

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 595**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/50**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2015** E 15160285 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** EP 3072899

54 Título: **Nuevo compuesto antiinfeccioso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.09.2018**

73 Titular/es:

**EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN  
(100.0%)  
Geschwister-Scholl-Platz  
72074 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**KRISMER, BERNHARD;  
PESCHEL, ANDREAS;  
GROND, STEPHANIE;  
ZIPPERER, ALEXANDER;  
KONNERTH, MARTIN CHRISTOPH;  
JANEK, DANIELA;  
KALBACHER, HUBERT y  
SCHILLING, NADINE ANNA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones :**

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

**ES 2 682 595 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevo compuesto antiinfeccioso

La invención se refiere a un nuevo compuesto antiinfeccioso, a su uso para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad infecciosa, una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto, y a métodos para producir dichos compuestos.

El control y tratamiento de enfermedades infecciosas es uno de los mayores desafíos de la sociedad moderna. Casi 40.000 hombres, mujeres y niños mueren cada día por enfermedades infecciosas en todo el mundo.

Entre los agentes infecciosos, las bacterias patógenas son más que nunca de alta relevancia. Las infecciones bacterianas se pueden tratar con antibióticos, que tienen la función de matar a las bacterias o prevenir su crecimiento. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos amenaza la prevención y el tratamiento infecciosos de una gama cada vez mayor de bacterias patógenas. La resistencia a los antibióticos está presente en todas partes del mundo. Se considera una amenaza cada vez más grave para la salud pública mundial que requiere medidas en todos los sectores de la ciencia y la sociedad.

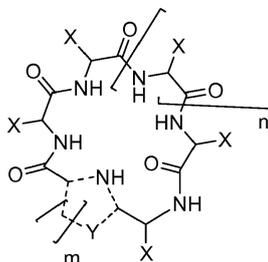
Hay altas proporciones de resistencia a antibióticos en bacterias que causan infecciones comunes en todas las regiones del mundo, por ejemplo, infecciones del tracto urinario, neumonía, infecciones de la corriente sanguínea. Un alto porcentaje de infecciones adquiridas en el hospital son causadas por el llamado *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA). MRSA es una bacteria responsable de varias infecciones difíciles de tratar en humanos. MRSA también se llama *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina (ORSA). MRSA es cualquier cepa de *Staphylococcus aureus* que ha desarrollado, a través del proceso de selección natural, resistencia a los antibióticos betalactámicos, que incluyen las penicilinas, tales como metilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, etc., así como las cefalosporinas. MRSA es especialmente problemático en hospitales, prisiones y hogares de ancianos, donde los pacientes con heridas abiertas, dispositivos invasivos y sistemas inmunes debilitados tienen un riesgo elevado de infección nosocomial en comparación con el público en general. MRSA comenzó como una infección adquirida en el hospital, pero ha desarrollado un estado endémico limitado y ahora se encuentra cada vez más arraigado en la comunidad.

Además de las medidas de prevención, las nuevas formas de tratamiento de MRSA son objeto de una intensa investigación. De acuerdo con un estudio del Hospital Henry Ford, ahora se cree que el fármaco de elección para tratar MRSA es la vancomicina. Sin embargo, varias cepas recientemente descubiertas de MRSA muestran resistencia a antibióticos incluso a la vancomicina, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina (VRSA), así como contra otros antibióticos recientemente desarrollados destinados al tratamiento de MRSA.

El documento DE 10 2005 055 944 divulga derivados de iminopéptidos cíclicos destinados a usarse como agentes antibacterianos. Sin embargo, tales compuestos conocidos hasta ahora no han demostrado su valía en la práctica clínica.

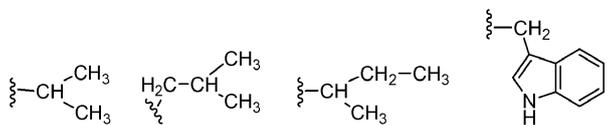
En este contexto, un objetivo subyacente de la invención es proporcionar un nuevo compuesto antiinfeccioso eficaz en el tratamiento de agentes infecciosos que son resistentes a fármacos actualmente disponibles, tales como *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA) o enterococos resistentes a la vancomicina (VRE).

Este objetivo se cumple mediante la provisión de un compuesto que tiene la siguiente fórmula (I):

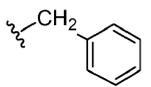


en la que

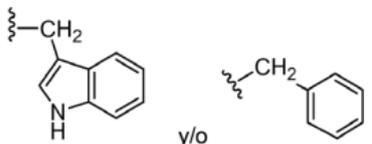
- X se selecciona del grupo que consiste en: H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,



y

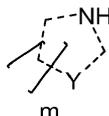


con la condición de que al menos uno y como mucho dos de X sean:



y

- 5 - Y se selecciona del grupo que consiste en O, S y N, con la condición de que



comprende 0, 1 o 2 dobles enlaces,

- m es un número entero entre 1 y 3,

- n es un número entero entre 0 y 4,

- 10 y sus sales, los solvatos de los mismos y los solvatos de las sales de los mismos.

Los inventores lograron aislar un péptido cíclico de la bacteria *Staphylococcus lugdunensis* que se encuentra dentro del alcance de la fórmula (I). Este péptido cíclico exhibe una fuerte actividad contra diversas bacterias patógenas, incluidas *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, *Streptococcus pneumonia*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRE). En otras investigaciones, los inventores fueron capaces de identificar una estructura central representada por la fórmula (I), que es responsable de la actividad antimicrobiana del compuesto aislado.

El nuevo compuesto comprende 5 - 9 aminoácidos en una configuración cíclica. En este "anillo grande" entre los aminoácidos, se prefieren aminoácidos aromáticos e hidrófobos, en los que se requiere al menos un triptófano o fenilalanina. Se prefiere que no se proporcionen más de dos aminoácidos aromáticos.

20 El nuevo compuesto comprende además un "anillo pequeño", es decir, un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros, tal como un anillo de tiazolidina, oxazolidina o imidazolidina. El anillo pequeño no necesita un doble enlace, sin embargo, puede haber uno o dos enlaces dobles en el anillo pequeño.

El compuesto de la invención puede, dependiendo de su estructura específica, existir en formas estereoisoméricas (enantiómeros, diastereómeros). La invención por lo tanto también abarca los enantiómeros o diastereómeros y sus mezclas respectivas. Los constituyentes estereoisoméricamente uniformes se pueden aislar de manera conocida a partir de tales mezclas de enantiómeros y/o diastereómeros. Si el compuesto de la invención puede estar presente en formas tautoméricas, la presente invención abarca todas las formas tautoméricas.

Las sales preferidas para los fines de la presente invención son sales fisiológicamente aceptables del compuesto de la invención. También están comprendidas, sin embargo, las sales que, en sí mismas, no son adecuadas para aplicaciones farmacéuticas, pero pueden usarse, por ejemplo, para el aislamiento o la purificación del compuesto de la invención.

Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I) incluyen sales de bases inorgánicas tales como sales de amonio, sales de metales alcalinos, en particular sales de sodio o potasio, sales de metales alcalinotérreos, en particular sales de magnesio o calcio; sales de bases orgánicas, en particular sales derivadas de ciclohexilamina, bencilamina, octilamina, etanolamina, dietanolamina, dietilamina, trietilamina, etilendiamina, procaína, morfina, pirrolina, piperidina, N-etilpiperidina, N-metilmorfina, piperazina como la base orgánica; o sales con aminoácidos básicos, en particular lisina, arginina, ornitina e histidina.

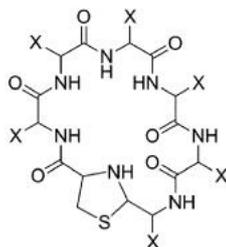
Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I) también incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, fosfatos o fosfonatos; sales de ácidos orgánicos, en particular acetatos, formiatos, propionatos, lactatos, citratos, fumaratos, maleatos, benzoatos, tartratos, malatos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, toluenosulfonatos o bencenosulfonatos; o sales con aminoácidos ácidos, en particular aspartato o glutamato.

Los solvatos para los propósitos de la invención se refieren a aquellas formas del compuesto de la invención, que en estado sólido o líquido forman un complejo por coordinación con moléculas de disolvente. Los hidratos son una forma específica de solvatos en los que la coordinación tiene lugar con agua.

5 El compuesto de la invención también puede complejarse, por ejemplo, con hierro, calcio, etc., en el que el compuesto puede actuar como un ligando, de modo que un complejo correspondiente también es objetivo de la presente invención.

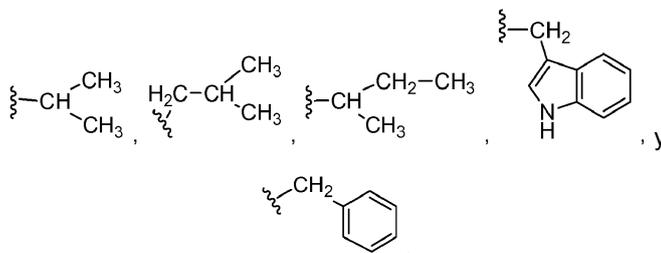
El problema que subyace a la invención queda completamente resuelto.

De acuerdo con otra realización de la invención, el compuesto se caracteriza por la siguiente fórmula (II):

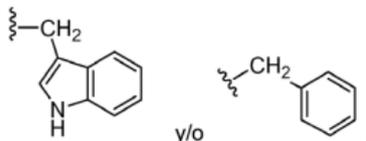


10 en la que

- X se selecciona del grupo que consiste en: H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,



con la condición de que al menos uno y a lo sumo dos de X sean:



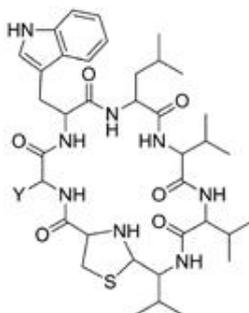
15

y las sales de los mismos, los solvatos de los mismos y los solvatos de las sales de los mismos.

Como pudieron demostrar los inventores, el compuesto de acuerdo con la invención que consiste en 7 aminoácidos que comprenden un anillo grande y un anillo pequeño de tiazolidina tiene actividades antimicrobianas particularmente fuertes.

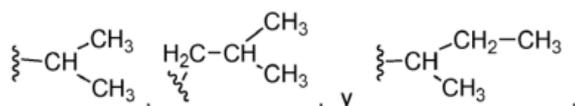
20 Los rasgos, características y ventajas especificadas para el compuesto representado por la fórmula (I) se aplican también al compuesto representado por la fórmula (II).

De acuerdo con otra realización, el compuesto de acuerdo con la invención se caracteriza por la siguiente fórmula (III):



en la que

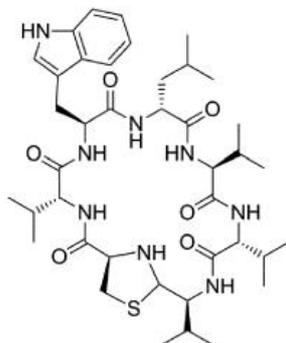
Y se selecciona del grupo que consiste en:



5 Como los inventores pudieron darse cuenta, el compuesto de acuerdo con la invención representado por la estructura del núcleo de fórmula (III) exhibe una actividad antimicrobiana muy alta.

Los rasgos, características y ventajas especificadas para el compuesto representado por las fórmulas (I) y (II) también se aplican al compuesto representado por la fórmula (III).

En otra realización, el compuesto de acuerdo con la invención se caracteriza por la siguiente fórmula (IV):



10 En esta realización, se proporciona el compuesto exacto que fue aislado por los inventores de *Staphylococcus lugdunensis*. Este compuesto se ha usado a manera de ejemplo en las realizaciones para demostrar la actividad antimicrobiana de los compuestos representados por las fórmulas generales (I) - (III). Como ha sido demostrado por los inventores, el compuesto tiene actividad bactericida, por lo tanto, asegura una lucha eficaz contra una infección bacteriana. Este compuesto puede aislarse de *Staphylococcus lugdunensis* mediante métodos bien conocidos de microbiología en combinación con cromatografía química o sintetizarse mediante síntesis de péptidos.

15 Los rasgos, características y ventajas especificadas para el compuesto representado por las fórmulas (I), (II) y (III) también se aplican al compuesto representado por la fórmula (IV).

20 De acuerdo con un desarrollo adicional de la invención, el compuesto de acuerdo con la invención se proporciona para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad, preferiblemente una enfermedad infecciosa, más preferiblemente una enfermedad bacteriana, más preferiblemente una infección por una bacteria Gram positiva, muy preferiblemente una infección por *Staphylococcus aureus*, que incluye especialmente sus formas *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) y resistente a vancomicina (VRSA).

25 Esta medición tiene la ventaja de que se proporciona un compuesto que es eficaz contra una amplia gama de agentes infecciosos y, en particular, contra *Staphylococcus aureus* en su variante de MRSA, que es responsable de varias infecciones graves en humanos.

Debido a sus propiedades farmacológicas, el compuesto de la invención puede usarse solo o en combinación con otros agentes para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades o enfermedades infecciosas, respectivamente, en infecciones particularmente bacterianas.

30 Por ejemplo, pueden tratarse y/o prevenirse las enfermedades locales y/o sistémicas, que son causadas por los siguientes patógenos o por mezclas de los siguientes patógenos:

35 Cocos Gram positivos, tales como Estafilococos (*Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*) y Estreptococos (*Strept. agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Strept. Pneumonia*, *Strept. pyogenes*), bacilos Gram positivos, tales como Bacilo (carbunco), Listeria (monocytogenes) y *Corinebacterium* (difteria), cocos Gram negativos (*Neisseria gonorrhoeae*) y bacilos Gram negativos, como Enterobacteriaceae, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Citrobacter* (*Citrob. freundii*, *Citrob. divernis*), Salmonella y Shigella, además Klebsiella (*Klebs. pneumoniae*, *Klebs. oxytoca*), Enterobacterias (*Ent. aerogenes*, *Pantoea agglomerans*), Hafnia, Serratia (*Serr. marcescens*), Proteus (*Pr. mirabilis*, *Pr. rettgeri*, *Pr. vulgaris*), Providencia, Yersinia, y el género Acinetobacter. Además, el espectro antibacteriano incluye el género de Pseudomonas (*Ps. aeruginosa* y *P. maltophilia*) y bacterias estrictamente anaeróbicas tales como *Bacteroides fragilis*, representantes del género de Peptococcus, Peptostreptococcus y el género Clostridium; también micoplasmas (*M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. urealyticum*) y micobacterias, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*.

La lista anterior de patógenos es meramente ilustrativa y no limitativa.

Las enfermedades causadas por los patógenos mencionados o por infecciones mixtas que se pueden curar, prevenir o atenuar mediante el compuesto de acuerdo con la invención son, por ejemplo:

- 5 Enfermedades infecciosas en humanos tales como infecciones sépticas, infecciones de huesos y articulaciones, infecciones de la piel, infecciones de heridas postoperatorias, abscesos, celulitis, infecciones de heridas, quemaduras infectadas, quemaduras, infecciones de la boca, infecciones después de cirugía dental, artritis séptica, mastitis, amigdalitis, infecciones urogenitales e infecciones oculares.

Particularmente preferido es el uso del compuesto de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la profilaxis de colonización e infecciones nasales.

- 10 De acuerdo con los hallazgos de los inventores, el compuesto se coloca en el entorno natural de acción del péptido cíclico aislado.

Las infecciones bacterianas no solo pueden tratarse o prevenirse en humanos sino también en animales. Los ejemplos son:

- 15 Cerdo: diarrea por coli, enterotoxemia, sepsis, disentería, salmonelosis, síndrome de metritis-mastitis-agalactiae, mastitis;

Rumiantes (bovinos, ovinos, caprinos): diarrea, sepsis, bronconeumonía, salmonelosis, pasteurelisis, micoplasmosis e infecciones genitales;

Caballo: bronconeumonía, infecciones puerperales y post puerperales, salmonelosis;

Perro y gato: bronconeumonía, diarrea, dermatitis, otitis, infecciones del tracto urinario, prostatitis;

- 20 Aves de corral (pollo, pavo, codorniz, palomas, aves de aviario y otros): micoplasmosis, infecciones por *E. coli*, enfermedad crónica de las vías respiratorias, salmonelosis, pasteurelisis, psitacosis.

- 25 De forma similar, las enfermedades bacterianas se pueden tratar en la cría y mantenimiento de peces útiles y ornamentales, pero también en humanos, en los que el espectro antibacteriano de los patógenos mencionados anteriormente se extiende más allá hasta patógenos tales como Pasteurella, Brucella, Campylobacter, Listeria, Erysipelothris, Corynebacteria, Borrelia, Treponema, Nocardia, Rickettsia, Yersinia.

Con el compuesto de acuerdo con la invención, las infecciones bacterianas no solo pueden tratarse o prevenirse en humanos o animales sino también en plantas.

- 30 El compuesto de acuerdo con la invención puede actuar sistémica y/o localmente. Para este fin, se puede administrar de una manera adecuada, tal como oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, dérmica, transdérmica, conjuntival, ótica o asociada con un implante o cánula intraluminal.

