesto de fórmula (I)



(Ia).

En formas de realización preferidas, la etapa de purificación comprende cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía en fase inversa.

Otro objeto de la presente invención es una cepa de *Xenorhabdus nematophila* depositada en el CNCM el 21 de septiembre de 2011 que tiene el número de acceso CNCM 1-4530.

Otro objeto de la presente invención es un sobrenadante de cultivo de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 que tiene actividad antibiótica.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa el espectro de RMN TOCSY de Odilomicina A

La figura 2 representa el espectro de RMN HSQC de Odilomicina A

La figura 3 representa los efectos bactericidas de Odilomicina A sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC13709.

La figura 4 representa los efectos bactericidas de Odilomicina A sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC27853.

5 Descripción detallada de la invención

Definiciones y abreviaturas

Los términos y las expresiones "antibiótico", "actividad antibiótica", "antibacteriano", "actividad antibacteriana", "antimicrobiano" o "actividad antimicrobiana", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren, en general, a un efecto con el que se logra una reducción, una inhibición o una detención en el crecimiento de un microorganismo. La actividad antibiótica puede analizarse según cualquier procedimiento conocido tal como, por ejemplo, un procedimiento de microdilución.

El término "ODILOMICINA", "Odilomicina" u "odilomicina", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a un compuesto de fórmula (I). En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (Ia), de fórmula (Ib) y/o de fórmula (Ic). Se prevé que el término abarque todas las formas estereoisoméricas tales como, por ejemplo, tautómeros, diastereómeros (incluidos isómeros cis/trans) y enantiómeros.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de uno o más compuestos descritos en la presente memoria, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo o a un sujeto.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" se utiliza en la presente memoria para querer decir en torno a, más o menos, alrededor de o en la región de. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo ampliando los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" se utiliza en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido en una variación del 10 por ciento por encima y por debajo (más elevado o más reducido).

Una "cantidad eficaz", "cantidad suficiente" o "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente memoria, es una cantidad de un compuesto que es suficiente para ejercer un efecto beneficioso o terapéuticamente deseado, incluidos resultados clínicos, proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento deseado. Como tal, una cantidad eficaz puede ser suficiente, por ejemplo, para reducir o mejorar la gravedad y/o la duración de una infección bacteriana, afecciones relacionadas con la misma, o uno o más síntomas de la misma; prevenir el avance de trastornos o síntomas (incluida la prevención profiláctica) relacionados con afecciones relacionadas con una infección bacteriana, afecciones relacionadas con la misma, o uno o más síntomas de la misma; o potenciar o mejorar de otra forma el efecto o los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento. Una cantidad eficaz también incluye la cantidad del compuesto que previene o atenúa sustancialmente efectos secundarios no deseados.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, un coadyuvante o un excipiente con el que se administra un compuesto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todo tipo de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos no limitantes de dichos vehículos farmacéuticos incluyen líquidos, tales como agua y aceites, incluidos los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos también pueden ser soluciones salinas, goma arábica, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Pueden utilizarse también aditivos auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Alfonso Gennaro ed., Krieger Publishing Company (1997); Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a Ed. (Lippincot, Williams & Wilkins (2005); y Modern Pharmaceutics, vol. 121 (Gilbert Banker y Christopher Rhodes, CRC Press (2002).

Abreviaturas: ATCC (*American Type Culture Collection*), CNCM (*Collection Nationale de Cultures de Microorganismes*), INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*), MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), VRE (enterococos resistentes a vancomicina), ESBL (formadores de β -lactamasa de espectro extendido), NMR (resonancia magnética nuclear), EM-EM (espectroscopia de masas-espectroscopia de masas), CL-EM (cromatografía líquida-espectroscopia de masas), ESI (ionización por electropulverización), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), LB (medio de Luria-Bertani), NBTA (agar nutriente (Difco), 31 g/l, bromotimol azul, 25 mg/l, y cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio al 1%, 40 mg/l), TFA (ácido trifluoroacético), UV (ultravioleta), MIC (concentración inhibidora mínima), MHB (caldo de Mueller-Hinton), MBC (concentración bactericida mínima)

Descripción

En un aspecto, la presente invención se refiere a la cepa de *Xenorhabdus nematophila* 108 depositada en la CNCM (*Collection Nationale de Cultures de Microorganismes*) en nombre del INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*) el 21 de septiembre de 2011 que tiene el número de acceso CNCM 1-4530.

Se ha descubierto que la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 produce compuestos que muestran actividad antibiótica o antimicrobiana. Cuando la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 se cultiva en un medio de cultivo líquido, se segregan compuestos antibióticos en el sobrenadante del cultivo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un sobrenadante de cultivo de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 que muestra actividad antibiótica o antibacteriana. Para la preparación de un sobrenadante de cultivo que tenga actividad antibiótica se cultiva la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 en un medio de cultivo líquido en condiciones estándar, las células bacterianas se eliminan y el sobrenadante se recupera. Las células bacterianas pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o por filtración.

En otro aspecto más, la invención se refiere a extractos de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 que muestran actividad antibiótica. Los extractos celulares de *Xenorhabdus nematophila* pueden prepararse según cualquier procedimiento apropiado conocido por el experto en la materia.

En algunas formas de realización, la presente invención comprende asimismo sobrenadante de cultivo y extractos de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 para su utilización como medicamento.

En algunas formas de realización, la presente invención comprende procedimientos de tratamiento, supresión y/o prevención de la infección bacteriana que comprenden la administración de extractos de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530.

En algunas formas de realización, la presente invención comprende asimismo el sobrenadante de cultivo y extractos de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 para su utilización como agente antibiótico.

La cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530, el sobrenadante de cultivo de esta cepa y los extractos celulares derivados de esta cepa muestran actividad antibiótica frente a diferentes microorganismos que incluyen, por ejemplo, patógenos bacterianos humanos.

Más en particular, la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530, el sobrenadante de cultivo de esta cepa y los extractos celulares derivados de esta cepa muestran actividad antibiótica frente a *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. Preferentemente, la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530, el sobrenadante de cultivo de esta cepa y los extractos celulares derivados de esta cepa muestran actividad antibiótica frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Los compuestos ejemplificativos que tienen actividad antibiótica tal como se describen en la presente memoria se han purificado a partir del sobrenadante de cultivo de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



en la que

Xaa_1 , Xaa_2 , Xaa_3 , Xaa_8 y Xaa_{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en lisina, 3-hidroxislisina, 4-hidroxislisina, 5-hidroxislisina, 3,4-dihidroxislisina, 3,5-dihidroxislisina, 4,5-dihidroxislisina, ornitina, 3-hidroxiornitina, 4-hidroxiornitina, 3,4-dihidroxiornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, arginina, histidina, serina y treonina;

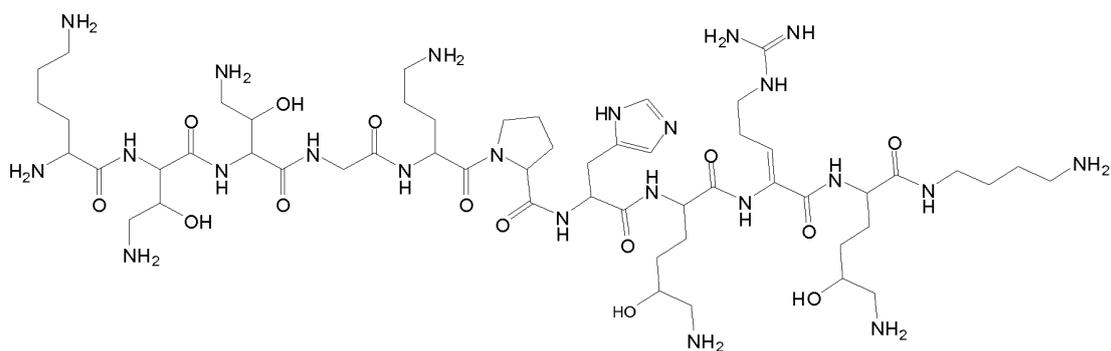
Xaa_4 es glicina; Xaa_5 es ornitina;

Xaa_6 es prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, ácido aziridin-2-carboxílico, ácido azetidín-2-carboxílico, ácido pipercolico, 4-oxaprolina, 3-tiaprolina, 4-tiaprolina, 3,4-deshidroprolina, 4-aminoprolina, 4-fluoroprolina, α -metilprolina o α -alilprolina; Xaa_9 es arginina, 2,3-deshidroarginina, citrulina, 2,3-deshidrocitrulina, canavanina o 2,3-deshidrocanavanina;

Xaa₇ es histidina; n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

R es -OH, -NH₂ o -COOH.

- 5 En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina, Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, Xaa₄ es glicina, Xaa₅ es ornitina, Xaa₆ es prolina, Xaa₇ es histidina y Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina.
- 10 En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina.
- 10 En algunas formas de realización, Xaa₂ es ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico.
- En algunas formas de realización, Xaa₃ es ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico.
- 15 En algunas formas de realización, Xaa₄ es glicina.
- En algunas formas de realización, Xaa₅ es ornitina.
- En algunas formas de realización, Xaa₆ es prolina.
- 20 En algunas formas de realización, Xaa₇ es histidina.
- En algunas formas de realización, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxilisina.
- 25 En algunas formas de realización, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina.
- En algunas formas de realización, Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxilisina.
- En algunas formas de realización, n = 4.
- 30 En algunas formas de realización, R es -NH₂.
- En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina, Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, Xaa₄ es glicina, Xaa₅ es ornitina, Xaa₆ es prolina, Xaa₇ es histidina, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxilisina, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina y Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxilisina.
- 35 En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina, Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, Xaa₄ es glicina, Xaa₅ es ornitina, Xaa₆ es prolina, Xaa₇ es histidina, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxilisina, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina, Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxilisina, n es 4 y R es NH₂.
- 40 La configuración de los átomos de carbono α en los residuos de aminoácidos puede ser "D" o "L", y puede ser independiente de las configuraciones de otros residuos de aminoácidos presentes en los compuestos de fórmula (I). Así, en algunas formas de realización, Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ y Xaa₁₀ tienen cada uno la configuración "L" en el carbono α del residuo de aminoácido. En algunas formas de realización, uno o más
- 45 de Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ y Xaa₁₀ tienen la configuración "D" en el carbono α del residuo de aminoácido.
- La configuración de los grupos hidroxilo en las cadenas laterales de los aminoácidos puede ser "R" o "S", y puede ser independiente de las configuraciones de otros grupos hidroxilo presentes en los compuestos de fórmula (I). Así, en algunas formas de realización, uno o más grupos hidroxilo tienen la configuración "R". En algunas formas de realización, uno o más grupos hidroxilo tienen la configuración "S". En algunas formas de realización, cada uno de los grupos hidroxilo tiene la configuración "R". En algunas formas de realización, cada uno de los grupos hidroxilo tiene la configuración "S".
- 50 En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ia):
- 55 En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ia):

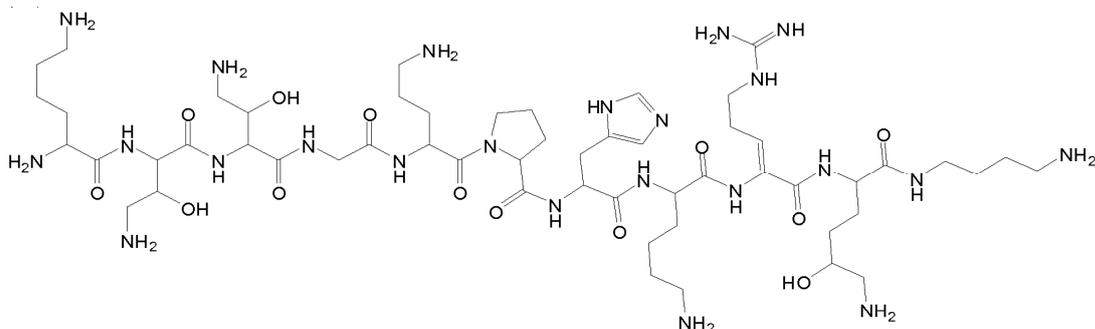


(1a).

