

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 214 929**

21 Número de solicitud: 200102740

51 Int. Cl.7: **C07K 2/00**

C12P 21/00

A61K 38/02

A61K 35/66

A61P 31/04

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **11.12.2001**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2004**

Fecha de la concesión: **08.09.2005**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2005**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.10.2005**

73 Titular/es: **Universidad de Murcia**  
**Avda. Teniente Flomesta**  
**Edif. de la Convalecencia**  
**30003 Murcia, ES**

72 Inventor/es: **Sánchez Amat, Antonio y**  
**Solano Muñoz, Francisco**

74 Agente: **Temiño Cenicerros, Ignacio**

54 Título: **Compuesto con actividad antimicrobiana, procedimiento para su obtención y aplicaciones.**

57 Resumen:

Compuesto con actividad antimicrobiana, procedimiento para su obtención y aplicaciones.

El compuesto con actividad antimicrobiana presenta una estructura que contiene restos de aminoácidos y de carbohidratos, un peso molecular medio, determinado por cromatografía de permeación en gel superior a 30 kDa, precipita en etanol, es insoluble en tolueno, éter, acetona, cloroformo, y en mezclas n-butanol: ácido acético: agua (4:1:1 en volumen), es de naturaleza mayoritariamente hidrófila, resistente a la acción de las enzimas hidrolíticas proteinasa K, neuraminidasa, N-glicosidasa F y N-glicosidasa H, y tiene carga neta negativa sobre la molécula a pH neutro. Este compuesto puede ser utilizado en sanidad humana o animal, en el tratamiento de superficies y en aplicaciones biotecnológicas. Dicho compuesto puede obtenerse por fermentación de un medio de cultivo con un microorganismo del genero Marinomonas productor de dicho compuesto y recuperación de dicho compuesto del medio de cultivo.

ES 2 214 929 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Compuesto con actividad antimicrobiana, procedimiento para su obtención y aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto con actividad antimicrobiana, a un procedimiento para su obtención, y a sus aplicaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

La administración incontrolada de compuestos con actividad antimicrobiana está produciendo la aparición de cepas de microorganismos resistentes a los compuestos antimicrobianos tradicionales, por lo que sigue existiendo la necesidad de buscar nuevos compuestos con actividad antimicrobiana con el fin de incrementar el arsenal terapéutico para prevenir y combatir las infecciones causadas por dichos microorganismos. Los microorganismos pueden adherirse y colonizar superficies como, por ejemplo, implantes médicos y lentes de contacto, generando biofilms. En estas condiciones son más resistentes a los antibióticos tradicionales, por lo que son necesarios nuevos medios para su eliminación.

Ahora se ha encontrado un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina" por los inventores, producido por un microorganismo del género *Marinomonas*, en particular, *Marinomonas mediterranea*, una bacteria marina que puede ser aislada del agua de mar.

El género *Marinomonas* muestra similitudes fenotípicas con el género *Alteromonas* y, de hecho, *Marinomonas communis* y *Marinomonas vaga*, las otras dos especies del género *Marinomonas*, se denominaban anteriormente *Alteromonas communis* y *Alteromonas vaga*. Se ha descrito la producción de sustancias de interés terapéutico en algunas especies de *Alteromonas*. La patente europea EP 0 084 334 describe la producción de un polisacárido con actividad antitumoral en cultivos de una cepa de *A. vaga*, mientras que la patente norteamericana US 5.405.762 describe la producción de un compuesto antibacteriano mediante el cultivo de un microorganismo del género *Alteromonas*.

30 **Descripción detallada de la invención**

La invención proporciona un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina" por los inventores, que presenta las siguientes propiedades físico-químicas:

- 35 a) su estructura química contiene restos de aminoácidos y de carbohidratos;
- b) tiene un peso molecular medio, determinado por cromatografía de permeación en gel a través de PDX G.F.50, superior a 30 kDa;
- 40 c) precipita en etanol;
- d) es insoluble en tolueno, éter, acetona, cloroformo, y en mezclas n-butanol:ácido acético:agua (4:1:1 en volumen);
- 45 e) es de naturaleza mayoritariamente hidrófila;
- f) es resistente a la acción de las enzimas hidrolíticas proteinasa K, neuraminidasa, N-glicosidasa F y N-glicosidasa H;
- 50 g) su espectro de absorción ultravioleta (UV) presenta (i) un hombro-máximo relativo aproximadamente a 270 nm, (ii) un valle a aproximadamente 257 nm, y (iii) la absorción aumenta por debajo de 230 nm; y
- h) tiene carga neta negativa sobre la molécula a pH neutro.