Una aplicación tópica es especialmente preferida ya que los inventores demostraron con éxito que el compuesto de acuerdo con la invención es capaz de penetrar áreas de tejido incluso más profundas.

- 35 En este contexto, otro objetivo de la invención es el uso del compuesto de acuerdo con la invención para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad infecciosa, más preferiblemente una enfermedad bacteriana, más preferiblemente una infección por una bacteria Gram positiva, muy preferiblemente una infección por *Staphylococcus aureus*, que incluye su forma resistente a la meticilina (MRSA).

Otro objetivo de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 40 Para este propósito, se entiende que un "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquier excipiente, aditivo o vehículo que se usa típicamente en el campo del tratamiento de enfermedades infecciosas y que simplifica o permite la administración del compuesto de acuerdo con la invención a un ser vivo, y/o mejora su estabilidad y/o actividad. La composición farmacéutica también puede incorporar agentes aglutinantes, agentes diluyentes o lubricantes. La selección de un vehículo farmacéutico u otros aditivos se puede hacer sobre la base de la ruta de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Como portador farmacéuticamente aceptable se pueden usar disolventes, extendedores u otros medios de unión líquidos tales como agentes dispersantes o de suspensión, tensioactivos, agentes isotónicos, esparcidores o emulsionantes, conservantes, agentes de encapsulación, medios de unión de sólidos, dependiendo de cuál es el más adecuado para el régimen de dosis respectivo y también es compatible con el compuesto de acuerdo con la invención. Puede encontrarse una descripción general de tales ingredientes adicionales, por ejemplo, en Rowe (Ed.) et al.: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7ª edición, 45 2012, Pharmaceutical Press.
- 50

De acuerdo con un desarrollo adicional de la invención, la composición farmacéutica se proporciona para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad infecciosa, más preferiblemente una enfermedad bacteriana, más preferiblemente una infección por una bacteria Gram positiva, altamente preferiblemente una infección por *Staphylococcus aureus* incluyendo sus formas resistentes a meticilina (MRSA).

- 5 Los rasgos, características, ventajas y realizaciones del compuesto de acuerdo con la invención también se aplican al uso y a la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la presente invención es un método para producir el compuesto de acuerdo con la invención, que comprende las siguientes etapas: 1. Proporcionar bacterias de la especie de *Staphylococcus lugdunensis*, 2. Purificar el compuesto de acuerdo con la invención de dicha bacteria.

- 10 A continuación, se proporciona un método que los inventores han utilizado para producir o aislar el compuesto de acuerdo con la invención. La especie de *Staphylococcus lugdunensis* a la que se hace referencia en estas realizaciones o en otra parte en la descripción incluye el aislado o cepa IVK28, respectivamente.

- 15 En una realización del método de acuerdo con la invención después de la etapa (1) y antes de la etapa (2), se extraen las bacterias y el medio del cultivo bacteriano y el extracto bacteriano y el medio se someten a la etapa (2) en la que el compuesto se purifica a partir de dicho extracto bacteriano y medio.

Esta medida tiene la ventaja de que solo las fuentes principales del compuesto de acuerdo con la invención se proporcionan a la etapa de purificación a partir de la cual se puede aislar por métodos de microbiología en combinación con cromatografía química, que son bien conocidas por los expertos en la materia.

- 20 En otra realización del método de acuerdo con la invención en la etapa (2), la purificación implica el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para identificar una señal de pico, que está asociada con dicho compuesto.

Esta medida tiene la ventaja de que se usa una herramienta bien establecida de purificación de péptidos, que permite una identificación confiable del compuesto de acuerdo con la invención.

- 25 En otra realización del método de acuerdo con la invención, dicho pico de la señal corresponde a una masa molecular de aprox. 650 Da - 950 Da, preferiblemente de aprox. 700 Da - 850 Da, más preferiblemente de aprox. 750 Da - 800 Da, más preferiblemente de aprox. 770 Da - 790 Da, y muy preferiblemente de aprox. 782,5 Da.

Esta medida tiene la ventaja de que el compuesto de acuerdo con la invención, que se encuentra dentro de los intervalos indicados, se puede identificar fácilmente a través de su masa molecular.

- 30 Otro objetivo de la presente invención es un método para producir el compuesto de acuerdo con la invención, que comprende las siguientes etapas: 1. Expresar el sistema II de péptido sintetasa no ribosómica de la especie de *Staphylococcus lugdunensis* (NRPS-II) en un sistema biológico, 2. Incubar el NRPS-II expresado en condiciones que permitan la síntesis del compuesto de acuerdo con la invención, 3. Purificar dicho compuesto.

- 35 Los inventores pudieron descubrir que el NRPS-II de la especie de *Staphylococcus lugdunensis* es responsable de la síntesis del compuesto de acuerdo con la invención y, por lo tanto, este método hace uso del aparato natural para producir el nuevo compuesto.

- 40 En una realización del método de acuerdo con la invención, dicho NRPS-II está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende cualquiera de las secuencias codificantes de los genes *lugA*, *lugB*, *lugC*, *lugD*, y, opcionalmente, de un regulador transcripcional de la familia GntR, transportador ABC (sistema de transporte multifármaco de tipo GdmF), proteína permeasa del sistema de transporte tipo ABC-2, un transportador ABC, proteína de membrana con hidroxiprolina, regulador de la familia TetR/AcrR, proteína de la familia de la tioesterasa, 4'-fosfopanteteiniltransferasa y regulador negativo put. de sigY (en *Bacillus*).

Los inventores pudieron identificar los genes responsables de la síntesis del compuesto de acuerdo con la invención y los cofactores opcionales y, por lo tanto, proporcionar un método en el que las características esenciales se usan en un sistema artificial de biología molecular para generar los compuestos a gran escala.

- 45 Las secuencias codificantes comprendidas por NRPS-II pueden tomarse de la SEQ ID NO: 1; las posiciones de los nucleótidos se indican a continuación:

*lugA*: 6007-13131

*lugB*: 13121-17341

*lugC*: 17359-26172

- 50 *lugD*: 26893-28632

regulador transcripcional de la familia GntR: 427-936

transportador ABC (sistema de transporte multifármaco tipo GdmF): 1253-2143

proteína permeasa del sistema de transporte de tipo ABC-2: 2140-2904

transportador ABC: 2917-3630

5 proteína de membrana con hidroxiprolina: 3623-5164

regulador de la familia TetR/AcrR: 5409-5981

proteína de la familia de la tioesterasa: 26169-26855

4'-fosfopanteteiniltransferasa: 28640-29293

regulador negativo put. de sigY (en Bacillus): 1027-1266

10 En este contexto, otro objetivo de la presente invención es una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y/o cualquiera de las secuencias de codificación enumeradas anteriormente del sistema II de péptido sintetasa no ribosomal de la especie de *Staphylococcus lugdunensis* (NRPS-II). Los ejemplos de tales moléculas de ácido nucleico incluyen vectores o plásmidos configurados para una expresión controlada de las proteínas codificadas en sistemas de expresión biológicos moleculares comunes. El objeto de la invención es también una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína y/o el péptido idéntico

15 codificado por la molécula de ácido nucleico antes mencionada, pero que tienen una secuencia de nucleótidos modificada o diferente debido a la degeneración del código genético.

Otro objetivo de la invención se refiere a los productos generados por la expresión de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, que incluyen proteínas y/o péptidos codificados por cualquiera de los genes *lugA*, *lugB*, *lugC*, *lugD*, el regulador transcripcional de la familia GntR, el transportador ABC (sistema de transporte multifármaco tipo GdmF), la proteína permeasa del sistema de transporte tipo ABC-2, el transportador ABC, la proteína de membrana con hidroxiprolina, el regulador de la familia TetR/AcrR, proteína de la familia de la tioesterasa, 4'-fosfopanteteiniltransferasa y el regulador negativo put. de sigY (en Bacillus), o codificados por la secuencia de nucleótidos antes mencionada que son en sí mismos un objetivo de la presente invención.

20

25 Un objetivo adicional de la invención se refiere a un anticuerpo dirigido específicamente contra cualquiera de los productos (péptidos, proteínas) generados por la expresión de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

En otra realización del método de acuerdo con la invención, las condiciones que permiten la síntesis del compuesto de acuerdo con la invención comprenden aminoácidos, tioesterasa y regulador.

30 Mediante esta medida, las condiciones se ajustan de forma tal que aseguren un alto rendimiento del compuesto de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la presente invención es un método para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades, especialmente de las enfermedades mencionadas anteriormente, en un ser vivo, tal como un ser humano o un animal, que comprende la administración a dicho ser vivo de una cantidad efectiva del compuesto antibacteriano de acuerdo con la invención.

35

Se debe entender que las características antes mencionadas y las que se mencionarán a continuación no solo pueden usarse en la combinación indicada en el caso respectivo, sino también en otras combinaciones o de forma aislada sin apartarse del alcance de la invención.

40 La invención se explica ahora adicionalmente por medio de realizaciones que dan como resultado rasgos, características y ventajas adicionales de la invención. Las realizaciones son de naturaleza puramente ilustrativa y no limitan el alcance o intervalo de la invención.

Las características mencionadas en las realizaciones específicas son también características de la invención en general, que no solo son aplicables en la realización respectiva sino también de forma aislada en el contexto de cualquier realización de la invención.

45 La invención también se describe y explica con más detalle haciendo referencia a los siguientes dibujos:

La Figura 1 muestra el locus genético requerido para la síntesis de lugdunina y la arquitectura de dominio de péptido sintetasa no ribosomales de *S. lugdunensis* IVK28 con especificidades predichas;

La Figura 2 muestra la identificación del producto del NRPS-II en extractos celulares de *S. lugdunensis* IVK28. (A) Cromatograma de HPLC-UV (UV<sub>210 nm</sub>) de extractos celulares de *S. lugdunensis* de tipo silvestre (azul) y mutante M1 (rojo) (eje x: tiempo [min], adsorción en el eje y a 210 nm [mAU]); (B) HPLC-MS del pico con un tiempo de retención

50

de 10,6 min que da como resultado una masa de 782,5 Da (ESI pos.: m/z 783,6 [M+H]<sup>+</sup>, ESI neg.: m/z 781,5 [MH]<sup>-</sup>, m/z 817,5 [M+Cl]<sup>-</sup>);

5 La Figura 3: muestra que *S. lugdunensis* IVK28 es capaz de eliminar *S. aureus* USA300. *S. aureus* USA300 (negro) y *S. lugdunensis* IVK28 de tipo silvestre (A) o mutante  $\Delta$ *lugD* (B y C) (blanco) se mezclaron en proporciones variables (10:1 (A y B) o 1:10 (C)) y se detectaron en agar BM que contenía 2,2'-bipiridina. Después de los puntos de tiempo indicados, se determinó la proporción de las cepas en la mancha. Las figuras representan la media de tres experimentos;

La Figura 4: muestra (A) los fragmentos de HPLC-MS-MS y (B) la fórmula estructural del péptido cíclico que incorpora el compuesto de acuerdo con la invención ("lugdunina");

10 La Figura 5: muestra que la lugdunina exhibe actividad bactericida contra *S. aureus* USA300. La incubación de *S. aureus* USA300 con 1,5 µg/mL de lugdunina conduce a una disminución de al menos 2 log de las células viables en 6 horas;

15 La Figura 6: muestra que la lugdunina es activa *in vivo* en un modelo de ratón de remoción con cinta. Después de la colonización de la piel de ratón C57BL/6 afeitada con *S. aureus* se aplicó lugdunina de Newman tres veces con pocas horas de diferencia. Después de 45 horas, se sacrificaron los ratones y se determinó el número de bacterias en la superficie de la piel (fracción de lavado) y en el tejido cutáneo más profundo (fracción de raspado). El tratamiento con lugdunina redujo significativamente la carga bacteriana en ambas fracciones, lo que indica su eficacia también *in vivo*. (★ p <0,05);

20 La Figura 7: muestra una prueba de citotoxicidad o la determinación de los posibles efectos citotóxicos sobre los granulocitos neutrófilos dentro de las 3 h de incubación.

La Figura 8: muestra la distribución de la presencia de *S. aureus*, *S. lugdunensis*, y ambos en una muestra de 187 pacientes de riesgo.

#### Realizaciones

25 1. *Staphylococcus lugdunensis* produce un péptido NRPS cíclico antimicrobiano altamente potente con fuerte actividad contra *Staphylococcus aureus*

En hábitats naturales, especialmente en nichos ecológicos pobres en nutrientes como la nariz humana [Krismer et al. (2014) Nutrient limitation governs *Staphylococcus aureus* Metabolism and niche adaptation in the human nose. PLoS Pathog 10: e1003862], se asume una feroz competencia por los nutrientes disponibles entre las bacterias colonizadoras. Los inventores seleccionaron aislados bacterianos de hisopos nasales para la producción de compuestos activos contra *S. aureus*. Además de la actividad contra una gran variedad de diversas bacterias nasales, los inventores identificaron dos cepas con propiedades inhibidoras contra *S. aureus*. Mientras un aislado, que se identificó como *Staphylococcus epidermidis*, exhibió una producción constante de actividad antibacteriana en las condiciones investigadas, el segundo aislado, *Staphylococcus lugdunensis*, mostró su efecto antibacteriano solo en condiciones limitantes del hierro. No se ha descrito aún dicha actividad inhibidora para los estafilococos. Por esta razón, este aislado denominado IVK28 de *S. lugdunensis* fue investigado adicionalmente por los inventores.

#### 2. La organización genética del operón del NRSP de *S. lugdunensis* IVK28

La mutagénesis posterior del transposón de la cepa dio como resultado el mutante M1 negativo para la producción. El análisis del sitio de inserción por PCR inversa dio como resultado la identificación de un gen que codifica un péptido sintetasa no ribosomal (NRPS; posición 860375/76 en la secuencia del genoma anotado de *S. lugdunensis* N920143; acceso No.: FR870271.1) que es parte de el sistema designado NRPS-II. Esto indicó claramente que un péptido pequeño podría exhibir la actividad antibacteriana de *S. lugdunensis* contra *S. aureus*. En el genoma de *S. lugdunensis* se han identificado tres supuestos sistemas NRPS [La secuencia completa del genoma de *Staphylococcus lugdunensis* N920143 se publica en Heilbronner, et al. (2011) Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. FEMS Microbiol Lett 322: 60-67, que se incorpora aquí por referencia]. Aunque NRPS-I exhibe altas homologías con el sistema dipeptídico NRPS de *S. aureus* que codifica aureusimina A y B [Wyatt et al. (2010) *Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence. Science 329: 294-296] [Erratum in Science, 2011 Sep 9; 333 (6048): 1381], y NRPS-III tiene sorprendentes similitudes con los sistemas sideróforos descritos (Heilbronner et al., cit. loc.), no se sabe nada sobre el producto potencial codificado por NRPS-II. La investigación de los genomas publicados de *S. lugdunensis* (secuencias completas de las cepas N920143, HKU09-01 y secuencias parciales de las cepas VCU139 y M235909 (puede determinarse fácilmente con base en la secuencia del genoma de *Staphylococcus lugdunensis* N920143 HKU09-01: entre 864800/864801) mostró que la aplicación de operón de NRPS-II está presente en todas las cepas secuenciadas hasta el momento y, por lo tanto, no representa una característica específica de la cepa. Sin embargo, los genomas publicados contienen varios posibles errores de secuencia o mutaciones reales de desplazamiento de marco, lo que lleva a anotaciones diferentes. Por esta razón, todas las posiciones relevantes, que indican un cambio de marco potencial, se amplificaron por PCR a partir de la cepa IVK28. La posterior secuenciación de los productos de PCR reveló que la secuencia de IVK28 corresponde a la de la cepa

## ES 2 682 595 T3

N920143 y su anotación, a excepción de la posición de nucleótidos anotada 863.515 que se encuentra en el extremo 3' del gen SLUG\_08110. En contraste con N920143, en IVK28 hay un tramo de ocho en lugar de siete nucleótidos de adenosina, lo que conduce a la fusión de los genes SLUG\_08110 y SLUG\_08120 con un marco de lectura abierto.