5 El compuesto de fórmula (1a) se define también como Lys - (ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico) - (ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico) - Gly - ornitina - Pro - His - (5-hidroxisilina) - (2,3-deshidroarginina) - (5-hidroxisilina) - (1,4-diaminobutano).

La expresión "odilomicina A" se refiere al compuesto de fórmula (1a).

10 En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (1b):

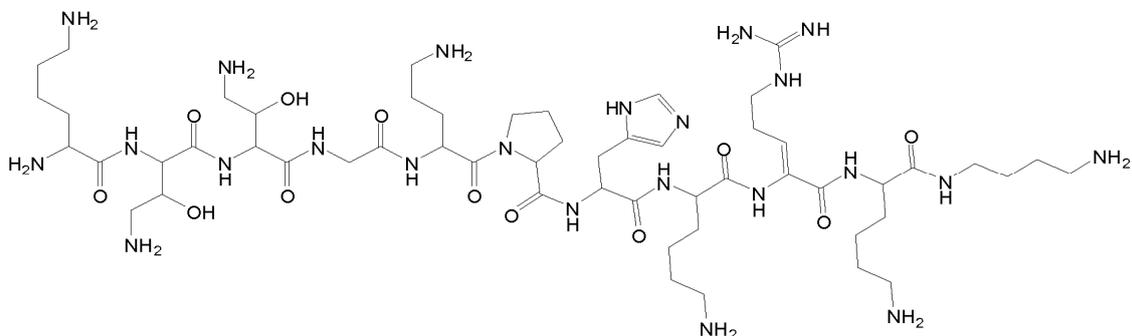


(1b).

15 El compuesto de fórmula (1a) se define también como Lys - (ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico) - (ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico) - Gly - ornitina - Pro - His - Lys - (2,3-deshidroarginina) - (5-hidroxisilina) - (1,4-diaminobutano).

La expresión "odilomicina B" se refiere al compuesto de fórmula (1b).

20 En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (1c):



(1c).

25 El compuesto de fórmula (1c) se define también como Lys - (ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico) - (ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico) - Gly - ornitina - Pro - His - Lys - (2,3-deshidroarginina) - Lys - (1,4-diaminobutano).

La expresión "odilomicina C" se refiere al compuesto de fórmula (1c).

30 En algunas formas de realización, las odilomicinas no incluyen los compuestos de fórmulas (1a), (1b) y (1c).

En algunas formas de realización, las odilomicinas están aisladas.

5 En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 50%. En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 60%. En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 70%. En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 80%. En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 85%. En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 90%. En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 95%. En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 98%. En algunas formas de realización, las odilomicinas tienen una pureza superior a aproximadamente el 99%. En algunas formas de realización, cualesquiera valores de pureza establecidos pueden constituir un valor extremo inferior y/o superior de un intervalo de pureza cuando proceda o en las mismas cualquiera de los límites inferiores puede combinarse con cualquiera de los límites superiores.

20 En algunas formas de realización, las odilomicinas y/o las composiciones que comprenden las mismas son útiles como medicamento, como antibiótico, como antimicrobiano o en el tratamiento de enfermedades microbianas, en particular de una infección bacteriana provocada, por ejemplo, por bacterias patógenas.

En algunas formas de realización, las odilomicinas y/o las composiciones que comprenden las mismas son útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas, por ejemplo en el tratamiento de una infección intrahospitalaria o una infección bacteriana nosocomial.

25 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una infección bacteriana intrahospitalaria que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).

30 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una infección bacteriana nosocomial que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).

35 En un aspecto, la invención se refiere también a la utilización de compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratar una infección microbiana o una enfermedad microbiana.

En otro aspecto, la invención se refiere también a la utilización de compuestos de fórmula (I) para la fabricación de una composición antibiótica.

40 En otro aspecto más, la presente invención se refiere también a procedimientos de tratamiento que comprenden la administración de un compuesto de fórmula (I), o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I), a un sujeto con necesidad de ello. Las odilomicinas y/o las composiciones que comprenden las mismas pueden ser útiles, por ejemplo, en el tratamiento, la supresión y/o la prevención de una infección y/o enfermedad bacteriana.

45 En algunas formas de realización, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento, prevención y/o supresión de una infección bacteriana que comprende la administración a un sujeto con necesidad de ello de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una composición que comprende un compuesto de fórmula (I).

50 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una infección bacteriana que comprende administrar a dicho sujeto un compuesto de fórmula (I).

55 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para suprimir una infección bacteriana en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto de fórmula (I).

En algunas formas de realización más, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una infección bacteriana resistente a múltiples fármacos que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).

60 En algunas formas de realización, los procedimientos de la presente invención proporcionan la inhibición de bacterias que son resistentes a otros fármacos o antibióticos, o la infección relacionada con las mismas. En algunas formas de realización, los procedimientos proporcionan el tratamiento, la supresión y/o la prevención de la infección por bacterias resistentes a múltiples fármacos.

65 En algunas formas de realización, la infección bacteriana es resistente a múltiples fármacos. En algunas formas de realización, la cepa bacteriana es intrahospitalaria. En algunas formas de realización, la cepa bacteriana es

nosocomial.

En algunas formas de realización, la infección bacteriana comprende la infección por bacterias Gram-negativas.
En algunas formas de realización, la infección bacteriana comprende la infección por bacterias Gram-positivas.

5 En algunas formas de realización, la infección bacteriana comprende la infección por más de una cepa bacteriana.

10 En algunas formas de realización, la infección bacteriana o microbiana es una infección provocada en su totalidad o en parte por bacterias de las familias *Achromobacter*, *Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Anaplasma*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bdellovibrio*, *Bifidobacterium*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Hemobartonella*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Morganella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*,
15 *Neisseria*, *Neorickettsia*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Peptostreptococcus*, *Photorhabdus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Sphaerophorus*, *Spirillum*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptobacillus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Tropheryma*, *Ureaplasma*, *Vibrio* o *Yersinia*.

20 En algunas formas de realización, la infección bacteriana o microbiana es una infección provocada en su totalidad o en parte por *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marescens* o *Pseudomonas aeruginosa*. Preferentemente, la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530, el sobrenadante de cultivo de esta cepa y los extractos
25 celulares de esta cepa muestran actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginos* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

30 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona la utilización de composiciones farmacéuticas y/o medicamentos comprendidos por los compuestos de fórmula (I) en un procedimiento de tratamiento de una infección bacteriana y/o estado patológico y/o trastorno provocado por dicha infección bacteriana o relacionado con la misma.

35 En algunas formas de realización, los procedimientos comprenden la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) solo o en combinación con un segundo compuesto antibiótico, o una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) solo o en combinación con un segundo compuesto antibiótico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, coadyuvantes, diluyentes, excipientes, materiales de carga y lubricantes. A menudo, el vehículo farmacéuticamente aceptable es químicamente inerte
40 frente a compuestos activos y no es tóxico en las condiciones de utilización. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, agua o solución salina, polímeros tales como polietilenglicol, carbohidratos y derivados de los mismos, aceites, ácidos grasos o alcoholes.

45 En algunas formas de realización, el procedimiento de tratamiento, prevención y/o supresión de un trastorno relacionado con una infección bacteriana comprende las etapas de: (i) identificar un sujeto con necesidad de dicho tratamiento; (ii) proporcionar un compuesto de fórmula (I) solo o en combinación con un segundo compuesto antibiótico, o una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) solo o en combinación con un segundo compuesto antibiótico y un vehículo farmacéuticamente aceptable y (iii) administrar dicho compuesto o dichos compuestos o dicha composición en una cantidad terapéuticamente aceptable para tratar,
50 prevenir y/o suprimir una infección bacteriana en un sujeto con necesidad de dicho tratamiento.

55 En algunas formas de realización, los procedimientos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I); o una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 En algunas formas de realización, el procedimiento de tratamiento, prevención y/o supresión de un trastorno relacionado con una infección bacteriana comprende las etapas de: (i) identificar un sujeto con necesidad de dicho tratamiento; (ii) proporcionar un compuesto de fórmula (I) o una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable y (iii) administrar dicho compuesto o dicha composición en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar, prevenir y/o suprimir el estado patológico o trastorno relacionado con una infección bacteriana en un sujeto con necesidad de dicho tratamiento.

65 En algunas formas de realización, tratamiento se refiere, en general, a tratamiento y terapia, tanto de un ser humano como de un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), con el que se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso del trastorno. El tratamiento también puede incluir, pero de manera no limitativa, una reducción en la velocidad de la progresión, una detención en la velocidad de la

- progresión, una mejora del trastorno, la cura del trastorno, un estado estabilizado (es decir, no empeorado) de la enfermedad o afección, prevenir la expansión de la enfermedad o afección, el retardo o la ralentización de la progresión de la enfermedad o afección, una mejora o la paliación del estado patológico o de la afección y la remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. En algunas formas de realización, tratamiento también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. En algunas formas de realización, también está incluido un tratamiento como una medida profiláctica (es decir, la prevención). Por ejemplo, la utilización con sujetos que no han desarrollado aún el trastorno, pero que están en riesgo de desarrollar el trastorno, está comprendida por el término "tratamiento".
- 5 En algunas formas de realización, el tratamiento comprende los tratamientos de combinación y politerapias, en los que dos o más tratamientos o terapias se combinan, por ejemplo secuencialmente o simultáneamente. Por ejemplo, los agentes activos de la presente invención también pueden utilizarse en otras politerapias, por ejemplo junto con otros agentes, por ejemplo, otros antimicrobianos u otros antibióticos, etc.
- 10 Los sujetos se encuentran en sistemas *in vitro* e *in vivo*, incluidos, por ejemplo, células o tejidos aislados o cultivados, sistemas de ensayo *in vitro* no celulares y animales (por ejemplo, un anfibio, un ave, un pez, un mamífero, un marsupial, un ser humano, un animal doméstico tal como, por ejemplo, un gato, un perro, un mono, un ratón o una rata; o un animal útil tal como, por ejemplo, un caballo, un bovino (tal como una vaca), un pavo, un pollo o un cerdo).
- 15 En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero. En algunas formas de realización, el sujeto es un ave, un porcino, un bovino o un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un ave. En algunas formas de realización, el sujeto es un porcino o un cerdo. En algunas formas de realización, el sujeto es un pavo o un pollo.
- 20 Además, las composiciones o los procedimientos pueden comprender adicionalmente uno o más compuestos antibacterianos o antibióticos adicionales en combinación con un compuesto de fórmula (I) solo. Los ejemplos de dichos compuestos incluyen, pero sin limitación, daptomicina, oxacilina, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulánico, amoxicilina/ácido clavulánico, eritromicina, cefepim, clindamicina, imipenem, gentamicina, ciprofloxacina, aztreonam, vancomicina, linezolid, rifampicina, kanamicina, ampicilina, tetraciclina y similares.
- 25 En algunas formas de realización, el antibiótico adicional (o segundo antibiótico) es un antibiótico aminoglucósido. Los antibióticos aminoglucósidos son compuestos antibióticos en los que una porción de una molécula contiene un azúcar modificado con amino. Los ejemplos de antibióticos aminoglucósidos incluyen, pero sin limitación, amikacina, apramicina, arbekacina, astromicina, bekanamicina, capreomicina, dibekacina, dihidrostreptomina, elsamitrucina, G418, gentamicina, higromicina B, isepamicina, kanamicina, kasugamicina, micronomicina, neomicina, netilmicina, sulfato de paromomicina, ribostamicina, sisomicina, estreptoducina, estreptomina, tobramicina y verdamicina.
- 30 Así, en algunas formas de realización los procedimientos y/o las composiciones comprenden además uno o más compuestos antibacterianos adicionales en combinación con un compuesto de fórmula (I). En algunas formas de realización, el compuesto antibacteriano adicional se selecciona del grupo que consiste en daptomicina, oxacilina, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulánico, amoxicilina/ácido clavulánico, eritromicina, cefepim, clindamicina, imipenem, gentamicina, ciprofloxacina, aztreonam, vancomicina, linezolid, rifampicina, kanamicina, ampicilina y tetraciclina. En algunas formas de realización, el antibacteriano adicional es kanamicina. En algunas formas de realización, el antibiótico adicional es un antibiótico aminoglucósido.
- 35 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar, suprimir y/o prevenir una infección bacteriana mediante la utilización combinada del compuesto de fórmula (I) y un segundo compuesto antibiótico en sujetos en los que la utilización del compuesto de fórmula (I) o del segundo compuesto antibiótico solos no proporciona el efecto terapéutico deseado. Sorprendentemente, se ha descubierto que cuando se utilizan otros compuestos antibióticos junto con un compuesto de fórmula (I), se observan aumentos estadísticamente significativos en los efectos antibióticos. En algunas formas de realización, existe un efecto sinérgico entre un segundo compuesto antibiótico, tal como la kanamicina, y el compuesto de fórmula (I). Así, en algunas formas de realización, la kanamicina y el compuesto de fórmula (I) se administran en cantidades que muestran una reducción sinérgica de niveles bacterianos. En algunas formas de realización, la kanamicina y el compuesto de fórmula (I) se administran en cantidades que muestran tratamiento sinérgico, supresión sinérgica y/o prevención sinérgica de una infección bacteriana.
- 40 En otro aspecto, la presente invención es una formulación farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I). En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina.
- 45 En algunas formas de realización, Xaa₂ es ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico.
- 50 En algunas formas de realización, Xaa₃ es ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico.
- 55
- 60
- 65