55 La existencia de restos de aminoácidos y de carbohidratos en la estructura química de la Marinocina se ha puesto de manifiesto respectivamente mediante (i) la hidrólisis con HCl concentrado en caliente, liofilización y estimación de aminoácidos libres en autoanalizador con detección mediante oftaldialdehído, y (ii) el ensayo de determinación espectrofotométrica por el método del fenol-ácido sulfúrico [Ejemplo 1, apartado 1.4.1]. El máximo del color desarrollado en el ensayo de determinación espectrofotométrica por el método del fenol-ácido sulfúrico se sitúa en torno a 484 nm, es decir, en el medio entre los 489 nm propios de las hexosas y los 480 nm propios de las pentosas y los ácidos urónicos, lo que podría indicar la existencia de un oligosacárido complejo con mezcla de unidades monosacáridas distintas. La estimación de los aminoácidos libres produjo un cromatograma rico en aminoácidos con presencia de prácticamente todos los aminoácidos proteicos (con las limitaciones propias de la técnica), indicando los resultados obtenidos, en su conjunto, una naturaleza peptídica.

65 El peso molecular medio de la Marinocina se determinó por cromatografía de permeación en gel a través de PDX G.F. 50 con rango de separación entre 1,5 y 30 kDa [Ejemplo 1, apartado 1.4.2].

## ES 2 214 929 B1

Las características de solubilidad e hidrofilia de la Marinocina pueden utilizarse para su aislamiento y purificación [Ejemplo 1, apartado 1.4.3].

5 Los ensayos de resistencia a la acción de las enzimas hidrolíticas proteinasa K, neuraminidasa, N-glicosidasa F y N-glicosidasa H, se describen en el Ejemplo 1, apartado 1.4.4, mientras que los resultados de la absorción en la región UV-visible se comentan en el Ejemplo 1, apartado 1.4.5.

10 La existencia de carga negativa neta sobre la molécula de Marinocina puede ser utilizada para el aislamiento y purificación de dicho compuesto [Ejemplo 1, apartado 1.4.6].

Ensayos adicionales realizados por los inventores pusieron de manifiesto que la Marinocina es estable en distintas condiciones de temperatura y pH [Ejemplo 1, apartado 1.4.7].

15 La Marinocina está presente en el caldo de cultivo de microorganismos pertenecientes al género *Marinomonas*, en particular, *Marinomonas mediterranea*, de donde puede ser obtenida por extracción. En determinadas condiciones de cultivo, dicho microorganismo sintetiza y excreta un compuesto con actividad antimicrobiana, efectivo frente a un amplio rango de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, así como frente a una variedad de cepas de *E. coli* que contienen plásmidos de resistencia a varios antibióticos comunes incluyendo  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos y cloranfenicol [Ejemplo 2], lo que indica una estructura diferente a la de dichos antibióticos, y, por ello, ha sido denominado "Marinocina" por los inventores. A partir de sus propiedades físico-químicas, dicho compuesto parece tener naturaleza aniónica macromolecular y contener en su estructura química tanto restos de aminoácidos como de carbohidratos, lo que parece sugerir que constituye un antibiótico distinto de los conocidos hasta ahora.

25 Por tanto, la Marinocina puede ser obtenida mediante un procedimiento que comprende cultivar un microorganismo perteneciente al género *Marinomonas* capaz de producir Marinocina, y aislar dicho compuesto del medio de cultivo.

De forma más concreta, un microorganismo perteneciente al género *Marinomonas*, con la capacidad de producir Marinocina, se cultiva en un medio de cultivo apropiado, bajo condiciones que permiten la producción de dicho compuesto y su excreción al medio de cultivo.

30 El microorganismo productor de Marinocina puede ser cualquier microorganismo perteneciente al género *Marinomonas*, que posea la capacidad de producir Marinocina, por ejemplo, microorganismos de la especie *M. mediterranea*. Estos microorganismos son bacterias marinas que pueden ser aisladas del agua de mar e identificadas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular, el microorganismo utilizado es la cepa MMB-1 de *M. mediterranea* (CECT 4803, ATCC 700492), una cepa aislada del agua de mar de la costa murciana del Mar Mediterráneo [Solano F., García E., Pérez de Egea E., y Sanchez-Amat A. (1997) Isolation and characterization of strain MMB-1 a novel melanogenic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3499-3506].