- 5 La Figura 1 representa la organización genética del operón de NRPS-II de 29,6 kb en *S. lugdunensis* IVK28. Las ubicaciones de las secuencias de codificación se indican en la siguiente información de secuencia del operón de NRPS de *S. lugdunensis* IVK28:

LOCUS	operón de nrp de IVK28	29605 pb	ADN	lineal
CARACTERÍSTICAS	Ubicación/Calificadores			
característica nueva	complemento (427..936) /nota= "regulador transcripcional de la familia GntR"			
característica nueva	1253..2143 /nota= "transportador ABC (sistema de transporte multifármaco de tipo GdmF)"			
característica nueva	2140..2904 /nota= "proteína permeasa del sistema transportador de tipo ABC-2"			
característica nueva	2917..3630 /nota= "transportador ABC"			
característica nueva	3623..5164 /nota= "proteína de membrana con hidroxiprolina"			
característica nueva	5409..5981 /nota= "regulador de la familia TetR/AcrR"			
característica nueva	6007..13131 /nota= "lugA" (corresponde a SLUG_08100 de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> N920143)			
característica nueva	13121..17341 /nota= "lugB" corresponde a la secuencia fusionada de SLUG_08110 y SLUG_08120 (por inserción de un nucleótido adicional) de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> N920143)			
característica nueva	17359..26172 /nota= "lugC" corresponde a SLUG_08130 de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> N920143)			
característica nueva	26169..26855 /nota= "proteína de la familia de la tioesterasa"			
característica nueva	26893..28632 /nota= "lugD" corresponde a SLUG_08150 de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> N920143)			
característica nueva	28640..29293 /nota= "4'-fosfopanteteiniltransferasa"			
característica nueva	1027..1266 /nota= "regulador negativo put. de sigY (en Bacillus)"			
característica nueva	10338..10347 /nota= "sitio de inserción Tn917"			

10 RECUENTO BASE 11616 a 3273 c 4650 g 10066 t

Curiosamente, con solo el 26,7% el contenido de GC del operón de NRPS es significativamente menor que el contenido total de GC del genoma ( 33,8%), indicando la transferencia de genes horizontal desde un organismo extremadamente bajo en GC. El operón contiene cuatro genes consecutivos que codifican proteínas NRPS, interrumpidas por un gen de tioesterasa tipo II entre *lugC* y *lugD*. En la región 5' se codifican dos transportadores ABC y dos genes reguladores potenciales. En el extremo 3' del operón se codifica la 4'-fosfopanteteiniltransferasa. Aunque la actividad antimicrobiana solo pudo detectarse en condiciones limitadas de hierro, no se pudo identificar ninguna caja Fur obvia dentro del operón, lo que indica un efecto más bien indirecto de la falta de hierro en la expresión del operón.

El análisis computacional (predictor NRPS 2, Anti-Smash, HMMER) de las proteínas codificadas por *lugA-D* reveló una arquitectura de dominio poco común, que se muestra en la Figura 1. La mayoría de los sistemas NRPS ensamblan aminoácidos activados de forma lineal hasta la liberación del producto, que generalmente es catalizado por una tioesterasa tipo I. Por el contrario, el operón de *S. lugdunensis* exhibe un dominio de reductasa putativo para la liberación del producto final, codificado al final del *lugC*. Al mismo tiempo, diferente de *LugA-C*, *LugD* carece de un dominio de condensación, que es una característica común para los llamados módulos de iniciación que proporcionan los primeros aminoácidos en algunos sistemas NRPS. La posterior reacción de condensación es luego catalizada por uno de los módulos de elongación.

La predicción de especificidad del dominio de adenilación con el software NRPS predictor2 y Anti-Smash reportó valina y treonina (*LugA*), leucina (*LugB*), valina (*LugC*) y cisteína (*LugD*) como los aminoácidos activados más probables, aunque con diferentes probabilidades (60% para Thr y 100% para Cys).

### 3. Identificación del producto NRPS-II

Ya que la actividad inhibitoria contra *S. aureus* solo fue detectable en placas de agar que contienen 2,2'-bipiridina 200  $\mu$ M, se usaron las mismas condiciones para un intento de extracción del péptido. Después de crecimiento durante 48 horas células de *S. lugdunensis* IVK28 se rasparon del agar y se extrajeron con etanol al 100%. El análisis posterior por HPLC de extractos de la cepa de tipo silvestre y mutante M1 reveló diferencias en solo un pico principal con un tiempo de retención de 10,6 minutos (con una masa molecular de 782,5 Da (Figuras 2A y B). Sorprendentemente, el espectro de absorbancia mostró características de proteínas que contienen triptófano a 280 nm, aunque no se ha predicho ningún aminoácido de este tipo de acuerdo con la organización genética *in silico*. Para confirmar que la ausencia del pico de HPLC respectivo se debe en realidad a la integración del transposón en *lugA* y no a una segunda mutación del sitio no identificada, se construyó una cepa inactivada definida de *lugD* ( $\Delta$ *lugD::erm*). Como se esperaba, el cromatograma de HPLC del mutante  $\Delta$ *lugD* respectivo era casi idéntico al de *S. lugdunensis* M1 y no mostró el pico a 10,6 min. (datos no mostrados). El fenotipo de producción podría restaurarse parcialmente por complementación con el plásmido pRB474-*lugD*.

### 4. *S. lugdunensis* IVK28 es capaz de eliminar *S. aureus* USA300 en experimentos de cocultivo

Para investigar si la expresión del sistema NRPS-II le confiere a *S. lugdunensis* una ventaja competitiva se cocultivaron las cepas IVK28 o  $\Delta$ *lugD::erm* en proporciones variables con *S. aureus* USA300 en placas de agar que contienen 2,2'-bipiridina. Como se muestra en La Figura 3, *S. lugdunensis* IVK28 fue capaz de erradicar completamente *S. aureus* USA300 de la mezcla en 72 horas, incluso con 90% *S. aureus* en las condiciones de partida (A). Por el contrario, *S. lugdunensis*  $\Delta$ *lugD::erm* mutante solo disminuyó ligeramente la relación de *S. aureus* dentro de las primeras 48 horas y posteriormente fue cubierto por *S. aureus* dentro de las 72 horas (B). Aún más, *S. aureus* fue capaz de desplazar al mutante cuando las condiciones de partida contenían 90% de *S. lugdunensis* (C). Estos resultados demuestran claramente la importancia del sistema NRPS-II como un factor de aptitud de *S. lugdunensis* en la lucha contra *S. aureus*. Nótese que los resultados fueron casi idénticos cuando se omitió 2,2'-bipiridina del medio, lo que indica que la limitación del hierro podría no ser la verdadera y única señal inductora, sino más bien un tipo especial de estrés como el contacto estrecho con *S. Aureus*.

### 5. Sobreproducción y purificación del péptido de NRPS-II

De forma interesante, no se pudo detectar actividad antimicrobiana, cuando *S. lugdunensis* IVK28 se cultivó en cultivos líquidos que contenían 2,2'-bipiridina, ni en extractos celulares ni en el sobrenadante del cultivo. Por esta razón, la cepa se modificó genéticamente mediante la sustitución del gen represor de la familia *tetR* secuencia arriba de *lugA* con el sistema regulador de *xylR* inducible por xilosa bien establecido. Esto permitió a los inventores inducir la producción de péptidos mediante la adición de 0,5% de xilosa y en ausencia de bipiridina. La cepa correspondiente  $\Delta$ *tetR::erm/xylR* exhibió una actividad antimicrobiana significativa en el sobrenadante del cultivo después de la adición de xilosa. Mediante extracción con 1-butanol, los inventores pudieron concentrar la actividad antimicrobiana en el disolvente. Después de la evaporación de 1-butanol, resuspensión en metanol al 100% y cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sefadex LH-20, se pudo obtener una fracción activa altamente enriquecida. La purificación final se realizó por HPLC preparativa, dando como resultado el compuesto antimicrobiano puro, que se resolvió y almacenó en DMSO a una concentración de 10 mg/mL a -20°C. El análisis por LC-MS y MS-MS confirmó el peso molecular determinado anteriormente de 782,5 Da con la fórmula elemental  $C_{40}H_{62}N_6O_6S$  (Figura 4).

Se aisló una realización del compuesto de acuerdo con la invención llamada "lugdunina" como un sólido blanco, el espectro de UV apuntaba a un anillo indol y HR-ESI-MS reveló un pico de iones en  $m/z = 783,4581$  ( $[M+H]^+$ ) y fragmentos específicos en HPLC-MS-MS. Los productos de la modificación de Marfey de los estándares de aminoácidos D- y L- y de lugdunina también se sometieron a HPLC-ESI-MS y HPLC-MS-MS. Los aductos y fragmentos de masa revelaron aminoácidos D- y L- correspondientes a tres valinas, leucina/isoleucina, triptófano y un nuevo fragmento para  $C_8H_{15}N_2OS$  asignado a una estructura de anillo de tiazolidina. El espectro de RMN  $^1H$  mostró señales alifáticas características para los protones de valina y señales características para la fracción de triptófano. Los espectros de RMN apuntaban a al menos dos isómeros y conformeros diferentes para lugdunina debido a desplazamientos químicos alterados después de 48 horas en solución. Los experimentos adicionales de RMN bidimensional respaldaron la estructura de lugdunina. Sin embargo, las señales superpuestas no permitieron la determinación completa de la regioquímica por métodos de RMN ni la estereoquímica de los aminoácidos individuales de lugdunina, el orden de los residuos de D-valina y L-valina no es asignable mediante espectroscopía de RMN. Por lo tanto, la lugdunina se asigna al péptido cíclico representado en La Figura 4A y B generado a partir de los 7 aminoácidos y la fórmula empírica  $C_{40}H_{62}N_8O_6S$ .

6. El nuevo compuesto es bactericida y principalmente activo contra bacterias Gram positivas

Para determinar el espectro de actividad, se usó una gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas clínicamente relevantes para la determinación de MIC. Como se muestra en la Tabla 1, se pudo confirmar que, al lado de diversas cepas de *S. aureus*, el nuevo compuesto es activo frente a una amplia gama de bacterias Gram positivas, incluyendo *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, *Streptococcus pneumoniae* y *Listeria monocytogenes* resistentes a la vancomicina (VRE). Las MIC que varían de 1,5 a 12  $\mu g/mL$  (1,9 a 15  $\mu M$ ) subrayan el fuerte potencial antibacteriano de la lugdunina. Curiosamente, la cepa *S. aureus* USA300 MRSA era más susceptible que la cepa de laboratorio RN4220. La cepa productora también mostró actividad contra *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus* y una variedad de otros estafilococos. Ninguna de las bacterias Gram negativas se inhibió significativamente en el rango de concentración investigado (hasta 100  $\mu g/mL$ ).

Tabla 1: Determinación de MIC de lugdunina contra diversas bacterias

Cepa	MIC	Resistencia
<i>Staphylococcus aureus</i> USA 300	1,5 $\mu g/mL$	MRSA
<i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	3 $\mu g/mL$	
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE366	12 $\mu g/ mL$	VRE
<i>Enterococcus faecium</i> BK463	3 $\mu g/ mL$	VRE
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	6 $\mu g/ mL$	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	1,5 $\mu g/ mL$	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	sin inhibición	
<i>Escherichia coli</i> SL01B	sin inhibición	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	sin inhibición	
<i>Enterobacter cloacae</i>	sin inhibición	

Para probar si la actividad es bacteriostática o bactericida, se realizaron ensayos de eliminación con *S. aureus* USA300 y concentraciones de péptido de 1 x MIC (1,5  $\mu g/mL$ ). Como se muestra en la Figura 5, se logró una reducción de células viables de al menos dos unidades logarítmicas dentro de las 6 horas de incubación en PBS, indicando claramente un modo de acción bactericida.

7. El tratamiento tópico con lugdunina es efectivo en un modelo de ratón *in vivo*

Dado que la efectividad de lugdunina podría mostrarse *in vitro*, el siguiente paso fue el desarrollo de un modelo *in vivo*. Para este propósito, se aplicó el denominado modelo de remoción con cinta [Wanke et al., (2013) *Staphylococcus aureus* skin colonization is promoted by barrier disruption and leads to local inflammation. *Exp Dermatol* 22: 153-15]. Para este modelo, se afeitó el lomo de ratones C57BL/6 y se rompió la barrera de la piel mediante un fuerte estiramiento con cinta (7 veces) sin crear heridas. Se aplicó *S. aureus* Newman (inóculo de  $10^7$  ufc en 15  $\mu$ L de solución salina regulada con fosfato (PBS)) sobre la piel maltratada y cubierta por cámaras Finn durante 20 horas para asegurar una colonización eficiente. Debido a su naturaleza hidrófoba, la lugdunina se disolvió en 100% de DMSO a una concentración de 10 mg/mL y posteriormente se diluyó en aceite de sésamo al 100% hasta una concentración final de 100  $\mu$ g/mL. Se aplicaron 15  $\mu$ L de esta preparación de lugdunina a las manchas colonizadas 18, 24 y 42 horas después de la aplicación de *S. aureus*. Para el control solo se aplicó DMSO al 1% en aceite de sésamo. Tres horas después de la aplicación final, se sacrificaron los ratones y se analizaron las biopsias de piel para detectar la presencia de *S. aureus*. Los inventores distinguieron entre la fracción de lavado (bacterias débilmente unidas eliminadas por una etapa de lavado en PBS) y la fracción de raspado (destrucción del material de la piel con escalpelos para liberar bacterias de las áreas profundas de la piel). La Figura 6 muestra claramente la reducción de *S. aureus* por tratamiento con lugdunina después de 45 horas en la fracción de lavado, así como en la fracción de raspado, lo que indica que la lugdunina también está penetrando las áreas más profundas del tejido.

En un experimento preliminar, donde se midió la liberación de lactato-deshidrogenasa de granulocitos neutrófilos, no se pudo observar citotoxicidad significativa dentro de las 3 h de incubación de las células con el péptido, incluso a concentraciones de 50  $\mu$ g/mL que se asemejaban a más de 30 veces MIC para *S. aureus* USA300; véase la Figura 7.

8. La presencia de *S. lugdunensis* en la nariz humana está muy probablemente correlacionada con la ausencia de *S. aureus*

Como una prueba de principio de la influencia de *S. lugdunensis* sobre *S. aureus* se investigó la ocurrencia conjunta de las dos especies en narices humanas. Para esto, se investigaron hisopos nasales de 187 pacientes con riesgo. En total, 61 individuos fueron colonizados con *S. aureus* (32,6%) y 17 con *S. lugdunensis* (9,1%). Ninguna de las especies se encontró en 109 personas (58,2%). De este número, se puede esperar que 2,97% (casi 6 individuos) sean colonizados conjuntamente con *S. aureus* y *S. lugdunensis*. Por el contrario, solo una persona fue identificada como colonizada conjuntamente, lo que es significativamente menor de lo esperado (Figura 8,  $p < 0,05$ ). Esto podría indicar que la presencia *in vivo* de *S. lugdunensis* inhibe la colonización con *S. aureus* por la secreción de lugdunina. De acuerdo con esta suposición, es la detección de la masa de lugdunina (782,4513 Da) en hisopos de extraídos con butanol de portadores de *S. lugdunensis*, pero no de los no portadores (datos no mostrados).

## 9. Resumen

Aquí los inventores describen la elucidación del aislamiento y la estructura del nuevo antibiótico peptídico bactericida lugdunina, que es activo contra *S. aureus* y otras especies bacterianas patógenas. Con base en este péptido, los inventores han desarrollado una estructura central que muestra la actividad observada. El péptido aislado es producido no ribosómicamente por un *Staphylococcus lugdunensis* aislado (cepa IVK28) en el que el correspondiente operón de NRPS está codificado cromosómicamente. Sin embargo, el análisis de la base de datos del genoma y los experimentos de amplificación por PCR con 14 aislados naturales indicaron que el operón está presente en todas las cepas investigadas, aunque no todas exhibieron la actividad antibiótica (datos no mostrados). Excepto por la descripción de la producción de micrococina P1 en la cepa WS2733 de *Staphylococcus equorum* asociada a un solo animal (Carnio et al., (2001) Pyridinyl polythiazole class peptide antibiotic micrococin P1, secreted by foodborne *Staphylococcus equorum* WS2733, is biosynthesized non ribosomally. *Eur J Biochem* 268: 6390-6401), no se conocen péptidos de NRPS para el género *Staphylococcus* que exhiban propiedades antibacterianas. Micrococin P1 se identificó originalmente en *Micrococcus varians* y *Bacillus pumilus*, pero la lugdunina representa el primer producto de NRPS antibacteriano específico del género con una nueva estructura para *Staphylococcus*. Ya que *S. lugdunensis* puede aislarse con frecuencia de la nariz humana, es un competidor potencial de *S. aureus* en este hábitat. Los experimentos de cocultivo del inventor han demostrado claramente que la producción de lugdunina se equipara a *S. lugdunensis* con una gran ventaja en la competencia. Incluso una minoría de células de *S. lugdunensis* IVK28 en las condiciones de partida puede erradicar *S. aureus* del cultivo dentro de las 72 horas. Además, la lugdunina purificada es eficaz en la erradicación de *S. aureus* en un modelo de ratón (modelo de remoción con cinta).