- En algunas formas de realización, Xaa₄ es glicina.
- En algunas formas de realización, Xaa₄ es ornitina.
- 5 En algunas formas de realización, Xaa₆ es prolina.
- En algunas formas de realización, Xaa₇ es histidina.
- En algunas formas de realización, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxisilisina.
- 10 En algunas formas de realización, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina.
- En algunas formas de realización, Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxisilisina.
- 15 En algunas formas de realización, n = 4.
- En algunas formas de realización, R is -NH₂.
- En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina; Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico; Xaa₄ es glicina; Xaa₅ es ornitina; Xaa₆ es prolina; Xaa₇ es histidina y Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina.
- 20 En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina, Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, Xaa₄ es glicina, Xaa₅ es ornitina, Xaa₆ es prolina, Xaa₇ es histidina, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxisilisina, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina y Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxisilisina.
- 25 En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina, Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, Xaa₄ es glicina, Xaa₅ es ornitina, Xaa₆ es prolina, Xaa₇ es histidina, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxisilisina, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina, Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxisilisina, n es 4 y R es NH₂.
- 30 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona la utilización de composiciones farmacéuticas y/o medicamentos comprendidos por un compuesto de fórmula (I) en un procedimiento de tratamiento, supresión y/o prevención de un estado patológico y/o trastorno provocado por una infección bacteriana o relacionado con la misma.
- 35 En algunas formas de realización, el procedimiento de tratamiento comprende las etapas de: (i) identificar un sujeto con necesidad de dicho tratamiento; (ii) proporcionar un compuesto de fórmula (I) y (iii) administrar dicho compuesto de fórmula (I) en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar, suprimir y/o prevenir el estado patológico o el trastorno en un sujeto con necesidad de dicho tratamiento.
- 40 En algunas formas de realización, el procedimiento de tratamiento comprende las etapas de: (i) identificar un sujeto con necesidad de dicho tratamiento; (ii) proporcionar una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y (iii) administrar dicha composición en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar, suprimir y/o prevenir el estado patológico o trastorno en un sujeto con necesidad de dicho tratamiento.
- 45 En algunas formas de realización, las odilomicinas se formulan en composiciones farmacéuticas para la administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*. Según otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) en mezcla con un diluyente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable es "aceptable" en el sentido de que es compatible con los otros ingredientes de la composición y no perjudicial para el receptor del mismo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables utilizados en la presente memoria pueden seleccionarse de entre diversos materiales orgánicos o inorgánicos que se utilizan como materiales para formulaciones farmacéuticas y que se incorporan como agentes analgésicos, tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, emulsionantes, excipientes, agentes de dilución, deslizantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes suspensores, agentes de tonicidad, vehículos y agentes que aumentan la viscosidad. También pueden añadirse aditivos farmacéuticos, tales como antioxidantes, compuestos aromáticos, colorantes, agentes mejoradores del sabor, conservantes y edulcorantes. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen carboximetilcelulosa, celulosa cristalina, glicerina, goma arábiga, lactosa, estearato de magnesio, metilcelulosa, polvos, solución salina, alginato de sodio, sacarosa, almidón, talco y agua,
- 50 entre otros. En algunas formas de realización, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su utilización en animales y, más en particular, en seres humanos.
- 55 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento que comprende las etapas de: (i) identificar un sujeto con necesidad de dicho tratamiento; (ii) proporcionar una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y (iii) administrar dicha composición en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar, suprimir y/o prevenir el estado patológico o trastorno en un sujeto con necesidad de dicho tratamiento.
- 60 Los tensioactivos tales como, por ejemplo, los detergentes, también son adecuados para su utilización en las formulaciones.
- 65

- 5 Cuando se administran a un sujeto, el compuesto de la presente invención y los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser estériles. Los vehículos farmacéuticamente adecuados también pueden incluir excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerina, propileno, glicol, polietilenglicol 300, agua, etanol, polisorbato 20 y similares. Las presentes composiciones, si se desea, pueden contener también cantidades secundarias de agentes humectantes o emulsionantes o de agentes reguladores del pH.
- 10 Las composiciones o formulaciones farmacéuticas de la presente invención se preparan mediante procedimientos bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) se asocian con un vehículo y/o diluyente, formando una suspensión o una solución. Opcionalmente, también se añaden uno o más ingredientes accesorios (por ejemplo, tampones, saborizantes, tensioactivos y similares). La elección del vehículo se determina mediante la solubilidad y la naturaleza química de los compuestos, la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar.
- 15 Adicionalmente, las odilomicinas o las composiciones que comprenden las mismas se administran a un sujeto mediante procedimientos conocidos que incluyen, sin limitación, administración oral, administración sublingual o bucal, administración parenteral, administración tópica, administración transdérmica, administración mediante inhalación o por vía intranasal, vaginal, rectal e intramuscular. Los compuestos o las composiciones se administran por vía parenteral, mediante inyección epifascial, intracapsular, intracranial, intracutánea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosa, subcutánea o sublingual, o por medio de un catéter.
- 20 En algunas formas de realización, el compuesto y/o la composición se administran por vía oral. En algunas formas de realización, el compuesto y/o la composición se administran por vía subcutánea. En algunas formas de realización, el compuesto y/o la composición se administran por vía intravenosa. En algunas formas de realización, el compuesto y/o la composición se administran por vía intramuscular. En algunas formas de realización, el compuesto y/o la composición se administran por vía tópica. En algunas formas de realización, el compuesto y/o la composición se administran por vía parenteral.
- 25 En algunas formas de realización, la composición se encuentra en forma de una dosis unitaria tal como un comprimido, una cápsula o un vial monodosis. Las dosis unitarias adecuadas, es decir, las cantidades terapéuticamente eficaces, pueden administrarse durante ensayos clínicos diseñados apropiadamente para cada uno de los trastornos para los que está indicada la administración de un compuesto elegido y variarán, evidentemente, en función del punto de finalización clínico deseado.
- 30 En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas para administración oral comprenden una odilomicina junto con los excipientes habituales tales como diluyentes tales como manitol, lactosa y sorbitol; aglutinantes tales como almidones, azúcares, derivados de celulosa, gomas naturales y polivinilpirrolidona; lubricantes tales como talco, estearatos, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol y dióxido de silicio coloidal; disgregantes tales como almidones, celulosas, alginatos, gomas y polímeros reticulados y otros colorantes, saborizantes y edulcorantes.
- 35 En algunas formas de realización, las composiciones comprenden una odilomicina con vehículos o excipientes adecuados para su administración tópica. En la presente invención puede utilizarse cualquier preparación de administración tópica, por ejemplo ungüentos, pomadas, cremas, geles y lociones. Las composiciones ejemplificativas para administración tópica según la invención incluyen ungüentos, pomadas, cremas, geles y lociones.
- 40 Las dosis de una odilomicina dependerán del efecto deseado, la duración del tratamiento y la vía de administración utilizada.
- 45 En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas según la presente invención son para su utilización como antimicrobiano, para su utilización como antibióticos o para su utilización en el tratamiento de una enfermedad microbiana, en particular de una enfermedad microbiana provocada por bacterias.
- 50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son preferentemente para su utilización en el tratamiento de una infección bacteriana y en particular para su utilización en el tratamiento de infecciones intrahospitalarias o infecciones bacterianas nosocomiales.
- 55 Las odilomicinas pueden combinarse con otros compuestos activos que muestren una actividad antimicrobiana/antibiótica. Las composiciones farmacéuticas comprendidas por la presente invención también pueden comprender un agente terapéutico adicional para el tratamiento de una enfermedad bacteriana o una infección bacteriana.
- 60
- 65

En algunas formas de realización, los procedimientos comprenden la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de una odilomicina. La dosis administrada puede variar en función de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del principio activo y su modo y vía de administración; el tiempo de administración del principio activo; la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor; la naturaleza y la magnitud de los síntomas; el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado; y la velocidad de excreción. Todas ellas se pueden determinar fácilmente y pueden utilizarse por parte del experto para ajustar o valorar dosis y/o regímenes de dosificación. La dosis precisa que se va a utilizar en las composiciones también dependerá de la vía de administración y deberá decidirse según el juicio del facultativo y teniendo en cuenta cada una de las circunstancias que rodean al paciente.

Cualquiera de los compuestos y/o las composiciones puede proporcionarse en un kit que comprende los compuestos y/o las composiciones. Así, en algunas formas de realización, el compuesto y/o la composición se proporciona en un kit.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para producir un compuesto de fórmula (I) que comprende las etapas siguientes:

- a) cultivar la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 en un medio de cultivo líquido; y
- b) purificar un compuesto de fórmula (I).

En algunas formas de realización del compuesto de fórmula (I), Xaa₁ es lisina. En algunas formas de realización, Xaa₂ es ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico. En algunas formas de realización, Xaa₃ es ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico. En algunas formas de realización, Xaa₄ es glicina. En algunas formas de realización, Xaa₅ es ornitina. En algunas formas de realización, Xaa₆ es prolina. En algunas formas de realización, Xaa₇ es histidina. En algunas formas de realización, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxislisina. En algunas formas de realización, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina. En algunas formas de realización, Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxislisina. En algunas formas de realización, n = 4. En algunas formas de realización, R es -NH₂.

En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina, Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, Xaa₄ es glicina, Xaa₅ es ornitina, Xaa₆ es prolina, Xaa₇ es histidina, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxislisina, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina y Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxislisina.

En algunas formas de realización, Xaa₁ es lisina, Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, Xaa₄ es glicina, Xaa₅ es ornitina, Xaa₆ es prolina, Xaa₇ es histidina, Xaa₈ es lisina o 5-hidroxislisina, Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina, Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxislisina, n es 4 y R es NH₂.

En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ia).

En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ib).

En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ic).

Las odilomicinas pueden purificarse a partir de las células de *Xenorhabdus nematophila* de la presente invención. Ventajosamente, los compuestos pueden purificarse a partir del sobrenadante de cultivo después de eliminar las células de *Xenorhabdus nematophila*. Para la preparación de un sobrenadante de cultivo que tenga actividad antibacteriana se cultiva la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 en un medio de cultivo líquido en condiciones estándar, las células bacterianas se eliminan y el sobrenadante se recupera. Las células bacterianas pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o por filtración.

Puede realizarse una purificación adicional de odilomicinas mediante cualquier procedimiento conocido, incluido cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa y/o HPLC en fase inversa.

En algunas formas de realización, las odilomicinas se purifican a partir del sobrenadante de cultivo de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 mediante cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía en fase inversa y HPLC en fase inversa sucesivas.