40 El medio de cultivo comprende una o más fuentes de carbono, una o más fuentes de nitrógeno, una o más sales inorgánicas asimilables por el microorganismo, y, si es necesario, uno o más nutrientes orgánicos, tales como vitaminas y aminoácidos, disueltos en un medio acuoso, por ejemplo, agua de mar, tanto natural como artificial. Como fuente de carbono puede utilizarse cualquier fuente de carbono apropiada, por ejemplo, glucosa, manosa, citrato, malato o glicerol, en una cantidad comprendida entre 0,02% y 2% en peso respecto al medio de cultivo. Como fuente de nitrógeno pueden utilizarse tanto compuestos orgánicos, tales como aminoácidos, por ejemplo, glutamato o extracto de levadura, como compuestos inorgánicos, tales como cloruro amónico, en una cantidad comprendida entre 0,01 y 1 g/l. Por su carácter marino, a los medios de cultivo se les debe añadir cloruro sódico, típicamente entre 1 y 10% en peso respecto al total; en medios inorgánicos se pueden adicionar otras sales, por ejemplo, fosfatos, sulfato de hierro, sulfato de cobre, etc. En general, puede utilizarse cualquier medio de cultivo que contenga los ingredientes esenciales para el crecimiento del microorganismo.

50 La síntesis de Marinocina está favorecida, en general, en medios marinos químicamente definidos y pobres en nutrientes, tal como el medio mínimo marino (MMM). La adición de L-tirosina al medio no afecta significativamente la síntesis de Marinocina, mientras que la adición de sustratos complejos, tales como extractos de levadura o hidrolizados de proteínas, inhiben su formación. En una realización particular, dicho medio de cultivo es el medio mínimo marino (MMM) [véase el Ejemplo 1, apartado 1.1].

60 El cultivo del microorganismo se puede realizar bajo aireación con agitación. La temperatura del cultivo se selecciona dentro del intervalo de temperatura que permite un buen crecimiento del microorganismo productor de Marinocina y producir dicho compuesto. En una realización particular, la temperatura del cultivo está comprendida entre 8°C y 30°C. El cultivo se mantiene, ventajosamente, hasta que se acumula una cantidad suficiente de Marinocina en el medio de cultivo. En una realización particular, el cultivo se mantiene durante un periodo de tiempo comprendido entre 16 y 60 horas.

65 El cultivo del microorganismo se puede realizar en dos etapas, en una primera etapa se siembra el microorganismo para hacer crecer la masa celular, para lo cual se cultiva el microorganismo en el medio de cultivo en las condiciones apropiadas, y, a continuación, en una segunda etapa, inóculos de la masa celular procedente de la etapa de siembra se llevan a un fermentador que contiene un medio de cultivo que comprende los nutrientes apropiados para el crecimiento del microorganismo y la producción de Marinocina.

## ES 2 214 929 B1

En una realización particular, la fermentación del medio de cultivo con *M. mediterranea* se realiza en condiciones de aireación, con agitación, a una temperatura comprendida entre 8°C y 30°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 16 y 60 horas aproximadamente. En estas condiciones, *M. mediterranea* produce Marinocina y lo excreta al medio de cultivo. Aunque la Marinocina aparece mayoritariamente en el sobrenadante del cultivo, también se encuentra actividad antimicrobiana en la fracción soluble de los extractos celulares y no sedimenta en la fracción membranosa.

Diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que la Marinocina se forma durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, cuando los cultivos sufren un fuerte descenso en el número de unidades tomadoras de colonias por mililitro (ufc/ml), lo que podría estar relacionado con el hecho de que es autotóxica para la propia *M. mediterranea*.

Los cultivos líquidos se realizan a temperaturas comprendidas entre 8°C y 30°C y en condiciones aerobias.

La Marinocina presente en el medio de cultivo puede aislarse por métodos convencionales. En una realización particular, el cultivo celular se centrifuga a 4.000 g durante 30 minutos para separar el sobrenadante y el extracto celular. El sobrenadante se utiliza para aislar y, si se desea, purificar la Marinocina.