La Lugdunina representa una estructura novedosa y bastante poco común ya que comprende un residuo de triptófano en combinación con tres residuos de valina consecutivos, de los cuales uno es parte de una estructura de anillo de valinilo-tiazolidina. El triptófano y la porción de tiazolidina están flanqueando un cuarto residuo de valina. Se ha encontrado un alto contenido de D-valina y L-valina alternadas en el antibiótico valinomicina de macrolactona, que actúa como un ionóforo, pero no hay similitud estructural con la lugdunina. Se ha descrito una estructura combinada de L-triptófano-tiazol para los inhibidores de síntesis de proteínas A21459 [Ferrari et al., (1996) Antibiotics A21459 A and B, new inhibitors of bacterial protein synthesis. II. Structure elucidation. *J Antibiot* (Tokio) 49: 150-154], Kocurin [Martin et al., (2013) Kocurin, The true structure of PM181104, and anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) thiazolyl peptide from the marine-derived bacterium *Kocuria palustris*. *Mar Drugs* 11:

387-398], o la zelvovamicina que contiene 7-metoxi-triptófano [Tabata N, Tomoda H, Zhang H, Uchida R, Omura S (1999) Zelvovamycin, a new cyclic peptide antibiotic from *Streptomyces* sp. K96-0670. II. Structure Elucidation *J Antibiot* (Tokio) 52: 34-39]. Sin embargo, no existe una similitud adicional entre lugdunina y los antibióticos mencionados, lo que hace que la predicción objetivo para lugdunina sea puramente especulativa. Dado que la lugdunina exhibe actividad bactericida, su modo de acción puede diferir de los otros péptidos descritos, cuya actividad es bacteriostática.

Además del uso del péptido purificado para estrategias de erradicación, también podría ser posible la aplicación preventiva de una cepa productora de lugdunina, por ejemplo, la colonización clara de *S. aureus* en narices humanas.

Una incoherencia aún no resuelta es la presencia de solo cinco dominios de adenilación en los genes de NRPS para la biosíntesis de lugdunina, aunque el antibiótico está compuesto por siete aminoácidos. Una explicación podría ser la estructura de dominio inusual de LugC, que consiste en solo un dominio A específico de valina y un dominio de condensación/epimerización extendido con un dominio de PCP terminal inusual (Figura 1). Dado que los últimos tres aminoácidos de lugdunina son valina (muy probablemente configuración D y L), es tentador especular que este LugC se usa más de una vez en la biosíntesis y puede agregar los tres residuos finales de valina en el crecimiento de la cadena peptídica.

#### Listado de secuencias

<110> Eberhard-Karls-Universität  
 <120> Nuevo compuesto antiinfeccioso  
 <130> 5402P541  
 <160> 1  
 <170> BiSSAP 1.0  
 <210> 1  
 <211> 29605  
 <212> ADN  
 <213> nulo  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..29605  
 <223> /tipo\_mol="ADN" /nota="nrp-operón IVK28" /organismo=Staphylococcus lugdunensis  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 427..936  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 1253..2143  
 <223> /alelo="transportador ABC (sistema de transporte multifármaco tipo GdmF)"  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 2140..2904  
 <223> /alelo="proteína permeasa del sistema de transporte tipo ABC-2 "  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 2917..3630  
 <223> /alelo="transportador ABC"  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 3623..5164  
 <223> /alelo="hyp. proteína de membrana"  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 5409..5981  
 <223> /alelo="TetR/regulador familia AcrR"

ES 2 682 595 T3

- <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 6007..13131  
 <223> /alelo="lugA (corresponde a SLUG\_08100 de Staphylococcus lugdunensis N920143"
- 5 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 13121..17341  
 <223> /alelo="lugB corresponde a la secuencia condensada de SLUG\_08110 and SLUG\_08120 (por inserción de un nucleótido adicional) de Staphylococcus lugdunensis N920143"
- 10 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 17359..26172  
 <223> /alelo="lugC corresponde a SLUG\_08130 de Staphylococcus lugdunensis N920143"
- 15 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 26169..26855  
 <223> /alelo="proteína de la familia de tioesterasa"
- <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 26893..28632  
 <223> /alelo="lugD corresponde a SLUG\_08150 de Staphylococcus lugdunensis N920143"
- 20 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 28640..29293  
 <223> /alelo="4'-fosfopanteteiniltransferasa"
- 25 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 1027..1266  
 <223> /alelo="put. regulador negativo de sigY (en Bacillus)"
- 30 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 10338..10347  
 <223> /alelo="sitio de inserción Tn917"
- 35 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 10338..10347  
 <223> /alelo="sitio de inserción Tn917"

<400>

```

1
aggctcttaa aaagcacgtc gttctccaca attctcaaaa cgtaattgt tggagaagaat      60
atacaaaaca cctcgatatt atgtcgaggt gttttttgtg gaaaaattca gtatatgtg      120
tcttgatatt taaccaatct ttctaggatt aacttgagag gtatatataa aacatattac      180
actatactat tacgaaaaag atttctggag gaactactgt ttgacgtttt aaaactccat      240
ctaacagtct tttaaagaga gatatatgat gtgttcgtat acctattaca aaagtaggaa      300
aatcaaatca tattattaca gtcaatgtgg ccgatgttga ttttggcaat atagtcataa      360
gaaataatca tatgaaccac agtattaata gttttaactt ttgctagtaa agtgaatcaa      420
aattggttat ggaataataa caagtgaat ggttcgctct ttgttattcg tttttgttt      480
ttcattgtaa ttttattaa ttaaacagtt aagatcggac tggaatttt caaattcact      540
gttttctaaa tttagttttg aaatagaaa ggtagcttta tcatccttat taattgttt      600
atgataatth tgataagatt gtaatacata cataaaataa taagtaaca agtctatth      660
tttactgtaa ttcgcttgag tccactctgt tcatcaatt ttatagcctt tagagtttat      720
tgcataatag ttttctcac tagaacgtaa ttttttggtc tttacaatth ttaataattg      780

```

ES 2 682 595 T3

ttcttcaaac atagcattta catgtctata cagtgttgct tgaggcacat cttctaataa 840  
 ttcattgagt tgcataatag aaagtccttc tggtttatcg attaatgtta atgcgatfff 900  
 aaaacgtggt tgatttttaa ataaactgaa ttccatacat aacacctcac tttatacata 960  
 ataattgatt tttaaataaa tgtacagtaa cattatcatt atcaataatg ataatggagg 1020  
 gtgaaaatga atactgatat taacgtctta aaagaaatag actgggggac tattatgcca 1080  
 atattaatac caatattggt tttacatgta gtacttttaa taattgccct aatcgattta 1140  
 tatagacgaa gaaaaattgt taattatcct attgcttggg caatcgcaat tttgttgttt 1200  
 aatactattg gacctattct ttatttgatt attggaagga ggctaataaa aattgatcga 1260  
 gattaagcat gtgaataaaa tgttttagagg aagaaaaata ctgaaaaata tttcttttaa 1320  
 tatttcagag ggagagtgta ttggattatt aggtcctaata ggtgctggga aaacaacatt 1380  
 gattaaatgt attactggaa ttattaatta tgaaaaaggg gaaattaat ttaatggaaa 1440  
 aaatattttg aattttaaaa atgatattgg ttatttatca cagcacacag attttaagca 1500  
 gtggatgact tgtgaagagt cgtaagatt ttttgggtgt ttatcaggtt taataaaaac 1560  
 gtatattgct cagaatatta ataaaact aaaagatgta ggtcttcaga ataaaaataa 1620  
 atataaggta gaagaattat caggagggat gaaacagaga ttaggcatag cacaggctat 1680  
 tttacatcgt ccaaagtfff tggctctaga tgaaccagta tcagctcttg atccagttgg 1740  
 caggaatgaa atcaaaaacc taataaaaaa attgaaaaaa tacacaacag ttcttataatc 1800  
 cacacatatt cttgatgatg caagtgaatt ttgtgatcga tatattatta taaaagatgg 1860  
 agaaatcatc ggaaatataa ccaatgaaga tgagactgtg aattacaaaa gtatatattt 1920  
 aaaaaattct ttaaaagatt cttatgatcc ggatattcaa ttaaccgact tatatgattt 1980  
 acaaaaagta aaagcaggag aatataattgt aaccagtcga aagccaattg aaatatctga 2040  
 gttaattgaa gaactggaca aaattaatat taaagtgaat tcaattgcat atgaaaagaa 2100  
 agatttagag aaaatatttt tagagttggt gtctgatata tgagaaatat attaatftta 2160  
 ggaaaagtgg aattattaga agcagtaagg aacattaat ttatatggtt agcaatattc 2220  
 tttctattc ttggattgac gcaaccttta attgataatt acatggaagt gattattaaa 2280  
 aattttggag gggttgatgg gattattatg gaccctaatt cacctaaacc tcaggctaat 2340  
 gaagttttgt tggcaacggt tactggccaa tttaatcaga tgggtttgat tgtattggtc 2400  
 atcagcttta tgggtatgat agctgatgaa aagaagagtg gagttctggg gtttatattt 2460  
 acaaggccag tatctagtat acaatatatt atttcaaagc tttttggaaa ctggattatt 2520  
 agtatgatat gtatcttgat tgggtctggt gtttcatatt gttatactat ttatctttt 2580  
 gattattatc catttattaa tttttattt tttctcttat tttatagttt gtggattcct 2640  
 tttattgtca gcgtaacgat attattaagt acttttataa aaagctctat ttttataggt 2700

ES 2 682 595 T3

gtgataacta tcgtaataatc aatggatatt atattattgg gcaatattaa taaaacattt	2760
gctttatatt taccaagtgg tgcacttaca ttagctgaaa gccaatcca aatataaat	2820
tctaatttct tattgataat cgcacctggt atttatattg ttgccttagt atatgcatct	2880
aaagtcatta tcaagaaatt ctaaggaggt atagaaatgt tatccattca aaatttaagt	2940
aaaacgtata aaggttctga taaagtggtt aagaatttat cattagaatt atatgaaggt	3000
gatatatgtg cttttattgg agcaaatggg gctgggaaa cgacaacgat taaatcaatt	3060
gttggaatac atacatttga tcatggagaa gtgaaattgt tcaatataaa tctaaaagat	3120
aatccagagt attataaatc tttcattggg tattcaccag atacgcctga tttgtacaat	3180
aatatgacgg ggaaagcata tattgaacta atagcggcgc tttataaaat ggagaacata	3240
gaacttgaag agaattaag ttacctaata aaagaattaa aatttgaaag tgccatttat	3300
gatttggttt ctagttattc tcatggaatg aagcagaggt tagtgcttat ttcattatta	3360
atgcatgac ctaaatat tttttggat gaaccatttg ttggcttgga tccaaatgct	3420
attgattttt tagtgaatga aattagaaga cgagccagtg aaggagcaat tttttatac	3480
tctacacacg tacttgaagt tgctgaaaaa ttatgtaata aacttgttat tttagatcat	3540
ggtaaagctg tagtaaatga tacaatggaa agtattctta aaaagcacc attaaatgaa	3600
atatttaagg atgtgacttc tgatgaataa tcttaaattg ttatttttat ttcgattaaa	3660
aatcaaacg caattatcta atttgaaaag caataataaa gaagtaagaa agcattctat	3720
ttacactatc acaggatata ttactgcatt tataatgttt ttaggatata tagttttcat	3780
tgcaatagat ttaagtttaa ataataatat ccatgaattt tttgtattat taacatccat	3840
tttattttgg ctatttggtat tatggaatat acttagcggg ttcgataatg tcatagaagg	3900
gaaggatggg gaatttattt atagtctgcc aataaaaaac tggcaagcaa aactgtttta	3960
tttattaagt aaatatttga ttcattattc tttgactttt accattttta ttctaagtgt	4020
tgtcttogta atacctttgt tatctcattt attgtcagta attcttatga ttattttatt	4080
aagttttatt gttcctcttc tagctacaaa tatacctttt ataattcca tattagtaag	4140
aatatacta atatttatca agttacgtaa taatataaca gaggcaattt ttacattatt	4200
cgcatttata gctccgtaa tttattttat ctttaactct gaaatgggtg gttataaaga	4260
atggtttata aatacatcta ttttacggta cccgctaac aagatgacta gctctccttt	4320
tttatttaat atgtttttgt taattgttat tacctttatt acaacgttca tagttattta	4380
tatgctgatt aattttcatg attcccttag aaatcaaaca aataagcgaa agaaaaaag	4440
aatggggaat acggtattta aaataaattc accagtatcc agtttaataa taaaggaatt	4500
taaattatat tttcctctt taacttatgt tagtaataca atcataactc cagtagttat	4560

ES 2 682 595 T3

tgttatacta aatataagta ttctaattgg aataataccc agtattgatt caatttctta 4620  
 tgatttacta ggatttacta ttagttctca gcaaataat gtacttattg tctttacttt 4680  
 tgtaattctt actactacaa cttctttagt catttctttt gaaggaaaga gtatttggat 4740  
 tatgttagtg gctcctatta atattaagaa aatagcgatt ggaaaaatat tagttaatat 4800  
 acttttattt ttaccaggta ttgttttaac ttctattgtg ttctatacag tatttcatgc 4860  
 aggtatattt tatttaatta taatcagtac gttgttagta tctaccctca ctttgataag 4920  
 tattattggg tttttagtaa atttacggtt cccatcctat aactggagtt ctgaaatgga 4980  
 agttgttaaa caaagtaaag gaactattgt aactgcaata ataagtatga taattattcc 5040  
 gatagttatt gcatttgttc taataaataa ctcatgtctg actttattgg taatttttat 5100  
 agaaaaggca gtgattataa ttatgtttaa aaaaattaca gcagatagtt taattttaaa 5160  
 ataataaagt atgtaataag aaatacaatg taaatgtagt ataaaatccg caatagaata 5220  
 ttcttattat tagaagatta gttgacaaaa tattttattc tttatcttta gagatgtaat 5280  
 agacacaata aagaaaaatc aatattttaa aaaatattcg cttaatatag ttgacatatt 5340  
 aattaaatag attaaagataa aagtgactag aaaaatttat ttagtcataa atgaataggg 5400  
 gtattaatat ggcattctct aagattgaaa aagaaaatat taagaaaaat ttattagaaa 5460  
 attgtgaaaa gcattgggtca aaatacgggt ataaaaaaaa aaatattaat gacttgtgcc 5520  
 aaatttctcg aatatcaaaa ggttcttttt ataatttttt tgattcgaag gaggcattat 5580  
 tttatgaagt catcataagt gcacacaata agttagttaa aattacagag gacggtttaa 5640  
 aaaaaatgat gactaaatat gattttgcta attttttgaa actggtatat caggaatata 5700  
 caaaaattaga ttttttaaat gagacatcac aacaggattt tatcaaattt ttaaataaac 5760  
 tagatgtaaa aaaacaaaaa aaattaatgg aaaatgtaca ctatgatctt cgtaatgaaa 5820  
 ttaggaaatc aaatttgaaa tataaagttg atgaaaattt agggatttct gccttaggat 5880  
 atatctttac tcctttatca aaagaagagt tagatatata taatgaaaat ggaacaatcg 5940  
 agtttttaat tgacataacc gttgatagga tttttgaata agtttttagtt aaaggaggtc 6000  
 aatcagatgg aattaattaa atcatcctat atgacacaag cttctatgga agaagaacaa 6060  
 ctttatttga tatggaataa atcatctgtg actagatcgt tatatacggg aacatggtgt 6120  
 tttaaattac taattgaatg tgacaaaaat aaacttgtga aagcactttg tcaaattttt 6180  
 gaagaaaatg atattctaaa atcaaatctc atatttataa ataatcgtgt atataaatac 6240  
 gtaaatcata cgaatcctgt tgtgataact gaaaaagtga aagagacaaa tttatatcag 6300  
 tttataaata aatacaaaac ggaagagttt gatttaaata atgacgtcct atgtcagttt 6360  
 tataatttaa tagataatga aatgaatagc acttatctta ttataaacca ccaccacatt 6420  
 gtatcagatg ctcaaacaaa aaatttaata cttcgaaggt taaaagagat actagatcca 6480