Las odilomicinas también pueden sintetizarse según técnicas estándar de la técnica que incluyen, pero sin limitación, síntesis orgánica en fase de solución y síntesis orgánica en fase sólida. En algunas formas de realización, la síntesis orgánica en fase sólida comprende la síntesis mediante máquinas sintetizadoras de péptidos. Dichas formas de realización y la ejecución de las mismas están al alcance los expertos. En Bodanzky, *et al.* "The Practice of Peptide Synthesis," Springer-Verlag (1994) se describen ejemplos de procedimientos de síntesis.

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando únicamente experimentos rutinarios, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descritas en la presente

memoria.

Se reconocerá también que pueden combinarse cualesquiera o todas las combinaciones, formas de realización y aspectos de la invención de cualquier forma para proporcionar otras combinaciones, formas de realización y aspectos dentro del ámbito de la invención a menos que, de otro modo, no sea posible.

La invención se describirá con más detalle mediante los ejemplos no limitantes siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción y fermentación

Organismo productor

La *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 (colección "*Diversité, genomes et interactions microorganisms-insectes*") se cultivó en medio de Luria-Bertani (LB, compuesto por bacto triptona, 10 g/l, extracto de levadura, 5 g/l, y NaCl, 10 g/l) para un cultivo líquido y en LB-agar para cultivos sólidos. El estado de fase (I o II) de esta cepa se determinó cultivando en NBTA (agar nutriente (Difco), 31 g/l, azul de bromotimol, 25 mg/l, y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1%, 40 mg/l) y midiendo la actividad antibacteriana frente a *Micrococcus luteus*. La *Xenorhabdus* muestra dos formas o variantes de colonias cuando se cultiva in vitro. Las modificaciones de la membrana exterior inducen adsorción diferencial de colorantes por variantes. Las variantes de fase I absorben colorantes y son azules en placas de NBTA, mientras que las colonias de fase II son rojas. Las fases I y II de las cepas se indican con sufijos /1 y /2, respectivamente) adjuntos a las denominaciones de las cepas. Esta cepa se mantuvo a 15°C en medio NBTA.

Fermentación

La *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 se cultivó durante 72 h, a 28°C con agitación en un matraz Erlenmeyer de 2 l que contenía 500 ml de medio de cultivo compuesto por bacto peptona, 15 g/l, MgSO₄·7H₂O, 2 g/l, y glucosa, 2 g/l. Se inoculó al cultivo el 0,1% (v/v) de un precultivo de 24 h en el mismo medio. La producción de antibiótico se supervisó mediante HPLC analítica.

Ejemplo 2: Aislamiento

Se retiraron las células bacterianas mediante centrifugación a baja velocidad (6000 × g, 10 min a 4°C) y el sobrenadante se esterilizó sobre un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro. El sobrenadante se añadió (1:1; v/v) a un tampón de NaCl 0,1 M-Tris 0,02 M (pH 7) y se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en un cartucho Sep Pack CarboxyMethyl (Accell Plus CM, Waters). El material sin unir se eliminó por lavado con tampón de NaCl 0,1 M-Tris 0,02 M (pH 7) y los productos con actividad antibiótica se eluyeron con tampón de NaCl 0,1 M-Tris 0,02 M (pH 7). Este eluato se acidificó con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v) y después se sometió a cromatografía en fase inversa en un cartucho Sep Pack C18 (Sep-Pak Plus C18, Waters). El material sin unir se eliminó mediante lavado con H₂O-TFA al 0,1% y los antibióticos reunidos se eluyeron con acetonitrilo. El eluato se liofilizó y, a continuación, se resuspendió en agua (1:5; v/v). Los compuestos puros se aislaron del extracto crudo mediante HPLC de fase inversa utilizando una columna C18 (Waters; Symmetry Symmetry C18; 5 µm; 4,6X150 mm), un gradiente lineal de H₂O/0,1% de TFA-acetonitrilo partiendo del 0% al 30% en 30 min, un caudal de 1 ml/min y una detección UV de 200 a 400 nm, proporcionando odilomicinas con los tiempos de retención de HPLC siguientes: Odilomicina A: 14,16 min (pureza: 98% UV), Odilomicina B: 14,44 min (pureza: 95% UV) y Odilomicina C: 14,6 min (pureza: 94% UV).

Ejemplo 3: Caracterización y propiedades fisicoquímicas

Análisis por RMN y EM

El compuesto purificado se analizó mediante espectroscopia de masas y RMN para determinar su estructura química.

El estudio por RMN se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker Avance que operaba a 700 MHz equipado con una criosonda. La muestra (10 mM) se disolvió en agua (95/5 H₂O/D₂O v/v) y el pH se ajustó a 3,5 con ácido clorhídrico. Todos los datos se registraron a 280 °K. Los desplazamientos químicos de protones se expresaron con respecto a 4,4-dimetil-silapentano-1-sulfonato de sodio, según las recomendaciones de la IUPAC. Los espectros de espectroscopia de correlación con filtro de doble cuanto (DQF-COSY), espectroscopia de correlación total con filtro-z (z-TOCSY) y espectroscopia de efecto Overhauser nuclear (NOESY) se registraron en un modo sensible a la fase, utilizando el procedimiento States-TPPI (Marion D. Et al, J. Magn. Reson. 85, 393-399 (1989)). Los espectros z-TOCSY se obtuvieron con un tiempo de mezclado de 80 ms y los espectros NOESY con tiempos de mezclado de 220 ms. Los experimentos de HSQC de ¹H-¹³C y HSQC-TOCSY de ¹H-¹³C se llevaron a cabo con la misma muestra. La resonancia de agua establecida en la frecuencia del vehículo se

suprimió por el procedimiento WATERGATE (Piotto M. *Et al.* J. Biomol. NMR 2, 661-665 (1992)). Todos los datos se procesaron con el programa informático XWINNMR. Los residuos no clásicos se identificaron a partir del análisis de los datos homonucleares y heteronucleares. La asignación de secuencia se realizó utilizando la estrategia general descrita por Wüthrich (Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids, John Wiley & Sons, Nueva York (1986)).

Se realizó en primer lugar una CL-EM con el fin de obtener el valor de m/z de las moléculas protonadas de todos los derivados de odilomicina. A continuación se llevó a cabo la fragmentación EM-EM sobre la odilomicina A, B y C. Los datos de ESI-CL-EM se obtuvieron en el modo positivo en un sistema de CL-EM Waters alliance (detector de masa Waters ZQ, detector de haz de fotodiodos Waters 2696, sistema de HPLC Waters alliance 2790). La columna de HPLC utilizada fue una columna C18 (Waters Symmetry C18 5 µm 4,6X150 mm) mantenida a 35°C. Los disolventes fueron (A) agua + 0,1% de TFA, (B) acetonitrilo + 0,1% de TFA, y el caudal fue de 1 ml/min. La composición de la fase móvil fue del 100% de A a 0 min, ascendiendo al 30% de B a los 30 min. Las muestras se disolvieron en disolvente A (100 µl). El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µl. La detección UV-visible se realizó mediante absorbancia a 200-400 nm. El flujo de disolvente a la EM se desvió para su eliminación durante los primeros 5 min para minimizar la formación de sal. Los datos de fragmentación EM-EM se obtuvieron en un microespectrómetro de masas Waters Micromass Q-Tof.

Propiedades fisicoquímicas de las odilomicinas

Se aislaron tres compuestos denominados odilomicina A, B y C, se purificaron a homogeneidad como un polvo blanco y se caracterizaron mediante espectrometría de masas. Los experimentos de ESI-EM revelaron los pesos moleculares de diferentes odilomicinas.

Odilomicina A: polvo blanco; UV: $\lambda_{\max}(\text{MeOH}) = 214 \text{ nm}$; ESI-EM (m/z): 1297 [M+H]⁺;

Odilomicina B: polvo blanco; UV: $\lambda_{\max}(\text{MeOH}) = 214 \text{ nm}$; ESI-EM (m/z): 1281 [M+H]⁺;

Odilomicina C: polvo blanco; UV: $\lambda_{\max}(\text{MeOH}) = 214 \text{ nm}$; ESI-EM (m/z): 1265 [M+H]⁺.

Elucidación de la estructura química

La estructura química de la odilomicina A se estableció a partir del análisis combinado de datos de RMN y de espectrometría de masas.

Los datos de RMN se obtuvieron en agua y se registraron una serie de experimentos que incluían DQF-COSY, TOCSY, NOESY, HSQC de ¹H-¹³C y HSQC-TOCSY de ¹H-¹³C (figuras 1 y 2). El espectro 1D reveló características del compuesto peptídico con por lo menos 6 señales de amida que comprenden las regiones de desplazamiento químico de 8,9-7,0 ppm, señales de protón alfa en la región de 4,8-3,7 ppm y señales de protón beta en la región de 3,7-1,1 ppm. No se observó ninguna señal de metilo en la región de campo alto, lo que indica la ausencia de residuos de Ala, Thr, Leu, Val y Ile. Por el contrario, se observaron señales que incluían el singlete a 9,60 ppm y el triplete a 6,17 ppm, lo que sugiere la presencia de residuos no clásicos. Además de los datos homonucleares, los datos heteronucleares de ¹H-¹³C fueron particularmente útiles para caracterizar los sistemas de espín de los residuos no clásicos.

Los análisis combinados de todos estos datos permitieron la identificación de 11 sistemas de espín que incluían 4 tipos de residuos no clásicos: un ácido α,γ -diamino- β -hidroxi-butírico (Dab(β OH)), una δ -hidroxilisina (Dhl), una α,β -deshidroarginina (Dha) y un α,δ -diaminobutano (Dbt). No se determinó ni la configuración de los carbonos asimétricos de estos residuos no clásicos ni la de los residuos clásicos. La fuerte intensidad de Orn⁵-H _{α} -Pro⁶-H _{$\delta\delta$} -NOE sugiere que el enlace de amida de Orn⁵-Pro⁶ adopta la configuración trans. Utilizando NOE secuenciales, se identificó que la secuencia de este seudopéptido era la siguiente:



Los datos de RMN se enumeran en la tabla 1 (Odilomicina A), la tabla 2 (Odilomicina B) y la tabla 3 (Odilomicina C).

Esta secuencia está completamente de acuerdo con el peso molecular de 1297 Da medido mediante datos de espectroscopia de masas y los residuos no clásicos confirmados por datos de fragmentación de EM/EM.