El estudio de las características físico-químicas de la Marinocina ha permitido diseñar un procedimiento para su purificación a partir del sobrenadante de un cultivo celular productor de dicho antibiótico [Ejemplo 1, apartado 1.3], que comprende las etapas de:

- precipitación de la Marinocina con etanol,
- redisolución de la Marinocina en tampón fosfato 0,1 M, pH 5-7, en un volumen 15 veces menor al volumen original del sobrenadante,
- eliminación de las sales precipitadas por centrifugación,
- cromatografía en DEAE-Sephadex y elución con NaCl, con detección de las fracciones activas,
- concentración en filtros de tamaño de poro controlado (10-30 kDa);
- cromatografía en PDX G.F. 50 con tampón fosfato 0,1 M, pH 5-7 como fase móvil, con detección de las fracciones activas; y
- concentración de las fracciones activas en tubos con membranas de tamaño de poro comprendido entre 10 y 50 kDa.

La detección de las fases activas puede llevarse a cabo realizando un antibiograma según el protocolo descrito en el Ejemplo 1, apartado 1.2.

La Marinocina tiene actividad antimicrobiana, en particular, antibiótica, y puede ser utilizada en sanidad humana y/o animal para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos, en particular, bacterias. La Marinocina también puede ser utilizada en el tratamiento de superficies para evitar o tratar su posible contaminación así como en aplicaciones biotecnológicas. La Marinocina ha demostrado su actividad frente a diferentes microorganismos, en particular, bacterias, tanto Gram positivas, por ejemplo, *Staphylococcus sp.* (incluyendo cepas resistentes a meticilina), *Bacillus sp.*, *Streptomyces*, etc., como Gram negativas, por ejemplo, *Pseudomonas* (aislados hospitalarios resistentes a ceftazidima e imipenem), *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio Harveyi* y *M. mediterranea*, así como frente a cepas de *E. coli* que contienen plásmidos de resistencia a antibióticos comunes incluyendo  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos y cloranfenicol [Ejemplo 2].

La invención proporciona, por consiguiente, una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Marinocina junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica es adecuada para la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos, especialmente bacterias.

La Marinocina puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada. En cada caso, los vehículos farmacéuticamente aceptables se elegirán en función de los excipientes y aditivos adecuados para la forma farmacéutica de administración de Marinocina seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En otro aspecto, la invención se refiere al empleo de Marinocina en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos, en particular, bacterias.

La Marinocina también puede utilizarse en el tratamiento de superficies, con excepción de las superficies del cuerpo humano o animal (cuyo tratamiento está contemplado mediante el empleo de las composiciones farmacéuticas proporcionadas por esta invención), con el fin de prevenir o evitar la contaminación causada por microorganismos

sensibles a Marinocina y/o de desinfectar dichas superficies. A modo ilustrativo, dichas superficies incluyen tanto superficies total o mayoritariamente inorgánicas, por ejemplo, metálicas, como total o mayoritariamente orgánicas, por ejemplo, poliméricas. Ejemplos particulares de superficies que pueden ser tratadas incluyen equipos, instrumentos, aparatos, objetos, conducciones, etc.

5 Por tanto, la invención proporciona, además, una composición para el tratamiento de dichas superficies que comprende Marinocina, en una cantidad eficaz para la realización de dicho tratamiento, junto con un vehículo aceptable. Dicha composición para el tratamiento de superficies puede ser utilizada en la higiene y/o desinfección de dichas superficies. Los vehículos que pueden utilizarse en la formulación de dicha composición incluyen el agua y demás  
10 excipientes o aditivos habitualmente utilizados en la formulación de composiciones para el tratamiento (higiene y/o desinfección) de superficies.

La invención también proporciona un método para el tratamiento, incluyendo la higiene y/o desinfección, de superficies, con excepción de las superficies del cuerpo humano o animal, que comprende el empleo de Marinocina o de una composición que la contiene. De forma más concreta, dicho método comprende la aplicación de Marinocina o de una composición que la comprende, en una cantidad adecuada, sobre la superficie a tratar. En una realización particular, la Marinocina puede ser aplicada sobre dicha superficie en forma de solución acuosa, por cualquier medio convencional, por ejemplo, mediante pulverización, inyección o impregnación, con ayuda de un aplicador adecuado, o bien mediante inmersión de la superficie a tratar en un baño que contiene la solución de Marinocina.  
15  
20

