

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 204 294**

21 Número de solicitud: 200201537

51 Int. Cl.7: **C07D 487/04**, A61K 38/12  
A61P 31/04, C12N 1/20  
C12P 21/04  
// (C07D 487/04, C07D 241:00  
C07D 207:00)  
(C12N 1/20, C12R 1:01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **02.07.2002**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2004**

Fecha de la concesión: **15.12.2004**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**13.02.2004**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2005**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2005**

73 Titular/es: **Universidad de Santiago de Compostela  
Edificio Cactus - CITT - Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es: **Riquera Vega, Ricardo;  
Sánchez López, José Luis y  
Ben Mohamed Fdhila, Faouzi**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Nuevos antibióticos activos frente al *Vibrio anguillarum* y sus aplicaciones en cultivos de peces, crustáceos, moluscos y otras actividades de acuicultura.**

57 Resumen:

Nuevos antibióticos activos frente al *Vibrio anguillarum* y sus aplicaciones en cultivos de peces, crustáceos, moluscos y otras actividades de acuicultura.

Nuevos antibióticos activos frente al *Vibrio anguillarum* y sus aplicaciones en cultivos de peces, crustáceos, moluscos y otras actividades de acuicultura. Se han encontrado 5 dicetopiperacinas con actividad frente a la bacteria *Vibrio anguillarum*. Se trata de los compuestos Z54: ciclo(D)-prolina-(D)-leucina; Z56: ciclo(D)-prolina-(D)-Isoleucina; Z57: ciclo(D)-prolina-(D)-valina; Z59: ciclo(D)-prolina-(D)-fenilalanina y B717: ciclo(D)-trans-4-hidroxiprolinil-(D)-fenilalanina; obtenidos a partir de dos bacterias marinas: *Roseobacter gallaecensis*. (CECT 5719) y *Roseobacter* sp. (CECT 5718), aisladas de cultivos larvarios de *Pecten maximus*. La adición de estos compuestos en una concentración de 0,5 mg/mL a cultivos de moluscos, crustáceos y peces, aumenta su supervivencia en valores que oscilan entre el 12% y el 33%. Su actividad inhibidora es comparable a la de los antibióticos utilizados actualmente en acuicultura.

ES 2 204 294 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Nuevos antibióticos activos frente al *Vibrio anguillarum* y sus aplicaciones en cultivos de peces, crustáceos, moluscos y otras actividades de acuicultura.

5 La vibriosis es una de las enfermedades que más pérdidas económicas causa en la acuicultura marina (Toranzo, A.E. y Barja, J.L. 1990. A review of the taxonomy and Seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special referen-  
 10 ce to aquaculture in northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 73-82. Myhr, E.; Larsen, J.L.; Lillehaug, A.; Gudding, R.; Heum, M. y Hastein, T. 1991. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from  
 15 farmed fish in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2750-2757). Esta enfermedad está causada por distintas especies bacterianas pertenecientes al género *Vibrio*, siendo la especie *Vibrio anguillarum* la responsable principal de epizootias en una gran variedad de peces, crustáceos y moluscos.

15 En Galicia (NW de España), la vibriosis ha sido a través de los años un problema continuo y limitante en la piscicultura marina. Desde 1985 el *Vibrio anguillarum* ha sido el principal agente causal de vibriosis en alevines de rodaballo, siendo aislado esporádicamente a partir de salmón y de trucha arcoiris (Toranzo, A.E.; Santos, I.; Lemos, M.L.; Ledo, A. y Bolinches, J. 1987. Homology of *Vibrio anguillarum* strains causing epizootics in turbot, salmon and trout reared on the Atlantic Coast of Spain. *Aquaculture*, 67: 41-52. Toranzo, A.E. y Barja, J.L. 1990. A review of the taxonomy and Seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in northwest of Spain.  
 20 *Dis. Aquat. Org.*, 9: 73-82). Del mismo modo, este *Vibrio* ha sido el causante de mortalidades en cultivos de peces marinos, moluscos y crustáceos de otras zonas geográficas (Masumura, K.; Yasunobu, H.; Okada, N. y Muroga, K. 1989. Isolation of a *Vibrio* sp., the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese loounder larvae. *Fish Pathol.*, 24: 135-141.; Baticados, M.C.L.; La Villa-Pitogo, C.R.; Cruz- Lacierda, E.R.; De La Peña, R.E. y N.A. Sunaz. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *V. harveyi* and *V. splendius* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. aquat. Org.*, 9:133-139; Paillard, C. y Maes, P. 1990. Etiologie de la maladie de lánneau brun chez *Tapes philippinarum*: Pathogénicité d'un *vibrio* sp. *C. R. Acad. Sci.*, Paris 310: 15-20.; Castro, D.; Martínez-Manzanares, E.; Fouz, A.B.; Morínigo, M.A.; Borrego, J.J. y A.E. Toranzo. 1992. Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. *Dis. aquat. Org.*, 14: 229-236).

30 A la vista de los problemas descritos anteriormente, que reducen la productividad en las instalaciones de acuicultura, se ha recurrido de modo sistemático a la adición de antibióticos al medio de cultivo. Los principales agentes quimioterápicos hasta ahora usados en acuicultura marina son la oxitetraciclina, quinolonas clásicas (ácido oxolínico, flumequina) y fluoradas (enrofloxacina), y nitrofuranos. El ácido oxolínico y la flumequina han quedado obsoletos por la aparición de cepas resistentes, mientras que la enrofloxacina y el florfenicol se están usando, a pesar de no estar  
 35 aprobado su uso en peces, ante la posible aparición de cepas resistentes mientras no se encuentran nuevos agentes quimioterápicos eficaces. Por su parte, el uso de los nitrofuranos ha sido prohibido en la acuicultura. En el caso concreto de los cultivos larvarios de vieira (*Pecten maximus*) y de otros bivalvos susceptibles de acuicultura, se ha comprobado que la utilización de agua de mar filtrada e irradiada con luz ultravioleta, y los cambios frecuentes del agua durante el cultivo, no son medidas suficientemente eficaces, siendo necesaria la utilización de antibióticos para prevenir las mortalidades bacterianas que generalmente aparecen de forma espontánea al cabo de una o dos semanas de cultivo (Alderman, D.J. y Michel, C. 1992. Chemotherapy in aquaculture today. En: Michel, C. y Alderman, D.J. (Eds.), Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizootics, Paris, pp. 3-24.; Nicolas, J.L.; Corre, S.; Robert, R. y Ansquer, D. 1995. Why do scallop (*Pecten maximus*) larvae die, when they are reared without antibiotics?. 10<sup>th</sup> International Pectinid Workshop. Cork (Ireland). 27 de Abril- 2 de Mayo, 1995.)