ES 2 682 595 T3

agtagggta ctgaaaaaat tcatcatgaa ttatctacta attatcaaga aactttaaag 6540  
 ccattaaaa agctcaaaca agataaatac atacaaaaag cacttgatat acctcgtcgt 6600  
 attaagcctc atagaatttc acaaaactaaa tttactggct atactaagaa tttaaaacta 6660  
 aataatgaaa agttccaaga attagtaaca tattgtaaca taaataaaat ttcaaaatac 6720  
 actttttttc taactacttt ttattacact ttacttcata ttaccgggta ggattatttc 6780  
 agattaggta tacctttctc tactcgaaat aatagtgagg attttaaaaa aatgggatat 6840  
 tttgtgaata tattgccttt atatattcag gatagtattt atgataaag ttatacctgg 6900  
 ttagataggt ttaaacttgt tcaaaaagaa atatttaaaa catttgaata taagaatgca 6960  
 cgttatcggg atttaactac attcctttgat tcgccattaa acagaatgca agatgtagtt 7020  
 tttagctacc aagaaacaga taagaatggt tcggacattt tttatgagat taatacaaat 7080  
 caaacaggag caaagtttga attgactggc aacgttaaag ttttaggaaa tgaagcgttt 7140  
 ttggaaatcg agttctctga tgaatatattt aatgaagaag aatcgaaatt tttgattgat 7200  
 acttataaaa gtataattga taaagcttta aaaggtaatg attttgaaaa tagagggaagt 7260  
 aatgatagct taattcaagg taaaaaagtt agtctagaaa aaaataataa tctttataaa 7320  
 gaatttagaa atatagcatt taacgaaaaa tataagcaca aaatagcaat tatgtcaaaa 7380  
 caatatcaaa ttacttattt cgaattaaat acattggtcg ataaactagt aaatgcaatg 7440  
 ttaaattata aaatttctca ggatgacagg atagctattt ttttagatag aggaattaag 7500  
 aatattgcat taatgatagc tttagctaaa atgaatattc cttttttaca tttaaataat 7560  
 aactatcctg aagaaagaat taaatatatc ttagatgatt ttaatgcaaa atatgttatt 7620  
 acagataatg caaatcattt aaaaataagt gagaaacaaa aagttttaga tagaaattta 7680  
 ttcatttatg ataatttgaa ttacaataaa aactcttgtt ttagggaaga tgaaaactgt 7740  
 ctggagggat tttatacatc tggtaacaact ggttttccta aagtggttaa aataactcat 7800  
 aaaaatgttt tcaattttac ccggaatttt gaagcatatg gtttaaatga taaggatgtc 7860  
 tttactcact gcagttcttt atcatttgat gcttctacat ttgaaatatg gatgtcttta 7920  
 cttaatggat gtagtttatt agtggttccc gatccaataa ttgatattga aaattggaat 7980  
 tttgaggaat tacaattaaa acctactatt tcttttttaa caacatcgtt gttttattct 8040  
 atgattgata atgagtcaat acaattgttc aaagatcata ggaaaatttt tattggtgga 8100  
 gaaaaagctt tagcaaaaaca tattaaaaaa gcaattaaaa acttagagaa tgtagtatt 8160  
 gttaatggtt atggtccaac tgaaaatact acttttacga ctacaatgga atttaataat 8220  
 tcattctttt ctaacgttcc tattggaaaa cctggagtca atgtgaaat cggcgttgta 8280  
 aataaaagaa atatgcttct accacataat tgcaagggcg aaatagtaat tgggtgtgaa 8340

ES 2 682 595 T3

aatcttagtt caggatactt aaatgaaaat attacaaaag aaaaatttgt gacgattgat 8400  
gaagtgactg acaagttata taaaagtggt gatattgggt atatttcaag tgattcaacg 8460  
cttaattata ttagcagaat agatagccaa attaaactga gaggatacag aatagagtta 8520  
tctgagattg aagaaaatct acttaagcat gatttagtgt caaattgtgt tactgaagtt 8580  
atcaataatt tattagtatt agtttatgaa ggtcaactaa agactaataa ggctaagag 8640  
ttttaacta atgtattgcc aaattatatg gtgccaaatc aaattattca taccgataag 8700  
attccattaa cgttaaatgg caaattagat aaatcaatta tagaaaagtt ttatatagaa 8760  
aacagtgata atattccggc cactaaagaa gaaaaaatga ttatggaagt aataaaagat 8820  
gccacgcata gtcaaagtgt tagtacggaa actaatatg atgaaattgg tatagactcc 8880  
attaaatcga tgcaaatgtg ttctaaatta agaaataaag gttataacat tactatgagc 8940  
gaatttatgg actgccaaaa tattaaaagt ttaggagaat tttttaaaaa agaaaataat 9000  
aaagaggtag gccaaaataa tcagatttgg aattcaaatg aacttagtcc aattcagaaa 9060  
tggttttttg aaacacagaa agaagacata tctcattgga atcaaagtgc ttaattgaa 9120  
ttaaaaaaca taaaagaaga aaaggatatt attaattgct taaaacaact tatcgaatta 9180  
caccctatat tgaaatcacg atttatttta gataacggtg tctataggca agtcatagat 9240  
aaaagaaaat atgagataaa ttcagagaaa gtacagagtt taagtgaatt taataactta 9300  
ttaaattatt ggcaatcatc actaaatatt cacaaaggta tatacaatth taaaataata 9360  
tattatcaaa atcaagtata tattcacttt attatacatc atttagtgat tgacggggta 9420  
tcatggagaa ttattttaaa tgatttctct gaattattag aaggtaataa taagtataat 9480  
tatgaatcga gtaactttga tagttgggta aaatatataa aaaattatga agatgggcta 9540  
tcagaaaatt atttttcgga atggaagaat cagattaata ataacaaaaa gtgtaaatat 9600  
aaagatttaa aagattatga catagcattg agtaaaagag aactgaagt tataattcga 9660  
ttcgcgaatc agaagaacca tggaaacatg gaggtgttc ttattgcagt tattgcacat 9720  
actctaagta aaaataatat catacccaa aaatctatth tactattaga aggccatggt 9780  
agacaaaag aaaagaatga gtttattaat acaatgggct ggttcacaaa tatatatcca 9840  
atgaagatag aactaaatga tgatattaaa atatcagctc aaaagatctt ttttaatcaa 9900  
ataaaaatcc ctaataaagg aatcggctat caaagatatt ttgatttgaa tttttgtcat 9960  
gattggagtt ttaacttttt gggatgatag acatttaatg actatcctga gtttaagata 10020  
gtagatattt tttcagaaaa tgacttttct ccaaacagtc aggttttato aaatctgcat 10080  
gtagatgtta ttttaataaa tcaagaatta agtattaaat ttaaataata taaaaacta 10140  
tataatagtt cggattttta aaaagtggaa atggaatttc aagattcact atattgttg 10200  
aaagatgctc aaaatggtca aatatatcca attaatcgaa ctcaagaagc aatgataatg 10260

ES 2 682 595 T3

gattattatc aaaatcccaa aagtggaaat tacattatc aatgggaatc tgaacccaaa 10320  
aacttgaag tagaaaaaat cttaagtgca attagagaat tgcttcgaaa agtagaacct 10380  
ttaaggggtg ttttttctga gatagatgga gaatggtatc agaaggtaa tgaacttgat 10440  
gattttggat taaatcagct tataaaaatt tttgacttta gtaacaatag caactcaaat 10500  
aatcttataa ataatctgct tataagtcaa agacacatac cgtttgatat tcagagagga 10560  
ccattaataa ggtttcttat tgtaaactt gaaaatggtt ataaaataat tatggaaaat 10620  
catcatttaa ttattgatgg ttggagtatg tcaacaatct ttaattattt caataaatta 10680  
tatgataatg ataaaaaact cagagatatt aacattcttc aggatagatt aattagtaat 10740  
actaagccaa aaaatctaga tgagttaa gatatttttg aaaaatatga acctattaac 10800  
ttacctaaga tttctaataga aggtttagag gaagaaacaa tctatataga aaaaagtgat 10860  
aacattata gttttttaga aagtaacagt ttaacaccaa ataattattt tctattactc 10920  
tggctctgga cattgaaata tttatttggg aagaacgata tcttgtttgg agtgacaaca 10980  
tctggtagaa gtaaatttca tagtaatgag atagatggag ttggtatggt tgtaaccact 11040  
ctaccattca gaattgattt tagagattgc caacaataa aagaagattt aattccaata 11100  
attaaagata aatgaattc tatttttaga aatgatttta ttacatggaa agatataata 11160  
atggaatcaa atatagataa tgaattcag attggttatg tatttgaaaa ctatcccaa 11220  
gtacaacaa atggaatttt ttcatttgat acttcaaaag gacatgaaca ggtaattttt 11280  
ttgttgcat tatctgtgat tgatagaaa cataattata aatagatat aaaattagat 11340  
gagaagtttg ttaataaaga catgttgcag agctgtaaaa tattgcttaa acaaattaat 11400  
ctgtttttag aaaatcagat taatgaagtg agtgaaattt caaataaatt acttagcaat 11460  
acttcaactt atccgcaagt aagggttatt acggaaatta atgagactgt ttcgagtga 11520  
ttaatacaac agttttttaa atataataat aaattgttga taaaagcaa agaaaaagaa 11580  
tacacctata atgatgata caatattggt cgaaatatta ttaatcgtac tgaactatca 11640  
gatagtgatg tagttgcggt gatgacaaaa gatagaacaa aatgacttt atagcaatt 11700  
gcatgtttca tatccgagc aacttatata cctataacag aggaaattaa taaaaataga 11760  
attgaaatga tgattaataa tgccggagta aattgttgt ttaatggcga tggttccttt 11820  
agtcgattgg aaggacttc aacaacttca cttgatgata tagcttatat cattataca 11880  
tcaggatcgt ctggggatcc aaaaggagta aaagtttcaa agtataatct tactaacctc 11940  
ttaaagcat tggttaggga acatatagct aacgagtcag atatttggt tcaaaatata 12000  
gtgatgaatt ttgatccatc catattcgat cttctaagc ctattattag tggatgttct 12060  
atgtatattc ctgagaaaag attatagct actgaaatcg aatattgct cgaaaaagag 12120

ES 2 682 595 T3

aaaattacaa ttttttcgat gactccttcg cttgctaaaa atttagaact gaaaaataat 12180  
 agcagtttga gggtaatgat tataggtgga gaaaaattaa ctaaaaatga tattgaaaat 12240  
 ttacccaaaa aaatagaaat aattaatatg tatgggtccaa cggagtcaac tattatttcg 12300  
 aatatgtttc gaataaacag cgaaaatata aatgattatc tccattatcc aataggcaaa 12360  
 cctataagta gtttgaatgg ctttacaata tcaccogata aacaaatact gccgtttgga 12420  
 gttgtaggag aatatgtggt aaaaggttct acagttactc aagggtatac agataaacat 12480  
 ttaaatagta atttctgat tgaaaataac aggaaaaatc attttaatac aaaagacctt 12540  
 gtttatattc aatcaaatga tctaaccat tatattaatc ggttagataa tcaaatataa 12600  
 cttaggggtt atagaattga gctaggagat atagaatcag cgtaaataa gataatgcct 12660  
 agtaactcct ataaattgat ttttagtaat aataaggatt taattttagc ttatactgcg 12720  
 aactacaatg aggaagaaat acacgtatct ttgaagagaa atttacctag ttatgccgtt 12780  
 cctaatttca tcaaatatat cgaagatctt ccgataacaa ttaatgggaa aatagatttc 12840  
 aaagaaattg aaagtatagt aaaaagagag ttgaatttta atatcgatat caatcaatat 12900  
 aatgacgata ttttgaatt tttaacacta tgctctgata cattggaaat agggaaaatc 12960  
 gatttaaattg ataatttctt cagtgttggg ggtgattcaa ttaaaggat gaagctgatt 13020  
 agagcattaa ataggaata tggagttgaa atgaaaataa aggaattggt taaagccagt 13080  
 aactttagcg aaatttattt actattaagg agggataaaa gtggtaaata aactttatga 13140  
 attgagtcca cagcagaaag gtatttggtc aagaatccaa caatatagag aaaataatga 13200  
 atacctaat cctttagtca ttcaacttga tgaaggtata aaaaaagaag atgttgaatc 13260  
 agcaactaat gaaattatta aaagtaattc tgctttaagg gtagaaataa tgatggggaa 13320  
 attcccgaaa caattgattc atgaaaaagt aaatattgaa ttaagaaata taaatttaat 13380  
 agataatgaa aatgattttg aatatcaaat aaaaaatat atcgaagaac caatgtctct 13440  
 ataccacaaa ttatgcgatt ttaaattatt tcaacataag aaaaaaaact ttctagtttg 13500  
 taaattccat cacattattt tcgatggtca ttcaggaaaa atatttaaag aagaattaga 13560  
 aaggcaactg tcttttaaaa aaaatatatg tataaaaaat aacacttttt atgagagcta 13620  
 tttaaataaa gcatgtgatc aaattgtttt ggaggaagat aaaaaatatt ggaacaagat 13680  
 ttttaatagt gagattgatg attatttcat gattaataat aaagaaggaa acgaaaggat 13740  
 tgaatatgag aatgaactaa gtgtaagttt aaataattta aaagagcatt cacatcaact 13800  
 aaaacaaagt ttattttcaa cactcttagg tttatttctg ctctatgcat ctaaactttt 13860  
 taataaagaa acattgtcta tcgcaatacc tgtctcttct agacgttcgg aacaagatta 13920  
 taaaactata ggggtacatta cgcaggtatt tccccatgta atgaaggtgg agaaacagaa 13980  
 aaattatgaa gatttacaag aatattctaa tcaattgctt tatgaacttt tagagcattc 14040

ES 2 682 595 T3

tgatctttca attattgaat tatctaattt aagcaaaagt gcttccaaga atattgagga	14100
ctattataaa tgtatatttg atattgtcga agaagaatcc tatttagata ataaagtaag	14160
aatgtggaat ttacaatcag agtaccocatg gatagttaaa gttatcatta gagatcagca	14220
agtgtttttg aattccaatt ttaaaaaaga acttttccca ttttggaga ttagggattt	14280
tcatgaagga ttttaacttct ttattaacaa tattattagt gaatctggaa gttattttaa	14340
aaaaaatggt ggtatgcca taaaagaatt aaataaaatt ataaatataa gtaactttgc	14400
agcttctaaa aaagacatta attataataa atcgaaatta gacgtaaaaa ccttaatgta	14460
taatacggcg ataataagtg gaagcgaaaa aatttcttat aaacaattag aagaagattc	14520
aatcaaattt tctggattta ttaggaatag gaatttgaaa gtgggggcaa aatgcctcgt	14580
ttatatgaat gatactcttg aagctgtag aattttctat tgcttacaga aaaacaattg	14640
ttgttttata ccggtttcta atgacacacc tttaaataga gttaagctta taattgaaga	14700
atcaaaccgc ctccttattt tttcagacat tttagatgga agtgaaacag ataaaaatatt	14760
agtgagtaaa ttaataaaat gtcattggtt gagcccaaac acaataatta gaggtactga	14820
tgagaactat tcacctggca catcatatat tatatttact tctggatcaa ctgataagcc	14880
gaaaggtgta atgattactt ataagaattt gtctggatta attactcaat acaaaagttt	14940
atgtgatatt caaaaaggag atagagttgc tcaaatagcc agtttgaatt ttgatgctag	15000
tatatttgaa atgacattag cttttcaac attttctgta ttgattatct ttaacaataa	15060
tggaggttat gagaacttca atcagtttat tatagataat agtattacc attttttaat	15120
gacacctgat tattatgctc tactagactt tagtaaatgt aattcattaa aaaatataat	15180
tgttggtgga gatgaattta agtttaatga tactgtacct gaaaatgtta agatatttaa	15240
tgcctatgga ccaactgaat caacagttat gtgtttaata aagttaatga caaaaaaagt	15300
aaaaacctca aacttaggta aaccaatatt aaactcagga gttattttat taaacaataa	15360
tggagagata ataaatcgtc atgttgcgg tgaaattgt attactggac aatcagtatt	15420
tcttggttat ttagacaaaa ataaaaatta taagctagaa aaaataacat tgaataatga	15480
ggactataca atataccgta ctggagattt agcttattat gatgaaaatt atgatataca	15540
cttctttagc aggagttcca attttgtgaa gataagaggt tatagaataa atcctaataa	15600
agtaacttct gcaataataa atcttcgtga agttaataat gcagttacac tggattaaa	15660
tggacaactc atagcttatt atattggaga tgtagatgag attgaaataa gaaaaaaat	15720
aaaaaacatt cttccaaatt atatggttcc aacaactatt cataagctag atgcatttcc	15780
tatgacaatt aatgggaaaa tagatagtaa aaagttgaaa gaaataaaca ctgaaaaatg	15840
tagtctaaat agttatgaaa caaccgatag tagggatata ggatttatga atattgttat	15900