En otro aspecto, debido a la capacidad de la Marinocina de inhibir el crecimiento de microorganismos, dicho compuesto puede ser utilizado en aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, como marcador a nivel molecular.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.  
25

#### Ejemplo 1

##### *Producción y caracterización de Marinocina*

###### 30 1.1 *Producción de Marinocina*

La cepa MMB-1 de *M. mediterranea* (CECT 4803) se mantuvo usualmente en el medio 2216 (Difco). Para la producción de Marinocina, un cultivo de dicha cepa se cultivó a 25°C, con agitación (130 rpm), en un medio mínimo marino MMM [MMM contiene (por litro) : 20 g de NaCl, 7 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5,3 g de MgCl<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0,7 g de KCl, 1,25 g de CaCl<sub>2</sub>, 25 mg de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5 mg de CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 75 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g de glutamato sódico y 6,1 g de Tris-base; el pH se ajustó a 7,4], y de ahí se inoculó a una densidad óptica inicial de 0,05 en el mismo medio, manteniéndose a la misma temperatura y agitación orbital durante aproximadamente 48 h.  
35

Los cultivos celulares fueron centrifugados en tubos Sorvall a 4.000 g durante 30 minutos con el fin de obtener los sobrenadantes y los extractos celulares. Los sobrenadantes se emplearon para la obtención de Marinocina.  
40

###### 1.2 *Antibiograma y valoración de la concentración de antibiótico*

Los antibiogramas se realizaron de forma convencional en placas de Mueller-Hinton con el 1% de NaCl utilizando como microorganismo test la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . Brevemente, un volumen de 20  $\mu$ l de la muestra cuya actividad antimicrobiana se desea ensayar se añadió a discos de antibiograma de 6,35 mm (3 de pulgada) de diámetro y, tras unos minutos para una impregnación uniforme y semisecado, se depositó sobre una placa de agar sembrada con un césped de la cepa test. La placa se incubó a 25°C y después de 24 h se midió la actividad antibiótica por el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco impregnado de la solución de antibiótico. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que existe una correlación entre el diámetro del halo y la cantidad de compuesto en un intervalo de dilución de la preparación de, al menos, 75 veces. En ese intervalo, la representación semilogarítmica entre cantidad de antibiótico y diámetro del halo de inhibición es lineal.  
45  
50

###### 55 1.3 *Purificación de Marinocina*

La Marinocina se purificó mediante un protocolo, diseñado a la vista de sus propiedades físico-químicas, que comprende:

60 a) separación del sobrenadante de un cultivo celular de *M. mediterranea* en medio MMM por centrifugación a 4.000 g durante 30 minutos;

b) adición de etanol al 70% a los sobrenadantes y redisolución en tampón fosfato 0,1 M, pH 7, en un volumen 15 veces menor al volumen original del sobrenadante, seguido de centrifugación para eliminar el precipitado de sales;

65 c) cromatografía en DEAE-Sephadex y elución con NaCl, con detección de las fracciones activas, seguido de concentración en filtros Millipore de tamaño de poro controlado (10-50 kDa);

## ES 2 214 929 B1

d) cromatografía en PDX G.F. 50 empleando tampón fosfato 0,1 M, pH 7, como fase móvil, con detección de las fracciones activas; y

5 e) concentración de las fracciones activas en tubos Centricón (Millipore) con membranas de tamaño de poro comprendido entre 10 y 50 kDa.

### 1.4 Propiedades físico-químicas

10 La Marinocina resultante, obtenida mediante el procedimiento descrito en los apartados 1.1 ó 1.3, presenta las propiedades físico químicas que se mencionan a continuación, Los métodos seguidos para determinar dichas características son convencionales y conocidos por los técnicos en la materia. Una revisión de tales métodos puede encontrarse, por ejemplo, en Short Protocols in Molecular Biology, 4<sup>th</sup> edition, edited by F.M. Ausubel *et al.*, J. Wiley & Sons, New York, 1999; Gel-filtration chromatography, section 10-6; Ion-exchange chromatography, section 10-7.

#### 15 1.4.1 Grupos funcionales

1. El ensayo de determinación espectrofotométrica mediante el método del fenol-ácido sulfúrico [Dubois, B, Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Anal. Chem., 28, 350] es positivo, lo que indica la presencia de carbohidratos en su molécula. El máximo del color desarrollado está en 484 nm, es decir, en el medio entre los 489 nm propios de las hexosas y los 480 nm propios de las pentosas y los ácidos urónicos [determinación de glicopéptidos (Methods Enzymol., Hirs, Vol. 11, pp 411-413)], lo que podría indicar la existencia de un oligosacárido complejo con mezcla de unidades monosacáridas distintas.