45 Por todo ello, la búsqueda de nuevos antibióticos activos en el medio marino, capaces de proteger los cultivos en instalaciones de acuicultura y no generadores de contaminación, constituyen un tema de gran importancia y para el que son necesarias nuevas soluciones (Nogami, K. Maeda, M. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvea of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 2373-2376.)

## 50 Explicación detallada de la invención

### Cepas bacterianas

55 Se aislaron del agua de cultivo larvario de *Pecten maximus* 155 cepas bacterianas, que fueron introducidas en placas de Petri con un medio basal agar-marino (peptona bacteriológica 5 g/L, extracto de levadura: 1 g/L, trazos de citrato férrico y agar bacteriológico: 14 g/L) de pH 7,6 caracterizado por su contenido salino, e incubadas a una temperatura de 23°C tanto en cultivos líquidos como en placas.

### 60 Estudio de la actividad antibacteriana

Para el estudio de la actividad antibacteriana, de esas cepas frente al *Vibrio anguillarum*, se emplearon ensayos de antagonismo por el método de discos y el de microplacas.

65 Para los ensayos de actividad antibacteriana, por el método de los discos, se emplearon discos de papel de filtro estériles, con un diámetro de 5 mm, se impregnaron con el sobrenadante, y fueron depositados sobre placas de agar previamente sembradas en estrías con el *Vibrio anguillarum* y posteriormente incubados durante 24-48 h a 23°C. La actividad se determinó por el halo de inhibición.

## ES 2 204 294 B2

Los ensayos en microplacas en el caldo marino se llevaron a cabo con cultivos puros de las distintas cepas bacterianas y cocultivos de la cepa bacteriana escogida, más la cepa testigo. A cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos le fueron añadidos 200  $\mu\text{L}$  de caldo marino y 10  $\mu\text{L}$  de sobrenadantes de diferentes cepas. Finalmente, se añadieron a cada pocillo 20  $\mu\text{L}$  de la cepa testigo (*Vibrio anguillarum*) diluida a  $10^{-3}$ .

Como controles se mantuvieron seis pocillos con 200  $\mu\text{L}$  de caldo marino, tres de ellos inoculados con 10  $\mu\text{L}$  de la cepa bacteriana correspondiente y los otros tres con 20  $\mu\text{L}$  de la cepa testigo diluida a  $10^{-3}$ . Las microplacas se incubaron durante 24-72 h a una temperatura de 23°C y el grado de inhibición se determinó mediante un lector de Elisa de los distintos pocillos. Los ensayos se hicieron por triplicado.

### Localización de la actividad antibacteriana en cultivos puros y cocultivos

Del estudio de la actividad de todas las cepas bacterianas estudiadas en este trabajo se deduce que solamente las dos cepas denominadas CF-20 (Colección Española de Cultivos Tipo CECT 5719) y C-148 (CECT 5718), son capaces de inhibir el crecimiento del *Vibrio anguillarum*, y por lo tanto seguimos nuestro trabajo solamente sobre estas dos cepas.

En caldo marino (peptona bacteriológica 5 g/L, extracto de levadura: 1 g/L, trazas de citrato ferrico y agar bacteriológico: 14 g/L) se llevaron a cabo cultivos puros de las cepas C-148, y CF-20 y cocultivos de C-148 y de CF-20 con *V. anguillarum*. Después de crecer en agitación, durante 48 h, los cultivos y cocultivos se centrifugaron a 2724 G durante 10 min a 4°C. Una vez separado el sobrenadante del precipitado, las células se resuspendieron en un volumen conocido de agua de mar, se rompieron por ultrasonidos (3x1 min, 20 Khz) y se lavaron tres veces con agua de mar estéril. Los sobrenadantes del caldo y del lavado del pellet y los lisados se ensayaron con los métodos de discos y el método de microplacas para localizar el efecto antagonista.

### Identificación bacteriana

La identificación de las cepas bacterianas objeto de estudio se realizó mediante la determinación de sus características fenotípicas, sistemas multiprueba API-20E y API-20NE y genéticas [extracción del DNA genómico, análisis filogenético de las secuencias del rRNA 16S, RAPD y ensayos de hibridación con sondas: ADN/ADN (DOT BLOT)].

### Preparación de cultivos bacterianos de CF-20 y C-148

Una colonia de las cepas bacterianas CF-20 o C-148 y otra de *V. anguillarum* se sembraron y se dejaron crecer en agar marino, se inocularon en cocultivo en matraces de 1.8 L de capacidad con 1200 mL de caldo marino cada uno y se incubaron a 23°C con agitación orbital a 140 r.p.m. durante 24 h.

Al cabo de ese tiempo, cuando el crecimiento bacteriano está en fase exponencial, el caldo se centrifuga a 2724 G a 4°C, y los pellets se sonicán y se lavan con agua de mar. La capacidad inhibitoria de los sobrenadantes y lisados se comprobó por el método de los discos, utilizando como controles papeles de filtro impregnados en caldo marino.