ES 2 682 595 T3

gaaagtgttt caaaataaaa aactaagtaa aaatgataac ttttatgatg ttggtgggga 15960  
ttctattttg agtattaaac ttgccagtga attacaggat aatggattta atatttcttc 16020  
agtagaaata atgaagtcaa atgattttta tgaattatth caaaaaata tacaacataa 16080  
ttcaaaattt aatcaagatc ctgtttttgg aaaaatcaat ttattcccaa tgcagaaatg 16140  
gtttttttct caagaatttc ataattttca tcattggaat caatcaaatg aatttgaaat 16200  
atttgggtcaa ttcgatgaat tagattttca aacaatttat tattcaatta gggagaaaca 16260  
cgtatgcaatt aggagtattt ttcaaagaat taatatggaa tattgctggt tggttaaaga 16320  
aaataattta gaggattcaa aaaaagaaat tcaatatggt gatagcagtc attttaatat 16380  
taataacata aatgaattaa aaagaaacct tcacaaaaca ataaatattt ttgatggacc 16440  
attatctgca ataaagatta tcaaaataaa tgaaacgcat ttaaggtgc tgtgggttat 16500  
gcatcattta atatgtgata acattagctg gtttaattta aaaagggtt tcatacgtgc 16560  
aattaattgc ttgaacaata ataagaaat aactttatat cccaaatctt cgagtataga 16620  
agattgggga aaatatataa taaaacagcc tcggttttca aatgatataa attcaataa 16680  
aaattcatca aaacacaaat atgaaactaa aaaaataaat attgtagaag atgattataa 16740  
aaaagttaaa gaatattatc aaaaacataa ttgtctgaa gaaaatttcc tattattact 16800  
ttttgcaaag gtactgagtg aacaaatggg aagagaaaag attttgatta ataaagaatt 16860  
aagtggcaga aattatttgc cagaaaaata ttctcttgat caaactgtcg gttggtttac 16920  
aaaaacttgt cctgttgaag tagattgtac tgtaccttat aaaagctttg tatctacaaa 16980  
tatctttaac attgaaaagc aaacaagttt ttttaatgaa tatttttttt cacaacctgt 17040  
tagtggaccg gaaatatcat ttaacttttt aggcgaatta tcaaaagagt tagatgtaaa 17100  
tgccatgcaa tcattcaatg atatagtgga gtatgatttt ccggacaaaa tagcttttaa 17160  
tgtattaaag agagaaaatg aatattcagt gtttattatt tatcaaagtg acatgtttca 17220  
atattttgaa aaaataagtg agaatttatc aagcttgata aatcttttaa ctaaaatgga 17280  
gagacagaat gtattcggta tctctgaaga ttctttgaaa gttttaagcg atttatttta 17340  
aaagaatggg gtgttaatat gaaagctata gctgcatatc ctatgactga agtgcaaaaa 17400  
ggaatagcgt atgaatgtta tttaaataaa gacagagaat tttatattag tcaaatgaca 17460  
atagagcttt actatgaaaa tatagagatt tataaagctg cttgggaaaa aattattgac 17520  
aaatatgaaa ccttcaaaac ggcattttat tttggagaaa tgaaagatga tgttcaggta 17580  
gttaataatc atattgattt caaatgggaa gtgttaactg attacaatgg tagtatagaa 17640  
agtattgaag aaaaagaaag aaaaagatta tcagatataa agaaaccac acttattcgt 17700  
tttaaacata ttaataataa tcagaaaaac tatttgatta ttactttcca tcatattatt 17760  
ttagatggat ggagtttgtc tatagtcttg aatgatgtga atagacttta ttatcaatta 17820

ES 2 682 595 T3

ttaaataag	aaaatcata	tatttataat	aatactgaat	tcagtgaatt	tattcaaaat	17880
aaattaactg	ctaacaatga	aaaatogaat	caatattttc	aaaatttact	tactgatttt	17940
cctggattta	gtttcccttc	tcttacacca	atagaaaaag	aaggttttga	aacaataaat	18000
aaaatactca	ctctagatat	gaaagtcatt	aagaattttt	gcaagaaata	taaaatttcg	18060
ctatcttcac	tttttagctc	agtttggctc	ttagttgtct	cagcttatac	aggtaaaagt	18120
gatattttac	tgaataaaac	gcattctgga	cgggatagca	aaaaaaaaga	acaattggt	18180
gggttactta	ttgaaaatta	cccgtcacga	tataaaattt	acgatgatga	gattcttaca	18240
gatttcattg	aaaataatca	tattactgat	attgaaacaa	gagaaaagca	agaattttca	18300
atgtacccaa	caaaaaaata	tttatcagat	attgggggta	atgaatacac	aaattgtgct	18360
ttgtatatg	aaaactatcc	cgtaaatgaa	agtaaactct	ataaaatatt	aaacacattt	18420
gaaaagcagt	caagcgaatt	aactttatct	gctggagtaa	tgaatgatca	agttttagta	18480
aaaatgatgt	tttcattaga	attaataaac	aaagatatag	catcggcctt	aatagaatcc	18540
tatacagttt	tgtaagcga	agttttaaaa	gatgagaaac	aaactatcag	tgaagtgatt	18600
aataaaaatta	gattaagtaa	ggctttcgga	gaggacttcc	ctgtccctaa	agatattcca	18660
ttaataactc	atattgagga	gagagtgcaa	gggaaaaatg	ataacattgc	attttactat	18720
aacgataatg	aaataaacta	taatacttta	attaatgaga	caaaaagata	ttcatcctta	18780
ttaaacgatt	tagagctttc	ctatggagaa	acagttgcta	ttgattgtga	tagagctccg	18840
tatgcaatat	gtttaatgct	tgcattagaa	cagcatggca	ttccatttgt	atatttagat	18900
tccaaaaata	ctagtggag	aaatcgattt	atacttaatg	attcaaatgc	atcttatctt	18960
ttctatgata	aaaaaaagcc	ggaatatata	agtgatatta	aaattcgggg	aataagtatt	19020
agcagtaaaa	atcattcaa	ctttaaaggg	tctaacgagt	atgtgacaaa	aaacaaaaga	19080
gaagattatt	ttcaaataat	atatacatct	ggtactacgg	gcaaccctaa	aggaataaaa	19140
ataactacga	acaatatctt	tgcttgtca	atcaataatg	gattttacga	tgtaaaagaa	19200
ggagatattt	ttactcaagc	ttcttcatta	gcatttgatg	catgcttttt	tgaaatttgg	19260
ttaccctttt	taaataatgg	gtcaattgct	tttattccgg	atccagtttt	tgatgtacta	19320
agctggaaa	aagtgctgaa	taaatataat	attacggcct	cttgggttac	ttcgagctta	19380
ttaaatagtat	ttattgatct	agatccgtat	ttattttcaa	aaataagtaa	tgtatttggt	19440
ggtggtgaag	cactctcaag	agggcatggt	ttgaaagccc	tttcagttaa	ccctaatact	19500
aattttttta	atggctatgg	accgacagaa	aatacaacat	ttactacgac	atataagata	19560
ccaacagatt	atagtgaaag	atcagcaatt	tcaattggaa	gcttattagc	taattcagaa	19620
gcggttggtg	ttgatgattc	taatcgaatt	gtaccgatat	attctcaagg	agagctattg	19680

ES 2 682 595 T3

gttcgtggga aagggttattc aaaaggttat gtggaaaaca aagttaatga taataaaaac 19740  
 ttcttagtag aaattaatga gcaaacttat tacagaacag gtgacattgt aagctttgat 19800  
 ggccagcgat tccattatat tgatagaaaa gatagccaag taaaaattaa tgggtatagg 19860  
 gtagaagtat tagagattga aaatagaatc aaagagataa ttggagtcaa aaatgcaaaa 19920  
 gttatgattg gagaagataa actgattact cttttttata caggtggtat ttcaaaaaga 19980  
 gaattaaaga gtactttagc taacaagtcc cctagttata tgaatcctaa acttgatatat 20040  
 cagataaaga ccatgcctct aactcttaac ggaaaaattg ataaagataa acttttaact 20100  
 ataaagaatg ataatggcca agaaaattta tctgaaataa aagttgtggc tccaaaattg 20160  
 agtगतatta ttttaaaata tacagattct aaaaatatag aaagtगतgc tagctttcat 20220  
 gatttgggta ttgattccat gaaaacaatc agattgaata aagaattaa caaaattttt 20280  
 aatttggag tatcattaa agagtttggt cagtttaaaa caattaatga tgttcaagag 20340  
 tattatatgt acgatattga aaatgaattc aagcaatcaa acggcaataa tttaggtttt 20400  
 gcaacaaaaca tgcaaaagtc catgtactat taccaattag agcatccgga aaatacaatg 20460  
 tttaatattc cttatgtag aaaaattcctt aaaacagata tgaaagtctc agatttaaat 20520  
 aataaagtaa aacaagtaat aggtगतcac aatatattta actcagcact tattgaagat 20580  
 aaaaaatagcg atttaatatg ggtaactcaa aagaaaaatt ttgगतaga acatattttt 20640  
 gtgccgggac aattcgataa gaataaaatt ataacttatt taaatcattc attcaattta 20700  
 agtगतggct tagaaccttt aataaaagta actttaattg aagaaaaaag ctatatttat 20760  
 ttaatttttg tagttcacca tattatattt gatgगतct ctctggagaa atttatctct 20820  
 atगतattcg acगतgaaca tttगacaat actaataact actttcaata tttगतtaca 20880  
 aaacaगतg aaaaaaagta taaaaagगत aaagaatttt ggगतgaaaa agtagttaat 20940  
 atगतgaatt atttgcgctt ttataaaaag gaatttaatc atcaaggaga aatgcaatat 21000  
 tttगतattc cagaagaatt aggcगतact atagaattgt tctcacaaaa aaataatata 21060  
 tcaaaattta atctttgctt gaagttatat agtcaattct tattaaacta ttttaatgaa 21120  
 गतगतगत atgttggaac tccattaaat aagगगcgg aagaatataa aaatacगत 21180  
 ggtttattta tagaattttt gcctगतcttg gataaaaaaa gtaacatcaa tacattttaa 21240  
 gaगतगतac aaaactttta attगaaacta ttगतttat atगतcatag तगतatगaa 21300  
 tttcगगता taaataacat acaगcaaca agaaataatt acगacctat aacacaaaaca 21360  
 acttttgcta tgcaaaacttt ttctgaaaaa catगcaatg aattctatga तगतctaatt 21420  
 ataaaaaatc acaaaactc acगtttcca ttatcattaa ctatttatga atttacaat 21480  
 तgtttgaagt tacaagttga ttatगतact gaattgttta ctगccaaga aattaaatct 21540  
 ctतगतatt tattcttaat atggtcaaaa गगगतattac ttaaatcaga catttगतta 21600

ES 2 682 595 T3

tcagatataa ttattagaga aactaaaaaa gaaataatac cattacctac tgaaaatcaa	21660
gaagaattta ggtttgaaca aataatata ttagtaaatg aaaataatta cgatatacag	21720
atattagatg aaaattcaaa tgaaatacct gaaaatgaaa tagctaagt atttttaata	21780
aaataaaag tagaaagttc taatcaaaaa atgactgaaa atattaataa agttcataaa	21840
tgctgtttt cagactcaag agatttaa ataatcaatg taaatacaag gctaaaggga	21900
tttaaagtg gagaatcaat atttataaaa gataatgacg atcaaacatt taaagatata	21960
attccgttt taaattgtaa tatgaagaaa aataatgtaa atgaaagtag ttttaaatta	22020
aatgagctaa ttctgagtga tgtaaagaa gcatttaaaa aggtatttaa gattaaaaat	22080
ataaataatg atgattcatt tcttaaatta ggtggggatt caatcaagaa tatccagatt	22140
atctcagcct taaggaagaa aaattacgtt ttatctacaa atgatttatt aaataatcca	22200
agtgtttccc tcttaacgaa gcatttacag aaaaacataa aaaataataa tatggcgggt	22260
aattataaat atctacaaaa attcaaattg aatataatgc agcaatgggt catgaaaaaa	22320
gataaaaaga attttcatca ttttaaccaa tcattttttg aaaacatcaa tattgatgta	22380
actaaagatg aattattaaa agcttttaaa tctctgtatt catcacatgc aatggtgctg	22440
gctgtaattc tagaagagag aggagaatta ttaattata ttcaggaaat tgaaaattta	22500
aaatatgagc aaatatttat tgaatgtaag aacgaaaagg aattctataa taaagctaaa	22560
caagctgact tttcactgga tatatacaat ggaccaacat caaaaatatt atattttttt	22620
aataatcaaa agaattgtgt aggtgtttat tttgtttgtc atcatatggt tgttgatata	22680
ttttcaataa atataattag aaatgaaatt aatgattttt tattgtatac aaagagagca	22740
acaggagata tttctaatac tgaacttttg aataaaaaaa tacaaaacct acctagtatt	22800
aataccataa caaatcagaa gaatttaatt tattcttcaa aatcaggagt aatttcaagg	22860
aatatttcga tagaaaatag caaatattca caagtgaatt ttcctaaaat acttgcaagc	22920
agtattatta aagaaatttt gactgatgag tctttgaaac ttgacattgc tgttgaaaag	22980
gattcaagac tttcagaatc tttaaaagat ttaaatctat ccgatactgt tgggtggtac	23040
actgaaatat ataatttaga tatacaacca gctatttcag tggagaagt atacttaata	23100
ttgcaaaaag aaagtgatta taaatttcat cataagatta atagccaagt atttttaaat	23160
gttgtaaatc ttgaagaagc ccatgaatat aatgaatttt ttatatttga agaaatcaa	23220
tcaattgctg aagaaaatat acaatcaatg ccgccaacaa taaatattat taagcagggc	23280
tcgaacttga tggtagcgt aatgaatc aaaaactgtg aagaacatct tttaaatgcg	23340
attcatgaat ttaattgtta tattcaaaat gtaaattatt taaggtattt tgctgattta	23400
aaagtaattg gtaaccaat tatccctttt aaagagtatg ctgaactaat taatcaaaaa	23460

ES 2 682 595 T3

gaaattgaag aaatatatcc tttgtttcca ttacaagaag aaatgctgta ttcattctgtt 23520  
ggagattatt cacaaagtta tattaatgaa atttcttgga ccactaaaac taatatgtct 23580  
gatattatag agtctttttc caaagttcac cgaaaatatac aagctttgag aactaagttt 23640  
tggatttcag ataatggctc agtgtatcag gtaattaa gttcttttga tgagttaccg 23700  
attaaatta tagatttaaa atatgtagat tcgaatgaga taattgagaa gatgaatgaa 23760  
attaaagaaa gaatcattgg aaaattaaga gactttaaaa atgggtgtaac tcattatctt 23820  
ttaatcataa ctactccaaa taataataaa agaattgttt ggttattcaa tcatatttta 23880  
ttcgatgggt ggagttttatc gattcttatt aatgaaatgt ggaataaaaa gactatactt 23940  
ggaatcaatg aagtttcaaa cagggactat gtactttggc taaatcaaaa taaagaaacc 24000  
atctctgagt caactgattt tcaatcacta ttaagtgaat tcaatggagt ttgtagcaat 24060  
ctgtttaata acagggattt attacaaagt tctagagaag taaatagggg agttagaatt 24120  
actttagaaa aagagctaac taatgaaatt tacaatatg ccaaacataa tgatataaaa 24180  
gttgctcaaa tatttaacta tctatgggga tatattatta gccatctatc taaaaaatct 24240  
aaagtaactt ttggtctagt cgactctggc cgtgaaataa atgtaccaga tatagaaaat 24300  
aaagtggac tatttattaa gacattgcca atacctttta gcagagatga agataaaaaca 24360  
ataatcaatg agattaaaaa actagaagag gttaaatcta atatttttgc aaatgtaata 24420  
agcataagta aattaaaaca aaaacttaac attccaagtt ggcaattact ttatgatagc 24480  
cttcttgtaa ttgaaaattt tccagaagtt gaagaacaac cagacagtat tcaagacttt 24540  
tatgctagtg aacaatcgaa tatgccatta agtatgagtg tagggttatc aagtgatatt 24600  
gtttttaaat tagtatattc cagttcactt atttcagaag aagctataga aaaaataagt 24660  
agtatattta aagatttgct aaaacaagta tgctctctaa aatatgtact tagagtcaat 24720  
gatttgtagg tacctgatat tgagattaaa ctttcaaatg aaaatgttga cgaaatcaat 24780  
tcagtaaaaa aagatacaaa taaaaataac aagatttggt aagaagaaat tatcaatctg 24840  
tgggaagaaa ttttaggtac acacagcgtt tcaactaatg atgatttctt tgaaagtggg 24900  
ggcgattcgt taaagctttc taaattagta tttttattaa atgagaaaaa gggattaaaa 24960  
atggatgtta ttagcttctt tcaagacca acaattcaa acattttaaa caatgcaaac 25020  
agtttaggca agcagtcaaa aaaagtaatg aagggatgatg atatagagtt acctaaattg 25080  
ccctctactg aaatcttaaa agtagaaaaat agtaataatc atgtttttat tacaggaaca 25140  
acgggattgc tagggagcga attgttatat caacacctta taaaaggatt tagtgtttat 25200  
acagttatta gagcagaatg ttcaaaaatca gcaagaaata gagtgttaaa acagctcaaa 25260  
aaaatatcag gaaaaataga gaagctacc ttagaaaatt tacatgtggg tgttggggat 25320  
atctcaaaag aatttttcgg aatgtcacia gaagaatatg ataaattatc aaaaacttgt 25380