Tabla 1. Desplazamientos químicos de odilomicina A (agua, 280 K)

Sistema de espín	Grupo	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
Lys ¹	HN	-	-
	C α H	3,8	53,0

ES 2 657 930 T3

Sistema de espín	Grupo	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
	C _β H ₂	1,66/1,62	30,4
	C _γ H ₂	1,2	21,1
	C _δ H ₂	1,45	26,3
	C _ε H ₂	2,78	39,0
Ácido hidroxi-diamino-butírico ² Dab(βOH) ²	HN	8,83	-
	C _α H	4,28	56,3
	C _γ H-OH	3,89	67,4
	C _γ H ₂	2,99/2,79	41,9
	NH ₂		
Ácido hidroxi-diamino-butírico ³ Dab(βOH) ³	HN	8,63	-
	C _α H	4,33	56,3
	C _β H-OH	3,93	67,7
	C _γ H ₂	2,98/2,80	41,5
	NH ₂	-	-
Gly ⁴	HN	8,37	-
	C _α H	3,8	42,1
Ornitina ⁵ Orn ⁵	HN	8,15	-
	C _α H	4,46	51,2
	C _β H ₂	1,58/1,42	27,5
	C _γ H ₂	1,49/1,4	23,2
	C _δ H ₂	2,74	39
	NH ₂	-	-
Pro ⁶	C _α H	4,10	60,4
	C _β H ₂	1,98/1,60	29,5
	C _γ H ₂	1,72	24,3
	C _δ H ₂	3,48/3,38	47,7
His ⁷	HN	8,49	-
	C _α H	4,46	52,0
	C _β H ₂	2,98-2,91	26,3
	C _{δ2} H	7,03	118
	C _{ε1} H	8,33	134
δ Hidroxilisina ⁸ Dhl ⁸	HN	8,41	-
	C _α H	4,12	53,8
	C _β H ₂	1,70	27,0
	C _γ H ₂	1,36/1,26	30,0
	C _δ H-OH	3,62	67,0
	C _ε H ₂	2,86/2,63	44,5
	NH ₂	-	-
deshidroarginina ⁹ Dha ⁹	HN	9,6	-
	C _α	-	-
	C _β HC _γ H ₂	6,17	132
	C _δ H ₂	2,20	26,5
	HN _ε	3,10	39,5
	C(NH ₂)=NH	7,0	-
		-	-
δ-Hidroxilisina ¹⁰ Dhl ¹⁰	HN	8,05	-
	C _α H	4,06	54,0
	C _β H ₂	1,65	27,0
	C _γ H ₂	1,27	30,0
	C _δ H-OH	3,60	67,0
	C _ε H ₂	2,86/2,63	44,5
	NH ₂	-	-
Diaminobutano ¹¹ Dbt ¹¹	HN	8,05	-
	C _α H ₂	2,95	39,5

	C _β H ₂	1,30	25,3
	C _γ H ₂	1,40	24,0
	C _δ H ₂	2,78	39,0
	NH ₂	-	-

Tabla 2. Desplazamientos químicos de odilomicina B (agua, 280 K)

Sistema de espín	Grupo	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
Lys ¹	HN	-	-
	C _α H	3,8	53,0
	C _β H ₂	1,66/1,62	30,4
	C _γ H ₂	1,2	21,1
	C _δ H ₂	1,45	26,3
	C _ε H ₂	2,78	39,0
Ácido hidroxi-diamino-butírico ² Dab(βOH) ²	HN	8,83	-
	C _α H	4,28	56,3
	C _β H-OH	3,89	67,4
	C _γ H ₂	2,99/2,79	41,9
	NH ₂	-	-
Ácido hidroxi-diamino-butírico ³ Dab(βOH) ³	HN	8,63	-
	C _α H	4,33	56,3
	C _β H-OH	3,93	67,7
	C _γ H ₂	2,98/2,80	41,5
	NH ₂	-	-
Gly ⁴	HN	8,37	-
	C _α H	3,8	42,1
Ornitina ⁵ Orn ⁵	HN	8,15	-
	C _α H	4,46	51,2
	C _β H ₂	1,58/1,42	27,5
	C _γ H ₂	1,49/1,4	23,2
	C _δ H ₂	2,74	39
	NH ₂	-	-
Pro ⁶	C _α H	4,10	60,4
	C _β H ₂	1,98/1,60	29,5
	C _γ H ₂	1,72	24,3
	C _δ H ₂	3,48/3,38	47,7
His ⁷	HN	8,49	-
	C _α H	4,46	52,0
	C _β H ₂	2,98-2,91	26,3
	C _{δ2} H	7,03	118
	C _{ε1} H	8,33	134
Lys ⁸	HN	8,41	-
	C _α H	4,12	53,8
	C _β H ₂	1,70	27,0
	C _γ H ₂	1,36/1,26	30,0
	C _δ H ₂	1,53	26,4
	C _ε H ₂	2,86/2,63	44,5
deshidroarginina ⁹ Dha ⁹	HN	9,6	-
	C _α	-	-
	C _β HC _γ H ₂	6,17	132
	C _δ H ₂	2,20	26,5
	HN _ε	3,10	39,5
	C(NH ₂)=NH	7,0	-
δ-Hidroxilisina ¹⁰	HN	8,05	-

Sistema de espín	Grupo	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
Dhl ¹⁰	C _α H	4,06	54,0
	C _β H ₂	1,65	27,0
	C _γ H ₂	1,27	30,0
	C _δ H-OH	3,60	67,0
	C _ε H ₂	2,86/2,63	44,5
	NH ₂	-	-
Diaminobutano ¹¹ Dbt ¹¹	HN	8,05	
	C _α H ₂	2,95	39,5
	C _β H ₂	1,30	25,3
	C _γ H ₂	1,40	24,0
	C _δ H ₂	2,78	39,0
	NH ₂	-	-

Tabla 3. Desplazamientos químicos de odilomicina C (agua, 280 K)

Sistema de espín	Grupo	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
Lys ¹	HN	-	-
	C _α H	3,8	53,0
	C _β H ₂	1,66/1,62	30,4
	C _γ H ₂	1,2	21,1
	C _δ H ₂	1,45	26,3
	C _ε H ₂	2,78	39,0
Ácido hidroxi-diamino-butírico ² Dab(βOH) ²	HN	8,83	-
	C _α H	4,28	56,3
	C _β H-OH	3,89	67,4
	C _γ H ₂	2,99/2,79	41,9
	NH ₂	-	-
Ácido hidroxi-diamino-butírico ³ Dab(βOH) ³	HN	8,63	-
	C _α H	4,33	56,3
	C _β H-OH	3,93	67,7
	C _γ H ₂	2,98/2,80	41,5
	NH ₂	-	-
Gly ⁴	HN	8,37	-
	C _α H	3,8	42,1
Ornitina ⁵ Orn ⁵	HN	8,15	-
	C _α H	4,46	51,2
	C _β H ₂	1,58/1,42	27,5
	C _γ H ₂	1,49/1,4	23,2
	C _δ H ₂	2,74	39
	NH ₂	-	-
Pro ⁶	C _α H	4,10	60,4
	C _β H ₂	1,98/1,60	29,5
	C _γ H ₂	1,72	24,3
	C _δ H ₂	3,48/3,38	47,7
His ⁷	HN	8,49	-
	C _α H	4,46	52,0
	C _β H ₂	2,98-2,91	26,3
	C _{δ2} H	7,03	118
	C _{ε1} H	8,33	134
Lys ⁸	HN	8,41	-
	C _α H	4,12	53,8
	C _β H ₂	1,70	27,0
	C _γ H ₂	1,36/1,26	30,0
	C _δ H ₂	1,53	26,4
	C _ε H ₂	2,86/2,63	44,5

Sistema de espín	Grupo	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
	NH ₂	-	-
deshidroarginina ⁹ Dha ⁹	HN	9,6	-
	C _α	-	-
	C _β HC _γ H ₂	6,17	132
	C _δ H ₂	2,20	26,5
	HN _ε	3,10	39,5
	C(NH ₂)=NH	7,0	-
Lys ¹⁰	HN	8,05	-
	C _α H	4,06	54,0
	C _β H ₂	1,65	27,0
	C _γ H ₂	1,27	30,0
	C _δ H-OH	1,58	26,3
	C _ε H ₂	2,86/2,63	44,5
	NH ₂	-	-
Diaminobutano ¹¹ Dbt ¹¹	HN	8,05	-
	C _α H ₂	2,95	39,5
	C _β H ₂	1,30	25,3
	C _γ H ₂	1,40	24,0
	C _δ H ₂	2,78	39,0
	NH ₂	-	-

Tabla 4. Fragmentaciones clave de los 1297 iones [M+H]⁺ de odilomicina A

172	[Gly ⁴ /Orn ⁵] ⁺
233	[Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³] ⁺
235	[Pro ⁶ /His ⁷] ⁺
245	[Lys ¹ /Dab(βOH) ²] ⁺
282	[His ⁷ /Dhl ⁸] ⁺
299	[Dhl ⁸ /Dha ⁹] ⁺ or [Dha ⁹ /Dhl ¹⁰] ⁺
361	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³] ⁺
370	[Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺ - NH ₃ ⁺
379	[Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸] ⁺
396	[Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸] ⁺ + NH ₃ ⁺
406	[Gly ⁴ /Orn ⁵ //Pro ⁶ /His ⁷] ⁺
436	[His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹] ⁺
530	[Dhl ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
533	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵] ⁺ o [Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹] ⁺
550	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸] ⁺
567	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸] ⁺ + NH ₃ ⁺
683	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸] ⁺ + NH ₃ ⁺
704	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹] ⁺
765	[Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
820	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹] ⁺
936	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
964	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰] ⁺
1052	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
1064	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹] ⁺
1297	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Dhl ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺

5

Tabla 5. Fragmentaciones clave de los 1281 iones [M+H]⁺ de odilomicina B

172	[Gly ⁴ /Orn ⁵] ⁺
233	[Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³] ⁺
235	[Pro ⁶ /His ⁷] ⁺
245	[Lys ¹ /Dab(βOH) ²] ⁺

266	[His ¹ /Lys ⁸] ⁺
361	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³] ⁺
370	[Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺ - NH ₃ ⁺
363	[Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺
380	[Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺ + NH ₃ ⁺
406	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷] ⁺
514	[Lys ³ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
517	[Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹] ⁺
533	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵] ⁺
534	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺
551	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺ + NH ₃ ⁺
667	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺ + NH ₃ ⁺
688	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹] ⁺
749	[Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
804	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹] ⁺
920	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
948	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰] ⁺
1036	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
1048	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /lys ⁸ /Dha ⁹] ⁺
1281	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /lys ⁸ /Dha ⁹ /Dhl ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺

Tabla 6. Fragmentaciones clave de los 1264 iones [M+H]⁺ de odilomicina C

172	[Gly ⁴ /Orn ⁵] ⁺
233	[Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³] ⁺
235	[Pro ⁶ /His ⁷] ⁺
245	[Lys ¹ /Dab(βOH) ²] ⁺
266	[His ¹ /Lys ⁸] ⁺
361	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³] ⁺
354	[Dha ⁹ /Lys ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺ - NH ₃ ⁺
363	[Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺
380	[Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺ + NH ₃ ⁺
406	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷] ⁺
498	[Lys ³ /Dha ⁹ /Lys ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
517	[Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹] ⁺
533	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵] ⁺
534	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺
551	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸] ⁺ + NH ₃ ⁺
688	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹] ⁺
733	[Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹ /Lys ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
804	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹] ⁺
904	[Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹ /Lys ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
932	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹ /Lys ¹⁰] ⁺
1020	[Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /Lys ⁸ /Dha ⁹ /Lys ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺
1048	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /lys ⁸ /Dha ⁹] ⁺
1265	[Lys ¹ /Dab(βOH) ² /Dab(βOH) ³ /Gly ⁴ /Orn ⁵ /Pro ⁶ /His ⁷ /lys ⁸ /Dha ⁹ /Lys ¹⁰ /Dbt ¹¹] ⁺

5 **Ejemplo 4: Estudios *in vitro***

Procedimientos de ensayo de susceptibilidad antibacteriana

10 Las concentraciones inhibitoras mínimas (MIC) se determinaron según las directrices de condiciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) detalladas en la tabla 7. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 7. Parámetros de determinación de la MIC

Cepa(s)	Directrices del CLSI relevantes	Medios de cultivo y condiciones de incubación
<p><i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i></p>	<p>M07-A8. Procedimientos para la dilución antimicrobiana Ensayos de susceptibilidad para bacterias que crecen aeróbicamente; norma aprobada – octava edición</p>	<p>Caldo de Mueller-Hinton (MH) 37°C aeróbicas 18 - 24 h</p>
<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i></p>	<p>M07-A8</p>	<p>MH suplementado con el 5% de sangre de caballo lisada (MHB) 37°C aeróbicas 18-24 h</p>
<p><i>Haemophilus influenzae</i></p>	<p>M07-A8</p>	<p>Medio de ensayo hemófilo (HTM) 37°C aeróbicas 18-24 h.</p>
<p><i>Moraxella catarrhalis</i></p>	<p>M45-A2. Procedimientos para la dilución antimicrobiana y ensayo de susceptibilidad de disco de bacterias aisladas no frecuentemente o exigentes; directriz aprobada – segunda edición</p>	<p>MH 37°C aeróbicas 24 h.</p>
<p><i>Pasteurella multocida</i></p>	<p>M45-A2</p>	<p>MHB 37°C aeróbicas 24 h.</p>

<i>Mannheimia haemolytica</i>	No disponible, seguido por M07-A8	MHB 37°C aeróbicas 24 h.
<i>Propionibacterium acnes Bacteroides fragilis</i>	M11-A7. Procedimientos para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias; norma aprobada – séptima edición	Caldo de Schaedler suplementado con 1 µg/ml de vitamina K1 y el 5% de sangre de caballo lisada (SB) 37°C aeróbicas 48 h.