### Aislamiento e identificación de las sustancias activas

#### Extracción y aislamiento

Siguiendo el procedimiento de cultivo descrito anteriormente (*Preparación de cultivos bacterianos de CF-20 y C-148*), se reúnen los 45 L de sobrenadante del caldo marino procedentes del cocultivo de CF-20 con *V. anguillarum*, con el sobrenadante de los lisados de los correspondientes pellets, y el volumen total se extrae 3 veces con la mezcla  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ : MeOH 75:25. Los extractos se concentraron y se repartieron entre agua y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y la fase orgánica concentrada se sometió a separación por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con mezclas de hexano:AcOEt. Para la localización de la actividad inhibitoria al *V. anguillarum* los procesos de aislamiento y separación, se siguieron por los métodos de discos y microplacas, disolviendo 1 mg de cada fracción en 100  $\mu\text{L}$  de etanol.

Las fracciones activas obtenidas de la columna se cromatografiaron por HPLC en una columna semipreparativa de fase normal ( $\mu$ -porasil; hexano:AcOEt 2:3; flujo: 3 mL/min) proporcionando 3.5 mg de Z54 con un  $t_R$  de 22 min; 4 mg de Z56 con un  $t_R$  de 29 min; 3 mg Z57 con un  $t_R$  de 37 y 5 mg de Z59 con un  $t_R$  de 44min.

Por su parte, de 45 L de sobrenadante de cultivo de la cepa C-148, se extrajeron y cromatografiaron como antes. Las fracciones activas eluidas de la columna de cromatografía proporcionaron un compuesto impuro que se purificó por HPLC en una columna de fase reversa ( $\mu$ -Bondapak C-18; MeOH:H<sub>2</sub>O 95:5; flujo: 2 mL/min) dando 3 mg de B717 puro activo con un  $t_R$  de 17 min y una mezcla que sometida a HPLC en una columna semipreparativa de fase normal ( $\mu$ -porasil; hexano:AcOEt 2:3; flujo: 3 mL/min) proporcionó importantes compuestos activos frente al *Vibrio anguillarum* 4 mg de Z54; 3.5 mg de Z56; 3 mg de Z57 y 2.5 mg de Z59. Todos los compuestos mostraron actividad óptica (Tabla 1) y se identificaron como dicetopiperacinas.

La elucidación estructural de estos compuestos se llevó a cabo utilizando técnicas de RMN (experimentos <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H y DEPT), de masas (e.i.; (+) FAB; baja y alta resolución) principalmente, así como por comparación directa con muestras auténticas obtenidas por síntesis. En la Tabla 1 se muestran los datos espectroscópicos más relevantes (<sup>13</sup>C,

<sup>1</sup>H y EM).

TABLA 1

Tiempos de retención  $t_R$  (min),  $\{\alpha\}^D$  y fragmentos en el espectrometría de masas de los antibióticos

Antibióticos aislados	$t_R$ (min)	$\{\alpha\}^D$ (EtOH)	m/z (uma)
Z54(3.5 mg)	22	+128.3°	210, 194, 154, 125, 86 y 70
Z56(4 mg)	29	+1683.1°	210, 154, 125, 86 y 70
Z57(3 mg)	37	+120.1°	196, 154, 125, 91 y 70
Z59(5 mg)	44	+88.7°	244, 215, 194, 153, 125, 91 y 70
B717(3 mg)	17	+7.3°	260, 185, 170, 141, 120, 91 y 60

### Síntesis de dicetopiperacinas

Con el objeto de disponer de muestras auténticas de las dicetopiperacinas para comparación directa con las naturales, para ensayos de actividad antibiótica y para la determinación de las características estructurales ligadas a esa actividad, se prepararon por procedimientos conocidos (descritos posteriormente: *Preparación de dicetopiperacinas LL y DD*) y a partir de los  $\alpha$ -aminoácidos correspondientes, una amplia serie de dicetopiperacinas de las series LL y DD que luego se epimerizaron para obtener las correspondientes dicetopiperacinas LD y DL.

### Preparación de dicetopiperacinas LL y DD

Se prepararon primero los dipéptidos protegidos como BOC (butiloxicarbonilo) y metil éster que se ciclaron por calefacción en ácido fórmico/BuOH/Tolueno. De este modo se prepararon las dicetopiperacinas LL y DD de la Tabla 1, excepto la B717 que se obtuvo por acoplamiento entre Cbz-(D)-trans-4-hidroxi-(D)-prolina con (D)-fenilalanina metil éster seguido de N-desprotección por hidrogenación catalítica y ciclación, para dar el compuesto B717.

### Preparación de dicetopiperacinas LD y DL por epimerización

Se utilizó el procedimiento descrito por Ott et al. (Ott, H; Frey, A. J.; Hoffman, A. 1963. Tetrahedron 19, 1675. y Adamczeski et al. (Adamczeski, M.; Reed, A.R. y P. Crews. 1995. Knew and Known Diketopiperazines from the Caribbean Sponge, *Galxy CF. podatyra*. Journal of Natural Product, 58(2): 201-208.), con ligeras modificaciones tal y como se describe a continuación:

En un vial pequeño de vidrio se disuelven 20 mg de dicetopiperacina DD o LL en 0,3 mL de hidróxido de sodio (0,5 mL de 0,5 N de NaOH en H<sub>2</sub>O:MeOH, 1:1) y se mantiene durante 15 min a temperatura ambiente. Se añaden algunas gotas de ácido clorhídrico al 15% y se deja toda la noche. La solución se concentra a vacío y el residuo se extrae con cloruro de metileno, se concentra el disolvente y se cristaliza con acetato etilo.

### Concentración mínima inhibidora (CMI) de los antibióticos aislados

La concentración mínima inhibidora (CMI) de las sustancias activas aisladas Z54, Z56, Z57, Z59 y B717 se determinó mediante el método de dilución de agar descrita en la guía NCCLS (NCCLS, 1997 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; Tentative Standard. NCCLS Document M31-T.), con ligeras modificaciones en la composición del medio, tiempo de incubación y la temperatura. Se prepararon disoluciones de las sustancias activas a distintas concentraciones (0,005; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 0,8 y 5  $\mu$ g/mL), y suspensiones de *V. anguillarum* a distintas diluciones (de 10 a 10<sup>6</sup> células/mL). A continuación se añaden distintas concentraciones de las sustancias activas sobre placas de Petri previamente sembradas con *V. anguillarum* y se miden los halos de inhibición al cabo de 24-48 horas.