ES 2 682 595 T3

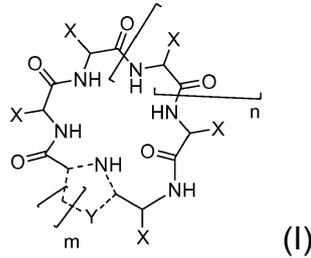
caagcgaaag cggttcattga ctgcaagaac acctatTTTT tacatgataa agtaaatgtc 27300  
gtcaatacta ttaaaccatt agttggggat gattcccttg cttatgtgat ttttacttcg 27360  
ggaactactg gaatgccaaa aggagtcata gaatctcatt atcaagttgt gaacaccatc 27420  
ttcgatttaa ttgaaagatt tgatttagat gatactgatt atTTTTTaaa tctatcatcc 27480  
ctatcatttg atttaagcat ttttgatata tttgcctcaa taattgttgg agggacattg 27540  
catttagttg aagatcctag agattttaat gaaattaata tgattctttc aaaatatcca 27600  
gtaacgattt ggaattccgt acctaaacta atgtatcttt atttaaactc caataaagtt 27660  
atagagaata aattaaaca ttgtttacta agtggagatt ttatttcagt aggattagct 27720  
aaactTTTT ataaagaatt acccaatgtg aatttgcata gtttaggagg agcaactgag 27780  
ggtactatTT ggtcaattac ttataatgTT atgaaaaatg aggtaaatca attgaaatat 27840  
attccctacg ggtatccttt aaccaaccaa acgatataata tattaaataa tgaacatgat 27900  
TTTTgtgatg taggggaagt tggagaaatt gctattggTg gaatgggagt agcccatggg 27960  
tatataaatg accagtttaa aactagtaaa tcgtttatac atcatcctag attgggatat 28020  
atttatctaa ctggtgactt aggtatctat acggaacata attatattaa aatacttggT 28080  
aggaagaatg atgattttaa agttaatggt tatcgattga gtttaagcga aatttcfaat 28140  
aagtttaata agtgtttcaa tactgaaagc cgtattcttt taacaaaaga tactcctaaa 28200  
aagatgatta ttgcatatga aggcgaaatt tcgtcagata aaaatgaaat attaaaaaaa 28260  
ttatctaact atttattacc ttacgaaatg cccaattatg tatttaaggT agaaagattt 28320  
cctatcacia ttaatggaaa aactgattat aataagttat ttgatatcta catggagcag 28380  
cgtcacttta tacgtaagaa taaagatagt accgatgatg tgagtactga gctaagaaag 28440  
atgttatctt tggaaacttga tgtgacaaat attcaatcta cagatacttt gttagatttt 28500  
ggagttgatt ccattcaaat gatgaggatt aagatttggg ttgaaaataa aattgggcga 28560  
gaattagaaa tgattgaact gtatgaaat aactcagtga aagagttaga aactctatta 28620  
actgaaaggT gaaactataa tgctgatgat ttatatttat gaaaataaga aaagtgtatt 28680  
ttctacaata gagaccaagt tacttaattt tatacaggaa gaagatttga acaaaatcgc 28740  
cgctttatat tacgatagag ataaactaaa tttgctatat agtagattag tggTTTTgta 28800  
tggaaatgat aagcttagag gtatttctcc taatgatgta aatatattaa aagaaaaata 28860  
cggtaaaccg tatattgaga ataataacat ttactttaat atatcacatt ctggtaaagt 28920  
tgTTTTatgtt gcattttatg aacatggtga agtaggaatt gacgttgaag aattaaatga 28980  
cgTtTcTaat gaaattattg aatattgctt tcatgaagaa gaaaaaaat taatgaaaag 29040  
agctaaaaaa cgtgaatata agaggcgatt ttatgatatt tggacaaaaa aagaagcata 29100  
tttaaagaaa aaaggtactg gtatttcaga taatttaaaa aaagtaaatg taactaaaaa 29160

# ES 2 682 595 T3

atatgatttt	attacttttg	aatggaataa	ttactattgt	tcggttactg	ctgacggttt	29220
aaaaacatat	agtattaana	tcattcagtt	tgaggaacta	attcattttt	taaagtcatt	29280
ttctagtttt	taaataaat	ttgaactaag	aggctgtttt	ttaaataaga	caattcattt	29340
aagttatgga	agttaagtga	cggatgctta	acttcttttt	aaattaagat	gtgaatagtc	29400
ttgaacctat	gagcattcta	aaacacaaat	tatcatatat	tccatagtca	aaagataatc	29460
ttttattat	ctgaatttta	tgtttaatta	tctctataga	ccgttgtaaa	gtcttgaata	29520
attgattata	tttcaattaa	ggttattatc	tgttttaatg	ttctaattat	tggaaggatc	29580
tttgtacaaa	atagctgata	aatta				29605

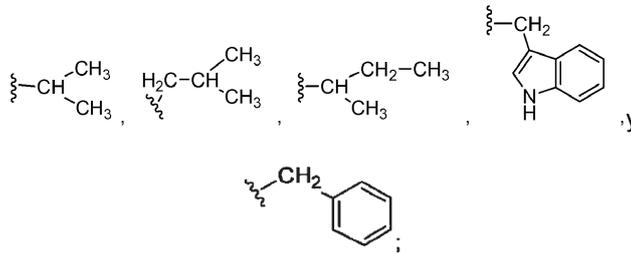
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula:

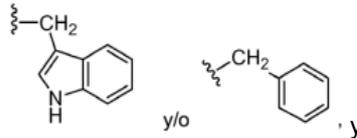


en la que

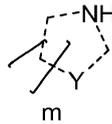
5 - X se selecciona del grupo que consiste en: H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,



con la condición de que al menos uno y como mucho dos de X sean:



10 - Y se selecciona del grupo que consiste en O, S y N,  
con la condición de que



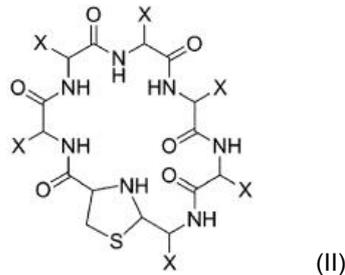
comprenda 0, 1 o 2 enlaces dobles;

- m es un número entero entre 1 y 3,

15 - n es un número entero entre 0 y 4,

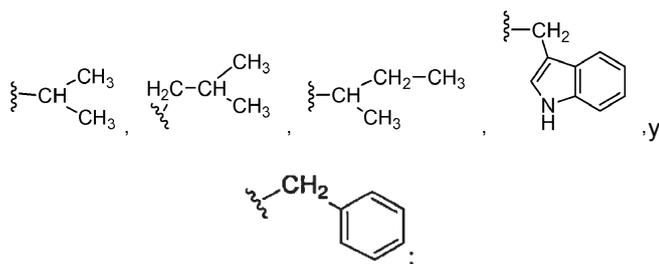
y las sales de los mismos, los solvatos de los mismos y los solvatos de las sales de los mismos.

2. Compuesto de la reivindicación 1, caracterizado por la siguiente fórmula:

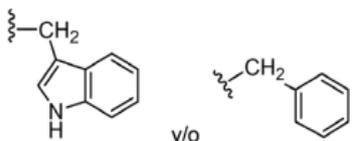


en la que

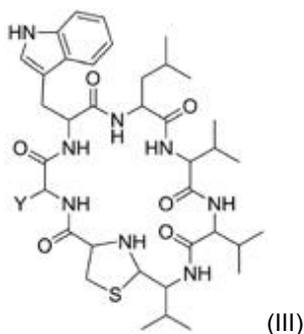
20 - X se selecciona del grupo que consiste en: H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,



con la condición de que al menos uno y como mucho dos de X sean:

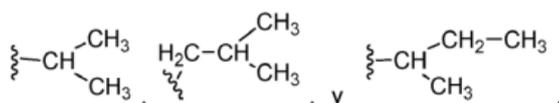


5 3. Compuesto de la reivindicación 1 o 2, caracterizado por la siguiente fórmula:

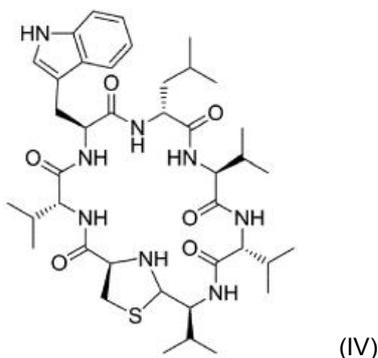


en la que

Y se selecciona del grupo que consiste en:



10 4. Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por la siguiente fórmula:



15 5. Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad infecciosa, más preferiblemente una enfermedad bacteriana, más preferiblemente una infección por una bacteria Gram positiva, muy preferiblemente una infección por *Staphylococcus aureus* que incluye sus formas de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) y resistente a la vancomicina (VRSA).

6. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad infecciosa, más preferiblemente una enfermedad bacteriana, más preferiblemente una infección por una bacteria Gram positiva, muy preferiblemente una infección por *Staphylococcus aureus* que incluye sus formas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y resistente a la vancomicina (VRSA).
8. Método para la producción del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las siguientes etapas:
1. Proporcionar bacterias de la especie de *Staphylococcus lugdunensis*,
  2. Purificar el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 de dicha bacteria.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque después de la etapa (1) y antes de la etapa (2) se extraen las bacterias y el medio del cultivo bacteriano y el extracto bacteriano y el medio se someten a la etapa (2) en la que el compuesto es purificado a partir de dicho extracto bacteriano y medio.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 8 y 9, caracterizado porque en la etapa (2) la purificación implica el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que identifica un pico de señal asociado con dicho compuesto.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque dicho pico de señal corresponde a una masa molecular de aprox. 650 Da - 950 Da, preferiblemente de aprox. 700 Da - 850 Da, más preferiblemente de aprox. 750 Da - 800 Da, más preferiblemente de aprox. 770 Da - 790 Da, y muy preferiblemente de aprox. 782,5 Da.
12. Método para la producción del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las siguientes etapas:
1. Expresar el sistema II de péptido sintetasa no ribosomal de la especie de *Staphylococcus lugdunensis* (NRPS-II) en un sistema biológico,
  2. Incubar el NRPS-II expresado en condiciones que permitan la síntesis del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
  3. Purificar dicho compuesto.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque dicho NRPS-II está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende cualquiera de las secuencias codificantes de los genes *lugA*, *lugB*, *lugC*, *lugD*, y, opcionalmente, de un regulador transcripcional de la familia GntR, transportador ABC (sistema de transporte multifármaco tipo GdmF), proteína permeasa del sistema de transporte ABC-2, transportador ABC, proteína de membrana con hidroxiprolina, regulador de la familia TetR/AcrR, proteína de la familia de la tioesterasa, 4'-fosfopanteteiniltransferasa y regulador negativo put. de sigY (en *Bacillus*).
14. Método de acuerdo con las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque las condiciones comprenden aminoácidos, tioesterasa y regulador.