Preparación de los inóculos. Se tomaron de cinco a diez colonias aisladas en pocillos y se resuspendieron en 3 ml de solución salina estéril. El inóculo se resuspendió mediante agitación vigorosa en un mezclador de vórtice durante 15 s. Se ajustó la turbidez a un patrón de McFarland 0,5 ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml). El inóculo se diluyó posteriormente en el medio apropiado (tabla 7) dando un inóculo final en cada pocillo de $\sim 2-8 \times 10^5$ UFC/ml.

Adición del artículo de ensayo. Se diluyeron soluciones madre de odilomicina A o comparador en el medio apropiado dando una concentración de partida máxima de 50 µg/ml en el ensayo. Se dispensaron 50 µl de medio en cada pocillo en las columnas dos a 12 de una placa de 96 pocillos. Se dispensaron 100 µl de la solución de compuesto de ensayo apropiada (100 µg/ml) en cada pocillo de la columna uno. En el caso de *M. catarrhalis*, *M. haemolytica* y *P. multocida* estos valores se doblaron (se utilizó un volumen de ensayo final de 200 µl). Se realizaron diluciones a la mitad seriadas desde la columna uno a la columna 10 para dar un intervalo de concentración de 50 a 0,1 µg/ml de cada compuesto en el ensayo. Las columnas 11 y 12 sirvieron como controles de cultivo positivo (sin fármaco ni artículo de ensayo, inóculo añadido) y negativo (sin fármaco, artículo de ensayo o inóculo añadido), respectivamente.

Adición de cepas bacterianas. Se añadieron 50 µl de cada inóculo a los pocillos apropiados, dando como resultado un volumen final de 100 µl que consistía en 50 µl de compuesto diluido o diluyentes y 50 µl de inóculo o caldo solo.

Se establecieron las concentraciones bactericidas mínimas (MBC) ampliando el procedimiento de MIC a la evaluación de la actividad bactericida. Después de 24 horas, se retiraron 10 µl de los pocillos, se diluyeron de forma seriada y después se dispusieron en placas de agar adecuadas. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. La MBC se leyó 18 h después como la concentración más baja de antibiótico que dio como resultado una supervivencia del 0,1% en el subcultivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Las MBC también se determinaron en presencia del 50% y el 95% (v/v) de suero humano para evaluar la unión de las proteínas.

Efectos bactericidas de odilomicina sobre el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa*

Se llevaron a cabo curvas de destrucción bacteriana inoculando *S. aureus* ATCC 13709 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 con una concentración de Odilomicina A igual a cuatro veces la MIC. Se utilizaron vancomicina o polimixina a una concentración cuatro veces su MIC. Los inóculos de *S.aureus* y *P.aeruginosa* se prepararon a partir de colonias cultivadas durante toda la noche en MHB. Las concentraciones de antibióticos en el matraz se ajustaron en MHB según la concentración deseada. A los tubos de cultivo que contenían 10 ml se inoculó *S. aureus* o *P. aeruginosa* a un inóculo aproximado de 10^5 UFC/ml. Las muestras se retiraron y se realizaron recuentos de las bacterias a 0, 1, 2, 3, 4, 6 y 24 h de incubación a 37°C. Así, después de agitar en vórtice los tubos de cultivo, se retiraron dos muestras de 50 µl y se diluyeron de forma seriada con MHB. Después de cada etapa de dilución, se plaquearon 20 µl en placas de agar LB, que se incubaron durante 24 h a 37°C. Después de ello, se realizó un recuento de las colonias y se retro-extrapolaron al volumen original para determinar la concentración inicial (UFC/ml).

Propiedades biológicas *in vitro*

5 Se analizó odilomicina A para determinar su actividad antimicrobiana frente a un intervalo amplio de bacterias implicadas en infección nosocomial y animal. Esta posee un amplio espectro de actividad antibacteriana contra patógenos gram-positivos y gram-negativos (tabla 8). Con respecto a bacterias gram-positivas, las actividades antibacterianas de la odilomicina A son potentes, con unas MIC inferiores a 1 µg/ml frente a cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis*, incluyendo frente a algunos aislados clínicos multirresistentes (tabla 9). Se observó una actividad antibacteriana débil o la carencia de la misma frente a *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Con respecto a las bacterias gram-negativas, las actividades antibacterianas de odilomicina A son potentes frente a *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, y son buenas, con unas MIC inferiores a 10 µg/ml, frente a cepas de *A. baumannii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, incluidos algunos aislados clínicos multirresistentes (tabla 8, tabla 9).

15 Tabla 8. Actividad antibacteriana de Odilomicinas A, B, C

Bacterias	Cepa	MIC (µg/ml)			
		Odilomicina A	Odilomicina B	Odilomicina C	Control
Gram(-)					
<i>A. baumannii</i>	ATCC BAA747	6,25	-	-	< 0,1 ^a
<i>B. fragilis</i>	ATCC 25238	1,56	-	-	0,39 ^b
<i>E. cloacae</i> *	11370	1,56	-	-	0,78 ^c
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	3,13	-	-	0,39 ^c
<i>E. coli</i> CTX-M14*	AEC7	3,13	-	-	0,39 ^c
<i>E. coli</i> CTX-M15*	MEC23	3,13	-	-	0,39 ^c
<i>E. coli</i> TEM*	MEC12	1,56	-	-	0,39 ^c
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 43816	0,78	-	-	0,39 ^c
<i>K. pneumoniae</i> KPC*	2475	1,56	-	-	0,78 ^c
<i>K. oxytoca</i>	NEB9	0,39	-	-	0,39 ^c
<i>M. haemolytica</i>	ATCC 33396	50,0	-	-	< 0,1 ^a
<i>M. catarrhalis</i>	ATCC 25238	1,56	-	-	< 0,1 ^a
<i>P. multocida</i>	ATCC 12945	25,0	-	-	< 0,1 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	3,13	3,13	6,25	0,39 ^c
<i>S. maltophilia</i>	ATCC 13637	6,25	-	-	< 0,1 ^a
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49766	12,5	-	-	< 0,1 ^a
Gram(+)					
<i>B. subtilis</i>	DSM 347	<0,20	-	-	0,20 ^d
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	> 50,0	-	-	0,78 ^a
<i>E. faecium</i>	ATCC 700221	25,0	-	-	> 50,0 ^a
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 49619	> 50,0	-	-	0,39 ^a
<i>S. pyogenes</i>	ATCC 12384	50,0	-	-	0,20 ^a
<i>S. aureus</i>	ATCC 13709	0,39	0,39	0,78	0,78 ^d
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	0,39	0,39	0,78	0,78 ^d
<i>S. aureus</i> USA300	ATCC BAA1556	0,78	0,78	1,56	0,78 ^d
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	< 0,20	-	-	0,20 ^d
<i>P. acnes</i>	ATCC 6919	3,13	-	-	0,39 ^a

*aislados clínicos del Hospital Universitario de Nimes ; ^aciprofloxacina; ^bmetronidazol; ^cpolimixina; ^dvancomicina

Tabla 9. Actividad antibacteriana de Odilomicina A frente a aislados clínicos multirresistentes

Antibacteriano	<i>P. aeruginosa</i>					<i>S. aureus</i>				
	561 8	40168 1	3517 0	4216 2	51223 2	2330 5	1666 6	2068 1	2184 0	2036 4
Pip./Taz. ^a	S	S	S	S	R	-	-	-	-	-
Ticar./CA ^b	S	R	R	R	R	-	-	-	-	-
Eritromicina n	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
Cefepim	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-
Cefoxitina	-	-	-	-	-	I	R	R	S	R

Ejemplo 5: Estudios sobre la sinergia con otros antimicrobianos

5 Se investigaron las interacciones *in vitro* de Odilomicina A con rifampicina, ciprofloxacina, kanamicina, gentamicina, ampicilina, tetraciclina y vancomicina mediante una técnica de damero de microdilución utilizando placas de microvaloración de 96 pocillos para cada combinación.

Se proporcionaron vancomicina, rifampicina, kanamicina, gentamicina, ampicilina, ciprofloxacina y tetraciclina (Sigma-Aldrich) como patrones en polvo por los fabricantes.

10 Se dispusieron diluciones a la mitad seriadas de los agentes antimicrobianos en MHB solos o en combinación en pocillos y se les inoculó un inóculo de *S. aureus* ATCC 25923 o de *K. pneumoniae* ATCC 43816 de forma que cada pocillo contuviera aproximadamente 10⁴ UFC/ml. Después de una incubación a 37°C durante 16-20 h, se consideró la MIC con el pocillo que contenía las concentraciones más reducidas de los dos fármacos en los que no se observó crecimiento visible. Las concentraciones de cada antimicrobiano que se analizaron en combinación fueron de entre 1/8 × MIC y de 2 × MIC.

Sinergia con otros antimicrobianos

20 Se investigaron las interacciones de odilomicina A con otros antibióticos de diferentes clases frente a *S. aureus* (tabla 11). Se observó una interacción sinérgica con los antibióticos aminoglucósidos kanamicina y gentamicina. También se observó interacción sinérgica frente a *K. pneumoniae* (tabla 12).

Tabla 12. Interacción sinérgica de Odilomicina A con antibióticos frente a *S. aureus*

Antibiótico	MIC (µg/ml) de antibiótico solo	Sinergia con odilomicina A	Combinaciones (µg/ml) odilomicina/antibiótico
Odilomicina A	0,39	N/A	
Rifampicina	0,012	-	
Kanamicina	0,62	+	0,19 / 0,31 0,19 / 0,15 0,09 / 0,31 0,09 / 0,15
Gentamicina	0,078	+	0,19 / 0,039
Ampicillin	0,15	-	
Tetraciclina	0,78	-	
Vancomicina	0,78	-	
Ciprofloxacina	0,31	-	

25 Tabla 13. Interacción sinérgica de Odilomicina A con aminoglucósidos frente a *k. pneumoniae*

Antibiótico	MIC (µg/ml) de antibiótico solo	Sinergia con odilomicina A	Combinaciones (µg/ml) odilomicina/antibiótico
Odilomicina A	25	N/A	
Kanamicina	1,56	+	6,25 / 0,39
Gentamicina	0,39	+	12,5 / 0,09 3,12/19

Ejemplo 6: Estudios *in vivo*

Interacción biológica *in vivo* de Odilomicina A

30 Se utilizaron ratones ICR hembra adquiridos de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN) que pesaban 19-21 g en experimentos de infección letal aguda. Los ratones eran totalmente inmunocompetentes. La infección se indujo inoculando por vía intraperitoneal a los ratones una suspensión bacteriana de *S. aureus* Smith ATCC 13709. Las exposiciones a bacterias (aproximadamente 5 log₁₀ UFC/ratón) se administraron suspendidas en 0,5 ml de mucina de cerdo al 20%. Los tratamientos se administraron una vez 1 hora después de la exposición mediante inyección IV (El linezolid se administró inmediatamente después de la exposición) (tabla 13). Se realizó un

seguimiento de la mortalidad hasta 5 días después de la exposición. Los animales que sobrevivieron al final del estudio se sacrificaron humanitariamente.

Tabla 14. Exposición y programa de dosificación

Grupo	n	Exposición a <i>S. aureus</i> (UFC/ratón)	Tratamiento	Concentración (mg/kg)	Vía	Programa de dosificación
1	6	5 log ₁₀	Ninguno	N/A	N/A	N/A
2	6	5 log ₁₀	Linezolid	12,5	PO	0 h
3	6	5 log ₁₀	Odilomicina A	5,0	IV	1 h
4	6	5 log ₁₀	Odilomicina A	2,5	IV	1 h
5	6	5 log ₁₀	Odilomicina A	1,0	IV	1 h

Se utilizaron ratones BALB/c hembra adquiridos de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN) que pesaban 19-21 g en experimentos de infección letal aguda. Los ratones eran totalmente inmunocompetentes. La infección se indujo inoculando por vía intraperitoneal a los ratones una suspensión bacteriana de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las exposiciones a bacterias (8,6 log₁₀ UFC/ratón) se administraron suspendidas en 0,1 ml de solución salina estéril. Los tratamientos se administraron una vez 1 hora después de la exposición mediante inyección IV (La tobramicina se administró por vía IP inmediatamente después de la exposición) (tabla 13). Se realizó un seguimiento de la mortalidad hasta 2 días después de la exposición. Los animales que sobrevivieron al final del estudio se sacrificaron humanitariamente.