### Actividad in vivo de las sustancias activas

También se llevaron a cabo estudios *in vivo* del efecto antibiótico de estas sustancias aisladas Z54, Z56, Z57, Z59 y B717 en diversos cultivos de interés en acuicultura como los de *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Psetta máxima*, *Maja squinado*, *Ruditapes decussatus* y *Ostrea edulis*. Se describen a continuación los efectuados con *Ruditapes decussatus* y *Ostrea edulis* que son representativos.

### Cultivos larvarios

Los cultivos larvarios de *Ruditapes decussatus* y *Ostrea edulis* se mantuvieron en el laboratorio a una temperatura controlada de 20°C, renovándose el agua y analizándose la flora bacteriana en general y el *V. anguillarum* cada dos días. Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos: El primero en tubos de 100 mL para hacer una determinación

## ES 2 204 294 B2

aproximada de la dosis de cada una de las sustancias activas que proporciona el mejor crecimiento y/o supervivencia de las larvas con relación al control, y el segundo en tanques de 70 L para confirmar la actividad y dosis más adecuadas, y acercarse a las condiciones de explotación en acuicultura.

### 5 Experimento 1

Para estos experimentos se utilizaron tubos pyrex de 100 mL, conteniendo 90 mL de agua de mar, filtrada a  $1\ \mu\text{m}$  y una densidad larvaria de 5-7 larvas. $\text{mL}^{-1}$  para *Ruditapes decussatus* y de 1-2 larvas para *Ostrea edulis*. La edad de las larvas al inicio de los experimentos fue de 3 a 5 días. Los cultivos se mantuvieron con aireación a lo largo de todo el experimento, y se alimentaron con una mezcla de las microalgas *Isochrysis galbana* (T-iso), *Chaetoceros calcitrans*, *Pavlova lutheri* y *Tetraselmis suecica* (20:10:20:5 células. $\mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente).

A estos cultivos se añadieron distintas concentraciones (0.005; 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.7; 0.8 y 5  $\mu\text{g/mL}$ ) de cada una de las sustancias activas, y se determinó la dosis de cada sustancia, que permite el mejor crecimiento y/o supervivencia de las larvas, medido a los 22 días de iniciado el cultivo.

### Experimento 2

Una vez determinada la dosis adecuada de cada sustancia, según el método descrito en el experimento 1, se comprobó el efecto de las sustancias activas en cultivos larvarios contenidos en tanques de 70 L, manteniendo las mismas condiciones experimentales del experimento 1, excepto que el conteo de las larvas se realizó a los 11 días de la adición de las sustancias.

### Mortalidad, crecimiento larvario y flora bacteriana

Para la determinación de la mortalidad y del crecimiento larvario después de la adición de las sustancias antibióticas aisladas (Z54, Z56, Z57, Z59 y B717), las larvas procedentes de los experimentos anteriores fueron recogidas en tamices, y se suspendieron en un pequeño volumen de agua de mar, del que se tomaron tres alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  que fueron examinadas para la estimación del número medio de larvas y el cálculo de la supervivencia.

Para analizar la evolución de los *vibrios* y flora bacteriana en general, tras la adición de las sustancias antibióticas, se tomaron muestras de 1 mL de cultivo que fueron diluidas con agua de mar estéril hasta una dilución de  $10^{-4}$ . Alícuotas de 40 mL de estas diluciones se sembraron por duplicado en agar marino Z2216 (Difco) y agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) (Oxoid). Las placas de cultivo de agar marino se incubaron a  $23^{\circ}\text{C}$ , durante 2-4 días, y las de TCBS durante 2 días. Al cabo de este tiempo se calcularon las unidades viables (UFC: Unidades Formadoras de Colonias) multiplicando la media del número de colonias por el inverso del factor de dilución.

Del estudio de la actividad de todas las cepas bacterianas presentes en los cultivos de vieira, dorada y ostra plana se deduce que solamente las dos cepas denominadas CF-20 y C-148 son capaces de inhibir el crecimiento del *Vibrio anguillarum*. Además, se comprueba que esa actividad sólo se produce cuando cualquiera de esas dos cepas bacterianas está en contacto directo con el *V. anguillarum*. Cuando se llevaron a cabo ensayos separados para el pellet y el sobrenadante de cultivos de CF-20 y C-148 los resultados de actividad indican claramente que las sustancias antibióticas están presentes en el sobrenadante y en el pellet de las células.

El estudio de sus características fenotípicas, sistemas multiprueba API-20E y API-20NE y genéticas, identifican a las cepas CF-20 como *Roseobacter galleaciensis* sp y C-148 como *Roseobacter* sp.

### Cultivos de las cepas CF-20 y C-148

Con el objeto de aislar e identificar las sustancias activas frente al *Vibrio anguillarum*, y obtenerlas en cantidad suficiente, se llevaron a cabo en primer lugar, una serie de cultivos en pequeña escala para determinar las mejores condiciones experimentales para el cultivo de las cepas activas y la producción de los antibióticos, así como el momento en que la concentración es máxima. De los resultados, se dedujo que el cultivo en caldo marino (peptona: 5 g/L, extracto de levadura: 1 g/L y citratos férricos) a  $23^{\circ}\text{C}$ , con agitación orbital (140 r.p.m) durante 24 horas y en cocultivo de la cepa CF-20 o C-148 y el *Vibrio anguillarum* eran las condiciones más favorables.

Con esa información se establecieron cocultivos de las cepas CF-20 y C-148 con el *Vibrio anguillarum* en matraces de 1.8 L que fueron utilizados para la extracción de las sustancias activas frente al *Vibrio anguillarum* a partir del sobrenadante del caldo y de los lisados de las células en los que previamente habíamos localizado la actividad.