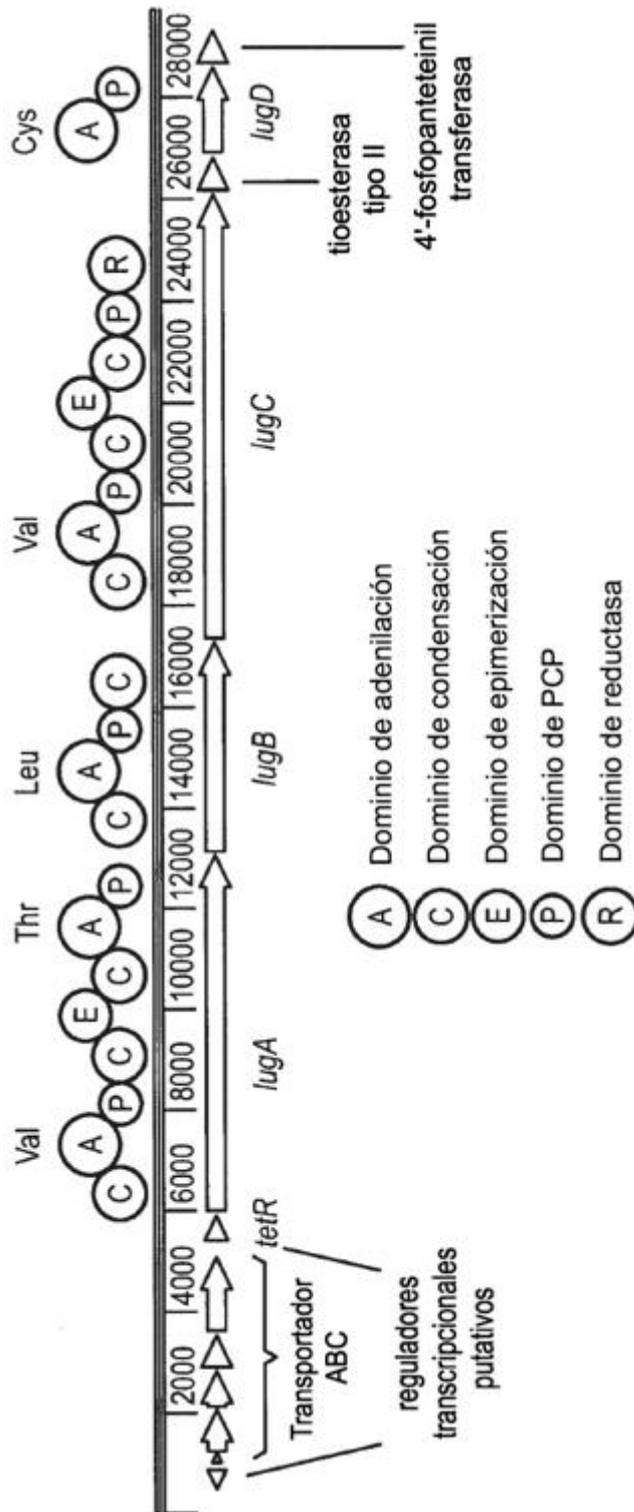


Fig. 1

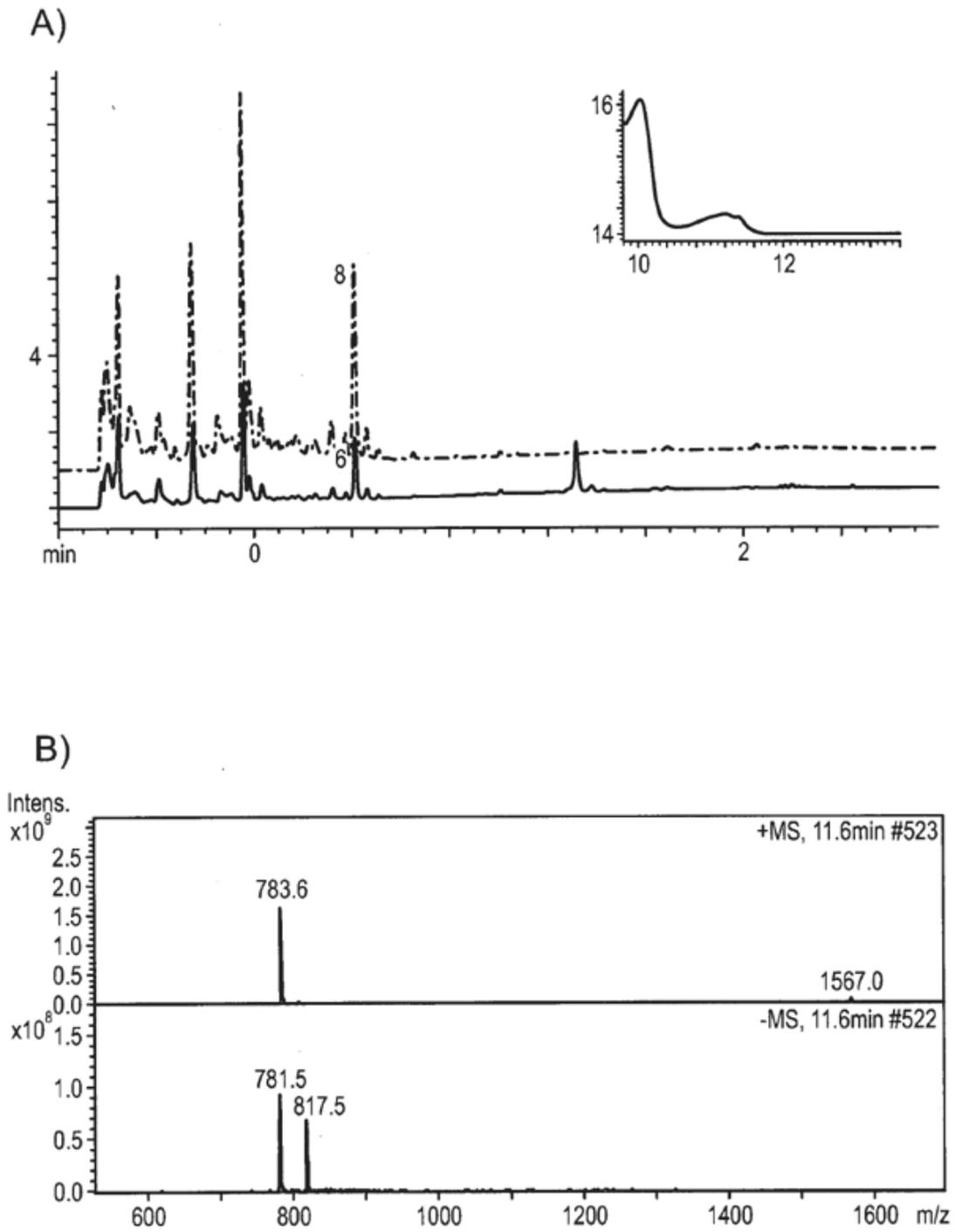


Fig. 2

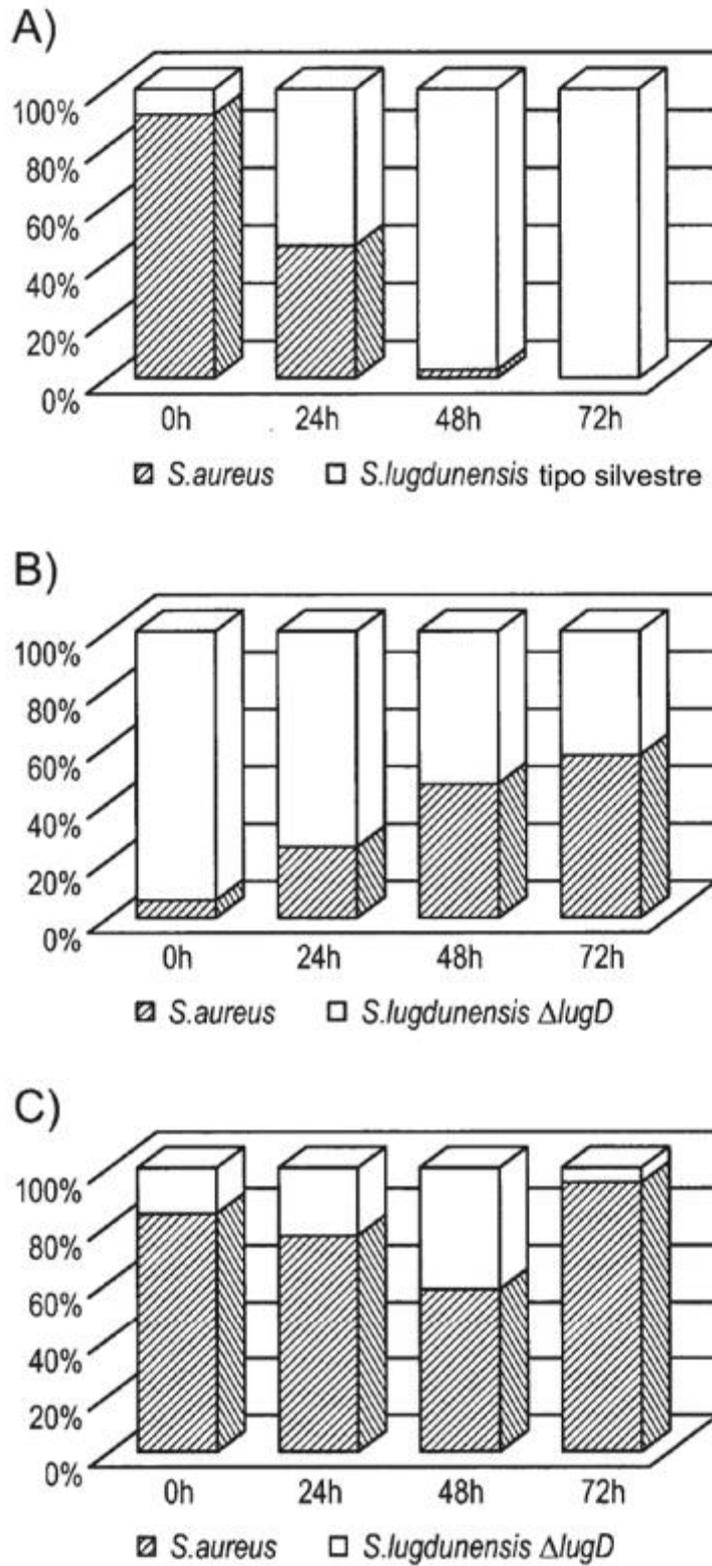


Fig. 3

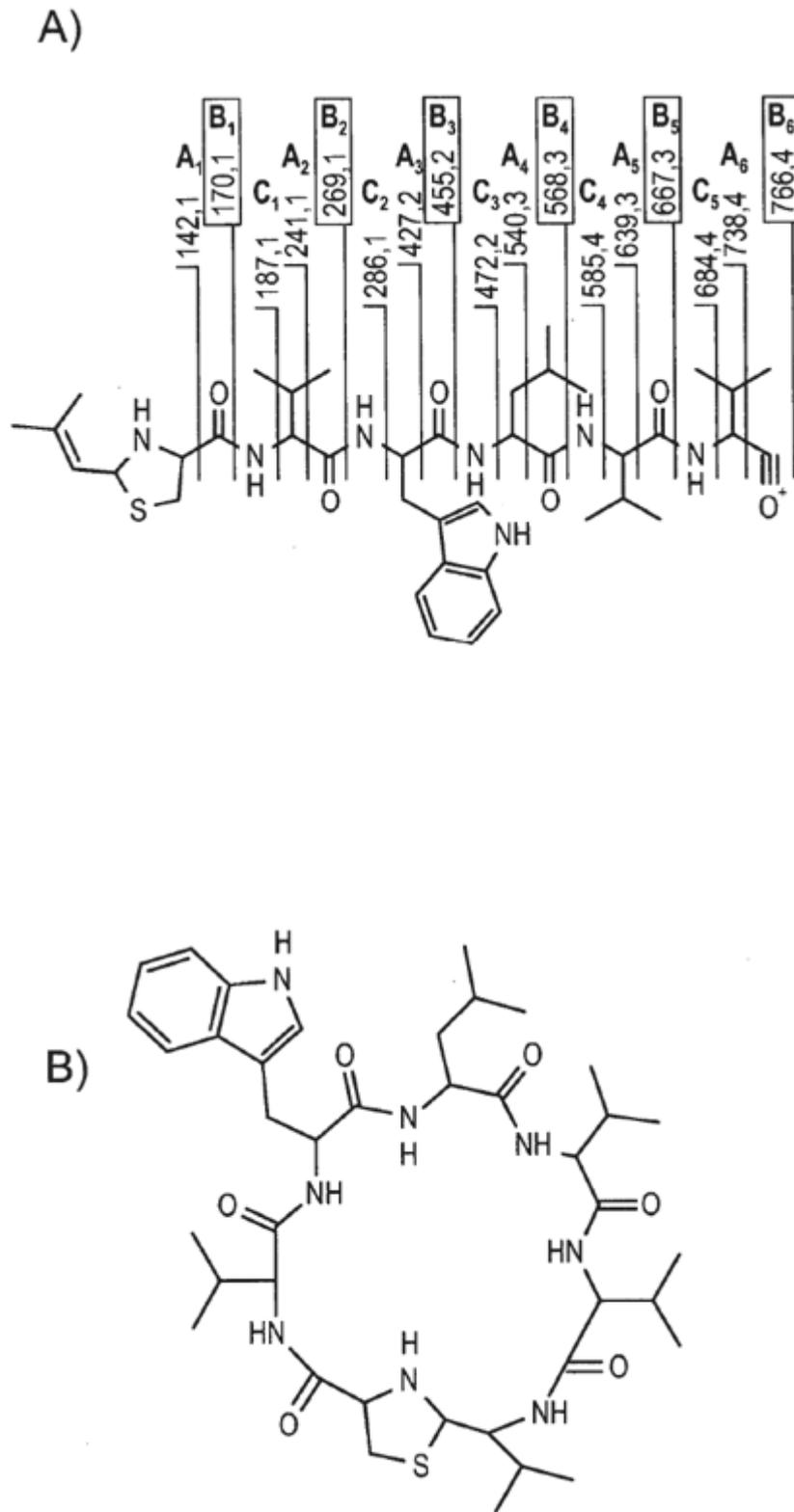


Fig. 4

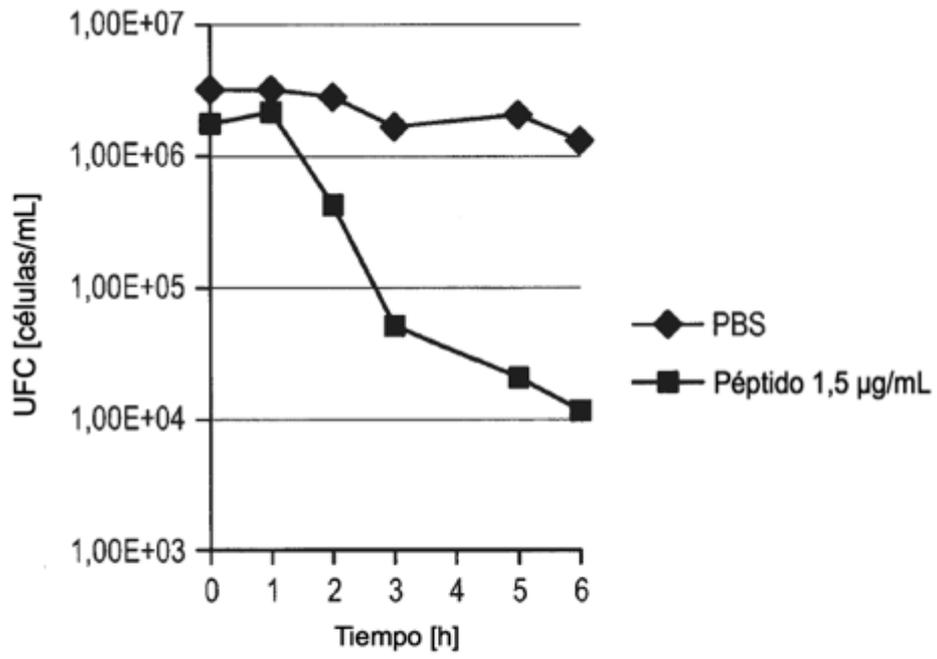


Fig. 5

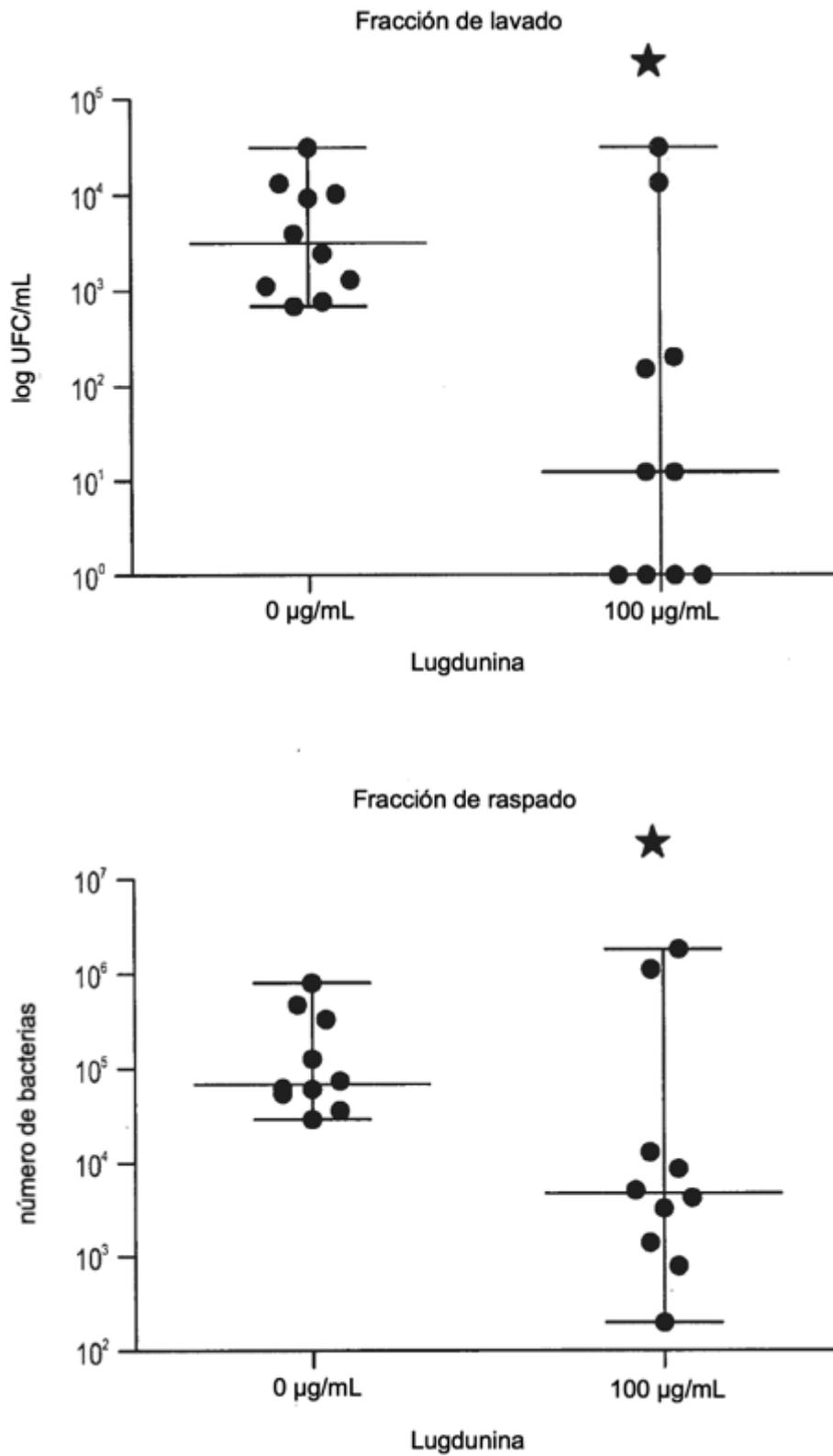


Fig. 6

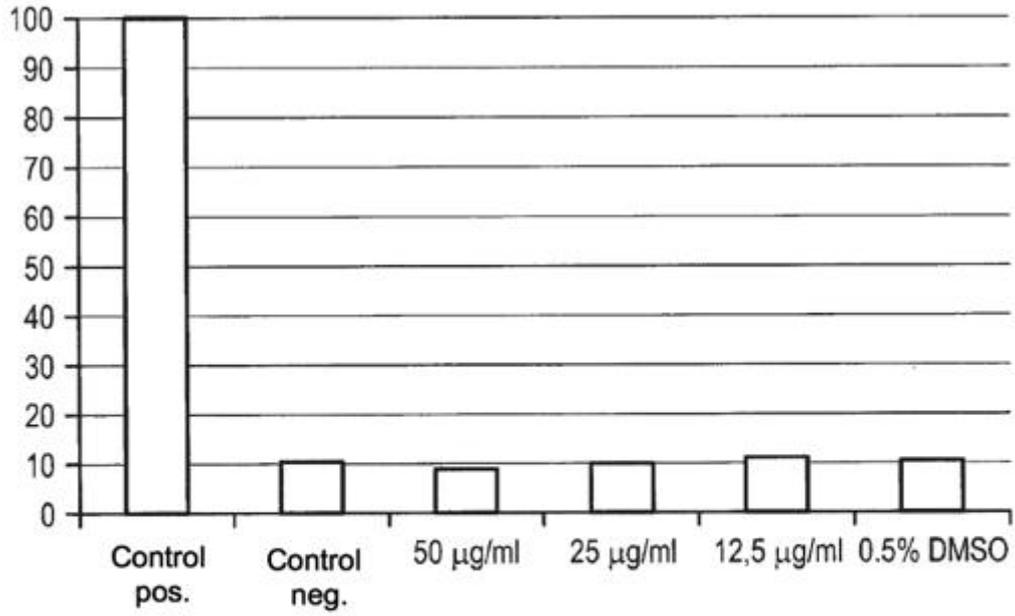


Fig. 7

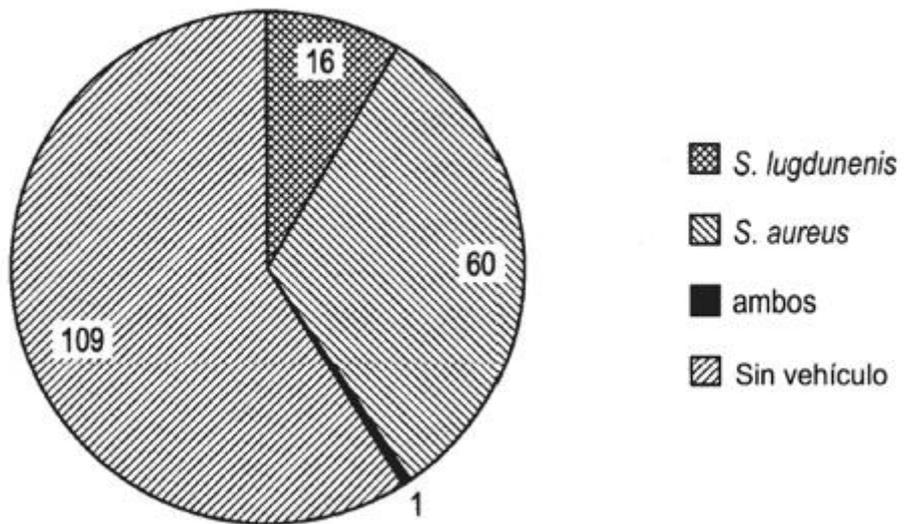


Fig. 8