Tabla 15. Exposición y programa de dosificación

Grupo	n	Exposición a <i>P. aeruginosa</i> (UFC/ratón)	Tratamiento	Concentración (mg/kg)	Vía	Programa de dosificación
1	6	8,6 log ₁₀	Ninguno	N/A	N/A	N/A
2	6	8,6 log ₁₀	Tobramicina	0,39	IP	0 h
3	6	8,6 log ₁₀	Odilomicina A	15	IV	1 h
4	6	8,6 log ₁₀	Odilomicina A	7,5	IV	1 h

Propiedades biológicas *in vivo*

Los animales sin tratar murieron en un periodo de 24-48 h después de la infección con *S. aureus*. Todos los ratones tratados con linezolid y odilomicina A a dosis de 5,0 mg/kg y 2,5 mg/kg sobrevivieron hasta 5 días después de la infección (tabla 14). Un ratón murió con odilomicina A a una dosis de 1,0 mg/kg 2 días después de la infección.

Tabla 16. Supervivencia de ratones después de la exposición a *S. aureus* y el tratamiento

Grupo	n	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Muertes de animales					
				Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	6	Ninguna	N/A	0	6	0	0	0	0
2	6	Linezolid	12,5	0	0	0	0	0	0
3	6	Odilomicina A	5,0	0	0	0	0	0	0
4	6	Odilomicina A	2,5	0	0	0	0	0	0
5	6	Odilomicina A	1,0	0	0	1	0	0	0

Los animales sin tratar murieron en un periodo de 24-48 h después de la infección con *P. aeruginosa*. Todos los ratones tratados con tobramicina sobrevivieron hasta 5 días después de la infección (Tabla 14). Un ratón murió el día 1 con Odilomicina A a una dosis de 15 mg/kg y 4 ratones murieron el día 1 con Odilomicina A a una dosis de 7,5 mg/kg.

Tabla 17. Supervivencia de ratones después de la exposición a *P. aeruginosa* y el tratamiento

Grupo	n	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Muertes de animales		
				Día 0	Día 1	Día 2
1	6	Ninguna	N/A	0	6	0
2	6	Tobramicina	0,39	0	0	0
3	6	Odilomicina A	15	0	1	4
4	6	Odilomicina A	7,5	0	4	1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOSOPHARM SAS
 INRA
 5
 <120> Nuevos derivados de péptidos como antibióticos
 <130> 361585D29911
 10 <150> US 61/540,085
 <151> 28/09/2012
 <150> EP 11183034.5
 <151> 28/09/2012
 15 <160> 3
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Xenorhabdus nematophilus
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Ornitina
 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-hidroxisilisina
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> 2,3-deshidroarginina
 <220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-hidroxisilisina
 <400> 1
 Lys Xaa Xaa Gly Xaa Pro His Xaa Xaa Xaa
 55 1 5 10
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Xenorhabdus nematophilus
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)

<223> ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (3)..(3)
 <223> ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (5)..(5)
 <223> Ornitina
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (9)..(9)
 <223> 2,3-deshidroarginina
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (10)..(10)
 <223> 5-hidroxisisina
 <400> 2
Lys Xaa Xaa Gly Xaa Pro His Lys Xaa Xaa
 1 5 10
 25 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Xenorhabdus nematophilus
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Ornitina
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> 2,3-deshidroarginina
 50 <400> 3
Lys Xaa Xaa Gly Xaa Pro His Lys Xaa Lys
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):

5
$$\text{Xaa}_1\text{-Xaa}_2\text{-Xaa}_3\text{-Xaa}_4\text{-Xaa}_5\text{-Xaa}_6\text{-Xaa}_7\text{-Xaa}_8\text{-Xaa}_9\text{-Xaa}_{10}\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-R (I)}$$

en el que

10 Xaa_1 , Xaa_2 , Xaa_3 , Xaa_8 y Xaa_{10} se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en lisina, 3-hidroxislisina, 4-hidroxislisina, 5-hidroxislisina, 3,4-dihidroxislisina, 3,5-dihidroxislisina, 4,5-dihidroxislisina, ornitina, 3-hidroxiornitina, 4-hidroxiornitina, 3,4-dihidroxiornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico, arginina, histidina, serina y treonina;

15 Xaa_4 es glicina;

Xaa_5 es ornitina

20 Xaa_6 es prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, ácido aziridin-2-carboxílico, ácido azetidin-2-carboxílico, ácido piperídico, 4-oxaprolina, 3-tiaprolina, 4-tiaprolina, 3,4-deshidroprolina, 4-aminoprolina, 4-fluoroprolina, α -metilprolina o α -alilprolina;

Xaa_7 es histidina

25 Xaa_9 es arginina, 2,3-deshidroarginina, citrulina, 2,3-deshidrocitrulina, canavanina o 2,3-deshidrocanavanina;

n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

R es -OH, -NH₂ o -COOH.

30 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que

Xaa_1 es lisina;

35 Xaa_2 y Xaa_3 son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico;

Xaa_4 es glicina;

Xaa_5 es ornitina;

40 Xaa_6 es prolina;

Xaa_7 es histidina; y

45 Xaa_9 es 2,3-deshidroarginina.

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que

Xaa_1 es lisina;

50 Xaa_2 y Xaa_3 son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico;

Xaa_4 es glicina;

55 Xaa_5 es ornitina;

Xaa_6 es prolina;

Xaa_7 es histidina;

60 Xaa_8 es lisina o 5-hidroxislisina;

Xaa_9 es 2,3-deshidroarginina; y

65 Xaa_{10} es lisina o 5-hidroxislisina.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que

Xaa₁ es lisina;

Xaa₂ y Xaa₃ son cada uno ácido 3-hidroxi-2,4-diaminobutanoico;

Xaa₄ es glicina;

Xaa₅ es ornitina;

Xaa₆ es prolina;

Xaa₇ es histidina;

Xaa₈ es lisina o 5-hidroxislisina;

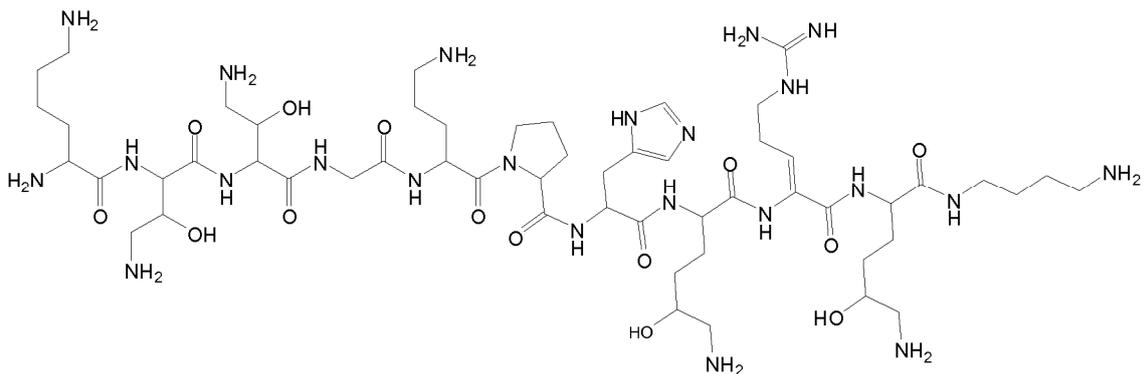
Xaa₉ es 2,3-deshidroarginina;

Xaa₁₀ es lisina o 5-hidroxislisina.

n es 4; y

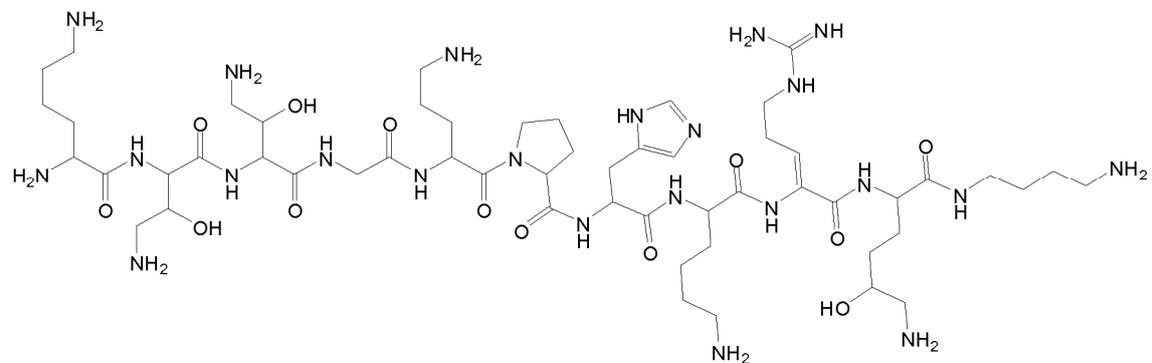
R es NH₂.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula (Ia):



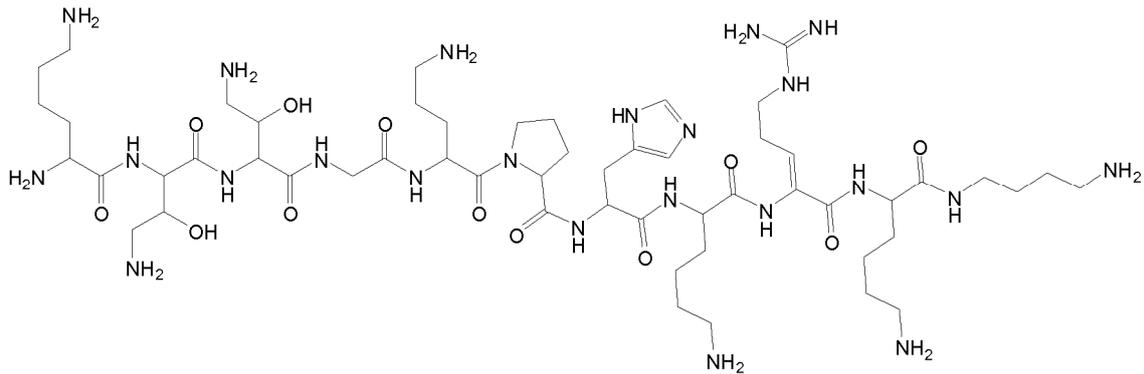
(Ia).

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula (Ib):



(Ib).

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula (Ic):



(Ic).

- 5 8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su utilización como un medicamento.
9. Composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un segundo compuesto antibiótico.
- 10 10. Composición según la reivindicación 9, en la que el segundo compuesto antibiótico es un antibiótico aminoglucósido.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en la que el segundo compuesto antibiótico es la kanamicina y/o la gentamicina.
- 15 12. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Procedimiento para producir un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende las etapas siguientes:
- 20 a) hacer crecer la cepa de *Xenorhabdus nematophila* CNCM 1-4530 en un medio de cultivo líquido; y
- b) purificar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 25 14. Cepa de *Xenorhabdus nematophila* depositada en el CNCM el 21 de septiembre de 2011 que presenta el número de acceso CNCM 1-4530.
15. Sobrenadante de cultivo a partir de la cepa de *Xenorhabdus nematophila* según la reivindicación 14 que presenta actividad antibiótica.