### Aislamiento, estructura y síntesis de los antibióticos

#### Aislamiento

Los procesos de extracción, separación y aislamiento, se siguieron por medio de los test de actividad en discos y microplacas. Así, por extracción selectiva del caldo y los lisados de los cocultivos de CF-20 y C-148 se obtuvo un extracto activo frente al *Vibrio anguillarum* cuya fracción soluble en diclorometano, fue sometida a separación cromatográfica en silica gel que proporcionó varias fracciones activas de las que finalmente se aislaron por HPLC

cantidades de 3-5 mg de los componentes activos frente al *Vibrio anguillarum* puros.

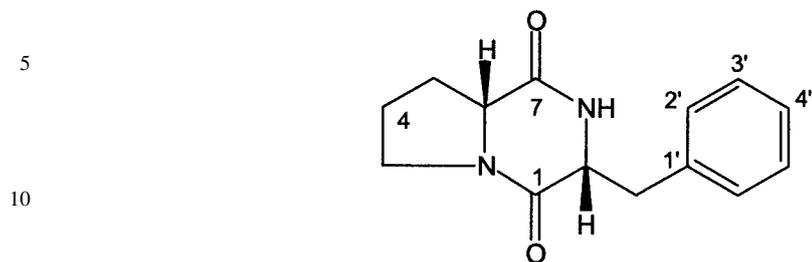
De la cepa bacteriana CF-20 se obtuvieron los cuatro compuestos: Z54, Z56, Z57 y Z59, mientras que los extractos de la cepa C-148 proporcionaron además de esos mismos cuatro componentes, en cantidades similares, un nuevo componente activo B717.

El estudio estructural de estos compuestos llevado a cabo por métodos espectroscópicos (RMN y EM principalmente), muestran para Z54, Z56, Z57, Z59 la presencia de señales en el RMN de protón y carbono características de dicetopiperacinas que contienen el anillo de Pro fusionado con Leu, Ile, Val y Phe. Los espectros de masas por impacto electrónico y FAB de baja y alta resolución confirman esas estructuras. Por su parte, el compuesto B717, presenta unas características espectroscópicas similares a las de Z59 pero contiene 4-hidroxi prolina en lugar de prolina. Los datos espectroscópicos mencionados indican además que los dos centros asimétricos de las cinco dicetopiperacinas presentan la misma configuración, (LL o DD) y son coincidentes con los descritos para ciclo(L)-prolina-(L)-Leucina, ciclo(L)-prolina-(L)-Isoleucina, ciclo(L)-prolina-(L)-valina, ciclo(L)-prolina-(L)-fenilalanina, y ciclo(L)-trans-4-hidroxi prolil- (L)- fenilalanina (Pickenhagen, W.; Dietrich, P.; Polonsky, J. Nouaille, F. y Lederer, E. 1975. **Identification of the Bitter Principal of Cocoa. *Helvetica Chimica Acta*, 58, Fasc. 4(115): 1078-1086.** Paul e. Young, Vicent Madison, and Elkan R. Blout. **Cyclic Peptides. 15 Lanthanide-Assisted <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR Analysis of Preferred Side-Chain Rotamers in Proline-Containing Cyclic Dipeptides. *Journal of the American Chemical Society* /98:17/August 18, 1976. 5365- 5371.** Young, P.E.; Madison, V. y Blout, E.R. 1976. **Cyclic Peptides. 15 Lanthanide-Assisted <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR Analysis of Preferred Side-Chain Rotamers in Proline-Containing Cyclic Dipeptides. *JACS*, 98: 5365-5371.** Schmitz, F.J.; VanderaH, D.J.; Hollenbeak, K.H.; Enwall, C.E.L. y Gopichand, Y. 1983. Metabolites from the Marine Sponge *Tedania ignis*. A new Atisanediol and Several known Diketopiperazines. *J. Org. Chem.*, 48: 3941-3945. **Adamczeski, M.; Reed, A.R. y P. Crews. 1995.** Knew and Known Diketopiperazines from the Caribbean Sponge, *Galxy CF. podatypa. Journal of Natural Product*, 58(2): 201-208. **Jayatilake, G.S.; Thornton, M.P.; Leonard, A.C.; Grimwade, J.E. y Baker, B.J. 1996.** Metabolites from an Antarctic Sponge-Associated Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa. J. Nat. Prod.*, 59: 293-296. **Trigos, A.; Reyna, S.; Galindo, G. y Ramos, J.M. 1996.** Diketopiperazines from cultures of Fungus *Pestalotia palmarum. Natural Product letters*, 8: 199-205. **Ginz, M. y Engelhardt, U.H. 2000.** Identification of Proline-Based Diketopiperazines in Roasted Coffee. *J. Agric. Food. Chem.*, 48: 3528-3532.), pero los valores de poder rotatorio de nuestros compuestos indican que se trata de los correspondientes enantiómeros.

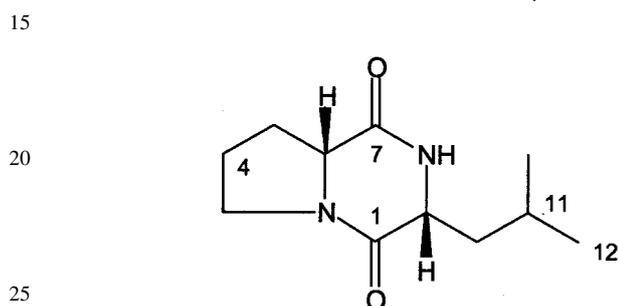
#### Síntesis de antibióticos aislados

Se prepararon, utilizando procedimientos comunes (descritos anteriormente en *Síntesis de dicetopiperacinas*) a partir de alfa aminoácidos, las correspondientes dicetopiperacinas con estereoquímica LL y DD. Por epimerización de las anteriores se obtuvieron las correspondientes dicetopiperacinas con estereoquímica LD y DL. La comparación directa demostró que las naturales son los enantiómeros DD. Así pues Z54 es ciclo(D)-prolina-(D)-Isoleucina, Z56 es ciclo(D)-prolina-(D)-Leucina, Z57 es ciclo(D)-prolina-(D)-valina, Z59 es ciclo(D)-prolina-(D)-fenilalanina, y B717 es ciclo(D)-trans-4-hidroxi prolil- (D)- fenilalanina.

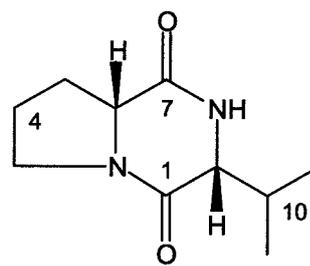
## Estructuras de los compuestos aislados



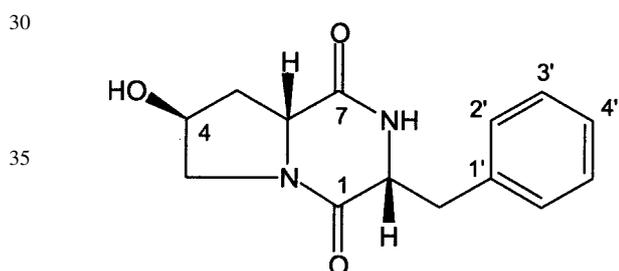
Ciclo(D-Pro-D-Phe): Z59



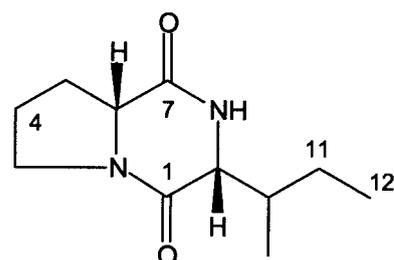
Ciclo(D-Pro-D-Leu): Z54



Ciclo(D-Pro-D-Val): Z57



Ciclo(D-trans-4-hidroxiprolinil-D-fenilalanina): B717



Ciclo(D-Pro-D-Ile): Z56

En las tablas 1, 3 y 4 se muestran los datos de RMN de protón, carbono y de E. de masas de los antibióticos aislados de las cepas bacterianas.

## Actividad antibiótica de las dicetopiperacinas naturales y sintéticas

La síntesis de dicetopiperacinas con estereoquímica diversa, a partir de alfa aminoácidos permitió disponer de una amplia colección de compuestos que fueron sometidos a ensayos de su actividad antibiótica junto con las muestras naturales (Tabla 2).

Todos los antibióticos naturales (Z54, Z56, Z57, Z59 y B717) aislados de ambas cepas bacterianas CF-20 y C-148 han mostrado una fuerte actividad frente a los *Vibrios* y la flora bacteriana en general, que justifica el efecto encontrado en los cultivos larvarios iniciales. Los ensayos *in vitro* muestran una actividad ( $0,03 \leq \text{CMI} \leq 0,07$  Tabla 2), comparable o superior a la de algunos de los antibióticos utilizados actualmente en acuicultura como la oxitetraciclina ( $\text{CMI}: 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

El estudio sistemático de la actividad antibiótica de la colección de dicetopiperacinas sintetizadas y de las naturales, muestra que la actividad esta ligada esencialmente a la estereoquímica de compuesto y que en general, los isómeros DD son unas 2 veces más activos que los LD y DL, mientras que los isómeros LL son prácticamente inactivos.

65

## ES 2 204 294 B2

TABLA 2

*Concentración mínima inhibitoria (CMI;  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) frente al *V. Anguillarum* de una selección de dicetopiperacinas con estereoquímica DD, LD y DL*

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Sustancias ensayadas	CMI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
ciclo(D)-Pro-(D)-Phe: Z59	0,03
ciclo(D)-Pro-(D)-Val: Z57	0,05
ciclo(D)-Pro-(D)-Ile: Z56	0,05
ciclo(D)-Pro-(D)-Leu: Z54	0,04
ciclo(D)-trans-4-OH-Pro-(D)-Phe:B717	0,07
ciclo(D)-Val-(D)-Leu	0,05
ciclo(D)-Pro-(L)-Phe	0,1
ciclo(D)-Pro-(L)-Val	0,11
ciclo(D)-Pro-(L)-Ile	0,12
ciclo(D)-Pro-(L)-Leu	0,13
ciclo(D)-Val-(L)-Leu	0,12
ciclo(D)-Val-(L)-Leu	0,11
ciclo(L)-Pro-(D)-Phe	0,13
ciclo(L)-Pro-(D)-Val	0,14
ciclo(L)-Pro-(D)-Ile	0,11
ciclo(L)-Pro-(D)-Leu	0,12
ciclo(L)-Leu-(D)-Gly	0,11
ciclo(L)-Phe-(D)-Ser	0,13
ciclo(L)-Pro-(D)-Gly	0,12
ciclo(L)-Val-(D)-Leu	0,11
ciclo(L)-Pro-(D)-Phe	0,13
ciclo(L)-Val-(D)-Leu	0,14

40 Cuando las sustancias antibióticas activas fueron ensayadas *in vivo*, pudo comprobarse que esa actividad se mantiene y que producen una clara reducción de la flora bacteriana total y de la de los *Vibrios* y que mejoran la supervivencia de las especies cultivadas en el tanque. A modo de ejemplo, se muestra en el Gráfico 3 el resultado de los ensayos *in vivo* con larvas del molusco *Ruditapes decussatus*, de las dicetopiperacinas naturales aisladas de las cepas CF-20 y C-148. En estos experimentos, se observa que la supervivencia de las larvas aumenta en valores que van desde el 12 al 33%, siendo el compuesto más activo el Z59 y el menos activo B717, no habiendo diferencias esenciales en la actividad de los otros que se mantienen en torno al 20%.