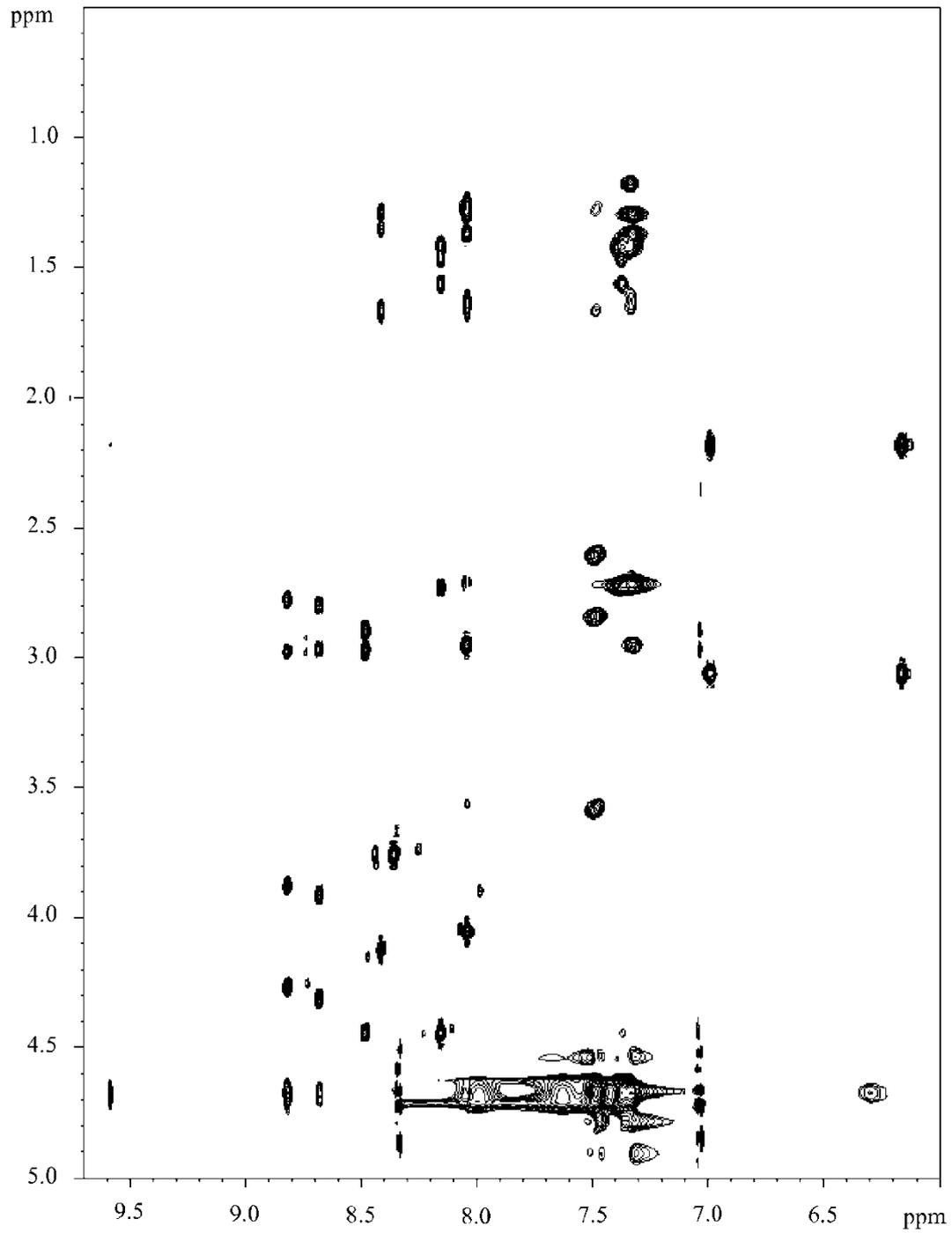


FIG. 1

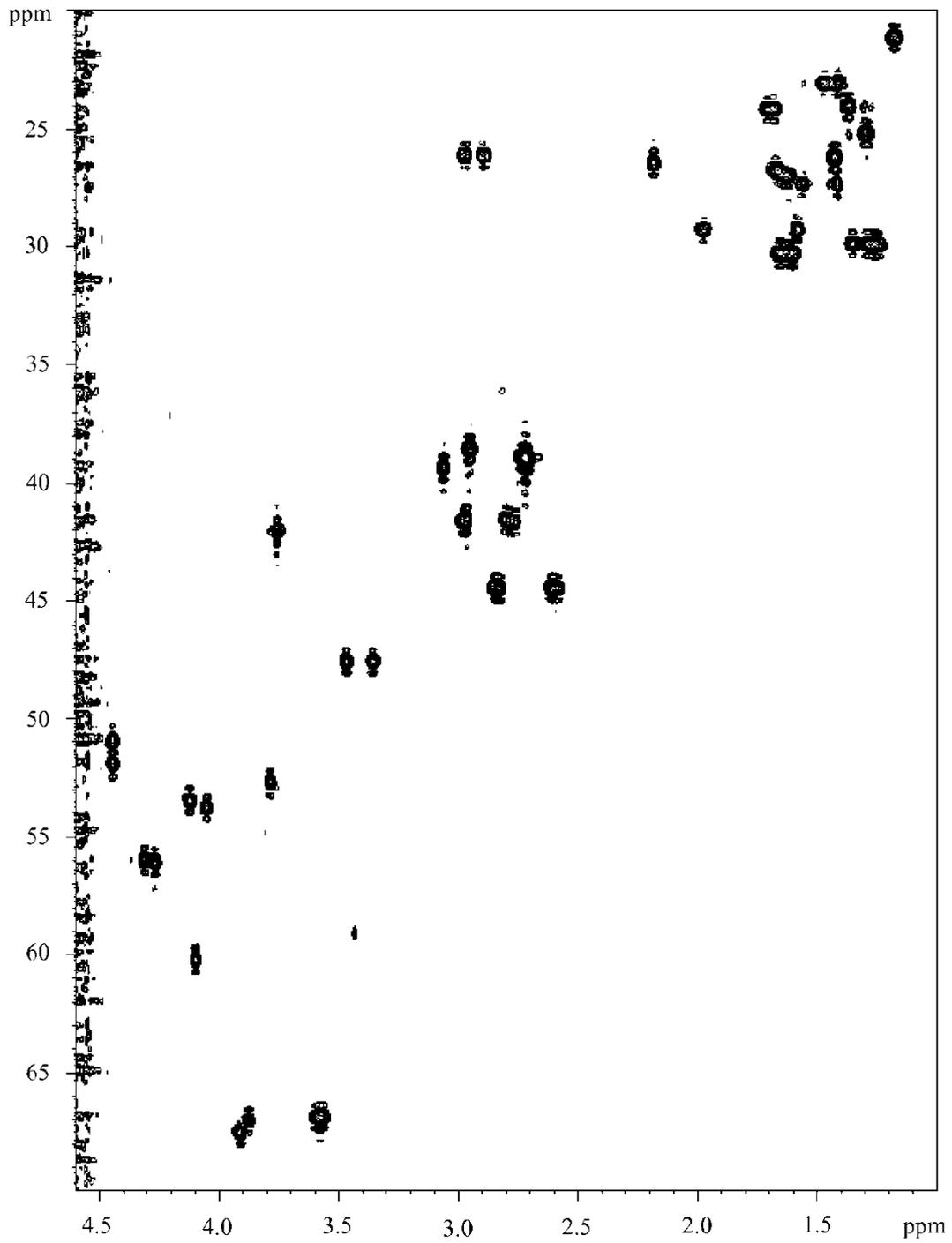


FIG. 2

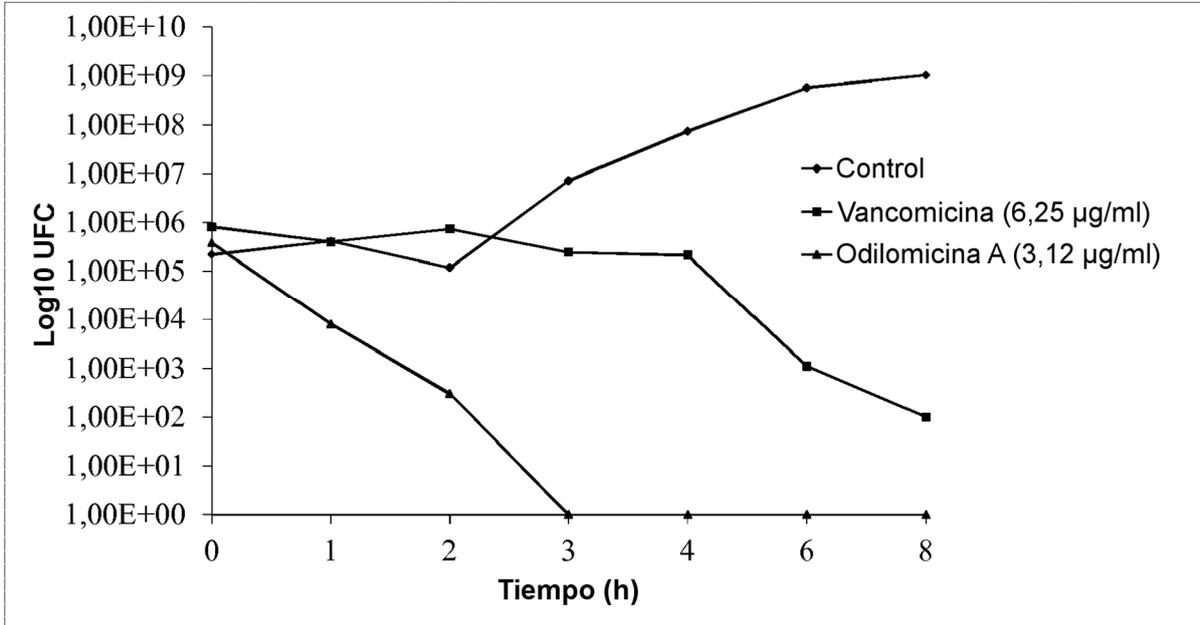


FIG. 3

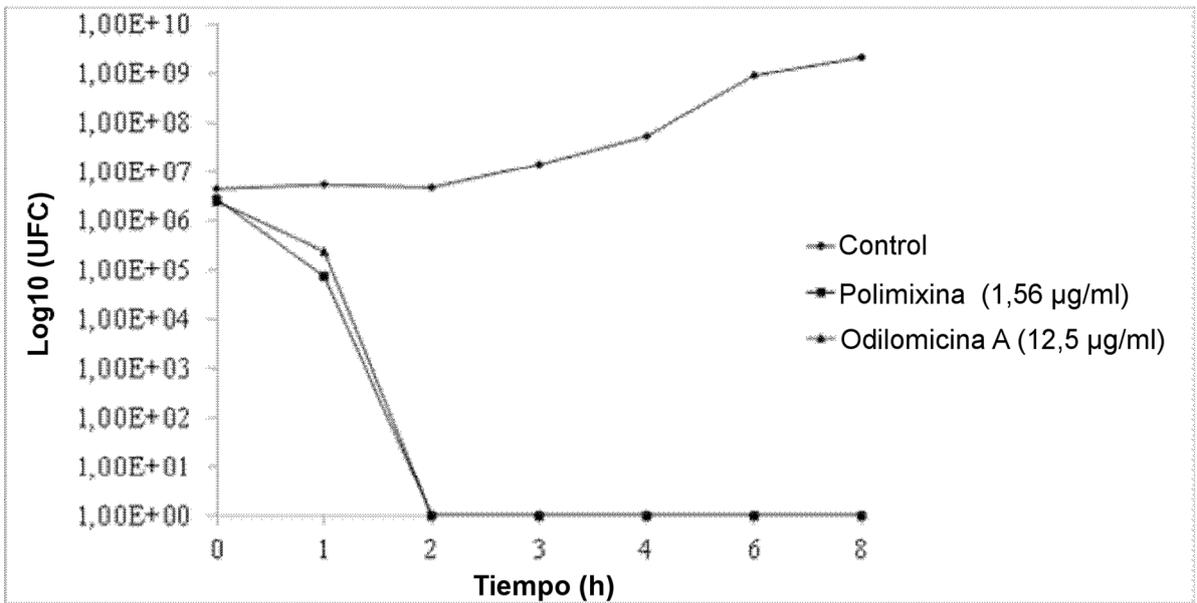


FIG.4