45 La elevada mortalidad en los tanques de control muestra claramente que la flora bacteriana es la principal causa de mortalidad de las larvas tal y como indican los valores obtenidos para UFC y los cambios observados en la flora bacteriana en general y en los *Vibrio*.

50  
55  
60  
65

GRÁFICO 3

*Ensayos de actividad in vivo frente a Ruditapes decussatus*

5

10

15

20

25

30

35

40

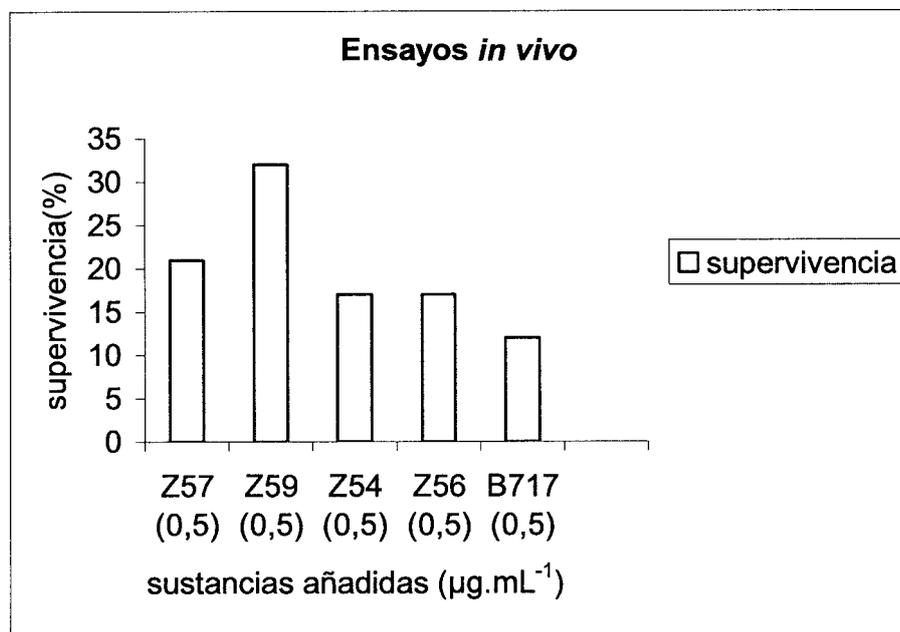
45

50

55

60

65



En realidad, la actividad antibiótica de estas sustancias es tan intensa que en cultivos tratados con los antibióticos a concentraciones tan bajas como 0,5 ppm., los *Vibrios* se reducen en más del 70%. El efecto protector que la adición de estas sustancias tiene sobre los cultivos larvarios se pone claramente de manifiesto por el hecho de que las larvas de los cultivos no tratados con los antibióticos no sobrevivieron más de cuatro días.

En contraste con lo descrito para antibióticos comerciales como cloramfenicol, florfenicol, flumequina y trimetoprim/sulfadiazina, nuestros ensayos *in vivo* muestran que las dicetopiperacinas activas no pierden su actividad por los cambios de salinidad y temperatura (Christian. M. y Guillaume. B. 2001. Minimal inhibitory concentration methodology in aquaculture : the temperature effect. Aquaculture 196, 311-318.) del medio, asociados al paso de ensayos *in vitro* a *in vivo*.

#### *Procedimiento para la utilización de los antibióticos*

##### *Tratamiento de moluscos*

Una solución conteniendo el antibiótico o mezcla de los antibióticos descritos, naturales y sintéticos, se añade al tanque al inicio del cultivo larvario de manera que la concentración final sea de 0.5-1 µg/mL. Al cabo de dos días se renueva el agua del tanque y se repone la solución antibiótica restableciéndose la concentración inicial. El proceso de renovación del agua y adición de los antibióticos se repite hasta un total de cinco veces. Al cabo de ese tiempo, (10 días) se da por finalizado el tratamiento.

##### *Tratamiento de peces y crustáceos*

- 1) Para cultivos con circulación de agua en sistema cerrado, se disminuye el agua del tanque al mínimo nivel que no afecte a las especies cultivadas, y se añade el antibiótico hasta alcanzar la concentración final antes indicada, dejándolo actuar durante 30 min con agitación, y al cabo de ese tiempo se restaura el nivel normal de agua. Este tratamiento se repite cada dos días hasta un total de entre 4-5 veces (8-10 días de tratamiento).
- 2) Para cultivos en los que el agua circule en un sistema abierto, se para el suministro de agua durante 30 min, se baja el nivel hasta el mínimo que no afecte a las especies cultivadas y se añade el antibiótico como en el caso anterior. Pasados los 30 min. se restablece la circulación de agua normal. Este proceso se repite cada dos días hasta un total de 4-5 veces (8-10 días de tratamiento).

## ES 2 204 294 B2

TABLA 3

*Datos <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de los antibióticos aislados de las cepas bacterianas: CF-20 y C-148*

Compuestos	Z59	Z57	Z56	Z54	B717
1	169.4	170.2	170.1	170.3	169.76
3	45.2	45.05	45.45	45.09	54.32
4	22.2	22.2	22.7	22.63	68.01
5	28.3	28.4	28.3	28.02	37.5
6	58.9	58.7	58.9	59.14	56.04
7	164.9	164.9	165.06	166.44	165.11
9	56.1	60.3	60.4	53.29	54.3
10	36.6	28.4	35.3	38.29	36.5
11		19.03	24.5	24.43	
12		15.9	12.06	23.19	
13			15.7	21.18	
Ar					
1'	135.8				135.70
2'	128.9				129.13
3'	127.3				129.08
4'	129.1				127.46

TABLA 4

*Datos <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de los antibióticos aislados de las cepas bacterianas: CF-20 y C-148*

H	Z59	Z57	Z56
3	3.7-3.6, 1H, m 3.6-3.5, 1H, m	3.55, 1H, dt 3.63, 1H, m	3.6-3.5, 2H, m
4	1.9-1.8, 2H, m	2.02-1.99, 1H, m 1.93-1.88, 1H, m	2.0-1.9, 1H,m; 1.9-1.8, 1H,m
5	2.4-2.3, 1H, m 2.1-2.0, 1H, m	2.4-2.3, 1H, m; 2.1-2.0, 1H, m	2.3-2.2, 1H, m; 2.1-2.0, 1H,m
6	4.08, 1H, t	4.08, 1H, dt	4.07, 1H, t
N-H	5.60, 1H, br s	5.72, 1H, dd	5.99, 1H, br s
9	4.27, 1H, dd	3.94, 1H, br s	3.96, 1H, br s
10	3.6-3.5, 1H, m 2.77, 1H, dd	2.64, 1H, m	2.4-2.3, 1H, m
11		0.91, 3H, d	1.5-1.4, 1H,m; 1.3-1.1, 1H, m
12		1.06, 3H, d	0.92, 3H, t
13			1.05, 3H, d
Ar	7.4-7.2, 5H		

# ES 2 204 294 B2

TABLA 4 (Continuación)

H	Z54	B717
3	3.6-3.5, 2H, m	3.85 (d)
4	1.94-1.86, 1H, m; 2.02-1.99, 1H, m	4.7 (t, J = 4.1 Hz)
5	2.13, 1H, m	2.3 (ddd, J = 4.1 Hz)
6	4.12, 1H, t	4.65 (dd, J = 11.1 Hz)
N-H	5.91, 1H, br s	6.1 (S)
9	4.01, 1H, dd	4.45 (dd, J= 10.7 Hz)
10	2.01, 1H, ddd	2.85 (dd)
15	1.76-1.69, 1H, m	
11	1.7-1.69, 1H, m	
12	0.94, 3H, d	
13	1.00, 3H, d	
20	Ar	7.35 (br, m)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 204 294 B2

### REIVINDICACIONES

1. Nuevos antibióticos activos, frente al *Vibrio anguillarum*, las dicetopiperacinas Z54: ciclo(D)-prolina-(D)-leucina; Z56: ciclo(D)-prolina-(D)-Isoleucina; Z57: ciclo(D)-prolina-(D)-valina; Z59: ciclo(D)-prolina-(D)-fenilalanina y B717: ciclo(D)-trans-4-hidroxi-prolinil- (D)- fenilalanina.

2. Las cepas bacterianas CF-20 (*Roseobacter galleacensis* sp) y C-148 (*Roseobacter* sp.), depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número CECT 5719 y CECT 5718, respectivamente, y **caracterizadas** por:

- 10 - Ser bacilos con colonias marrones, Gram negativas, y móviles;
- Su perfil RAPD y su hibridación con DNA de otras especies del género *Roseobacter*;
- No presentar actividad de arginina dehidrolasa, lisina descarboxilasa, ni gelatinasa;
- 15 - Ser la cepa C-148 sensible a la Ampicilina, LincoSpectina y Norfloxacin.

3. Procedimiento de cultivo de las cepas bacterianas CF-20 y C-148, según la reivindicación 2, **caracterizado** por el cultivo puro de las cepas y en cocultivo de esas cepas con *V. anguillarum* en matraces de 1.8 L con caldo marino compuesto de extracto de levadura, peptona y trazas de citrato férrico, a temperaturas de entre 4° y 35°C y pH de entre 4 y 10, con agitación orbital durante 24 horas.

4. Procedimiento de obtención de los antibióticos descritos en la reivindicación 1 a partir de las cepas descritas en la reivindicación 2 y cultivadas según la reivindicación 3, **caracterizado** por:

- 25 - Extracción selectiva del caldo marino y los lisados de los cultivos de CF- 20 y C-148.
- Obtención del extracto activo por utilización de disolventes orgánicos de distintas polaridades.
- 30 - Separación cromatográfica en silica gel del extracto activo que proporciona varias fracciones activas.
- Aislamiento por HPLC en cantidades de mg de los componentes activos puros.

5. Utilización de los antibióticos descritos en la reivindicación 1, obtenidos según la reivindicación 4 ó sintéticos y de sus isómeros DL y LD. Sólo o en combinación con otros agentes, en la preparación, de cualquier clase de forma farmacéutica, de aditivos alimentarios, de productos con microalgas, de artemia, de rotíferos, de piensos para el tratamiento de las enfermedades en cultivo de peces, crustáceos y moluscos y actividades de acuicultura.

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 204 294

② Nº de solicitud: 200201537

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.07.2002**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.7:** C07D 487/04, A61K 38/12, A61P 31/04, C12N 1/20, C12P 21/04 // (C07D 487/04, 241:00, 207:00), (C12N 1/20, C12R 1:01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ADAMCZESKI, M. et al. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, Calyx cf. podatypa. Journal of Natural Products, 1995, Vol. 58 (2), páginas 201-208.	1
X	RUIZ PONTE, C. et al. The benefit of Roseobacter species on the survival of scallop larvae. MARINE BIOTECHNOLOGY, 1999, Vol. 1, páginas 52-59.	2,3
A	DEBITUS, C. et al. Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, Suberea creba from the Coral Sea. JOURNAL OF MARINE BIOTECHNOLOGY, 1998, Vol. 6, páginas 136-141.	1-5
A	JIANG, Z. et al. Two diketopiperazines and one halogenated phenol from cultures of the marine bacterium, Pseudoalteromonas luteoviolacea. NATURAL PRODUCT LETTERS, 2000, Vol. 14 (6), páginas 435-440.	1-4
A	JAYATILAKE, G.S. et al. Metabolites from an Antarctic sponge - associated bacterium, Pseudomonas aeruginosa. J. NAT. PROD., 1996, Vol. 59, páginas 293-296.	1-4
A	US 4006261 A (PICKENHAGEN et al.) 01.02.1977, todo el documento.	1

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
22.03.2004

Examinador  
A. Polo Díez

Página  
1/1