25 2. La hidrólisis con HCl concentrado en caliente (2 h, 100°C, HCl 5,7 M) seguida de liofilización y estimación de aminoácidos libres en autoanalizador con detección mediante o-ftadialdehído produjo un cromatograma rico en aminoácidos con presencia de prácticamente todos los aminoácidos proteicos. No se pudo determinar Pro, Cis y Trp por la imposibilidad en estas condiciones técnicas. Los pares Asp+Asn y Glu+Gln se valoraron de forma conjunta en la forma ácida por las condiciones de hidrólisis. Los resultados obtenidos, en conjunto, indican una naturaleza peptídica. Entre los aminoácidos más abundantes se encuentran Asp, Ser, Thr y Leu. Cuando se hidrolizan fracciones cercanas al máximo, existe un paralelismo entre actividad antibiótica y cantidad de aminoácidos en el hidrolizado.

#### 35 1.4.2 Tamaño

El elevado tamaño molecular de la Marinocina determinado por los ensayos realizados indica la naturaleza macromolecular de dicho compuesto, ya que:

40 S no es dializable en membranas de nitrocelulosa Spectrator de tamaño de poro comprendido entre 8 y 12 kDa;

S no es ultrafiltrable por centrifugación en tubos Centricón Millipore con membranas de tamaño de poro comprendido entre 10 y 50 kDa [la actividad antimicrobiana queda totalmente retenida en el concentrado no filtrable; la retención no parece ser debida a posibles adsorciones sobre la membrana ya que se produce tanto en condiciones de alta concentración salina (NaCl 1 M) como en presencia de detergentes no fónicos (Igepal CA-630 1%) que minimizan las interacciones electrostáticas e hidrófobas, respectivamente]; y

45 S la cromatografía de permeación en gel a través de Sephadex-PDX G.F. 50 con rango de separación entre 1,5 y 30 kDa, muestra que el antibiótico se excluye en este sistema lo que indica un peso molecular medio superior a 30 kDa.

#### 50 1.4.3 Solubilidad e hidrofilia

Los ensayos de solubilidad e hidrofilia pusieron de manifiesto la naturaleza mayoritariamente hidrófila de la Marinocina ya que:

55 S precipita de forma prácticamente cuantitativa en etanol al 66%, tras añadir etanol absoluto a extractos en tampón fosfato 0,1 M, pH 5-7 (relación de volúmenes 2:1) [el sedimento se obtiene por centrifugación a 14.000 g durante 20 minutos y tiene un aspecto entre grisáceo y blanquecino, dicho sedimento se redissuelve bien en el mismo tampón acuoso, en volúmenes 15 veces menores del original, lo que puede utilizarse para purificar y concentrar el antibiótico a partir de extractos crudos];

60 S es insoluble en disolventes orgánicos tales como el tolueno, éter, acetona y cloroformo [en algunos casos, el intento de extracción con estos disolventes produjo una merma parcial de la actividad remanente en la fase acuosa]; se produjo una cierta solubilización en fase fenólica al intentar este tipo de extracción;

65 S no es soluble en mezclas n-butanol:ácido acético:agua (4:1:1 en volumen), utilizadas para una cromatografía en capa fina sobre acetato de celulosa, mostrando un  $R_f$  igual a cero; y

## ES 2 214 929 B1

S no se une a soportes inmovilizados hidrófobos, tales como fenil-Sepharosa.

### 1.4.4 Resistencia frente a enzimas hidrolíticas

5 Los ensayos de resistencia frente a diversos enzimas hidrolíticos pusieron de manifiesto que la Marinocina:

S es resistente a la acción de proteinasa K (5 mg/ml) a 37°C durante 24 h en tampón fosfato, pH 7,0 [esta resistencia indica que, en caso de tener naturaleza peptídica, su estructura no es convencional];

10 S mantiene la actividad antimicrobiana estable en presencia de neuraminidasa (1 U) a 37°C durante 2 h en tampón acetato 0,1 M, pH 5,0; y

S es estable frente a N-glicosidasas (tanto F como H) en condiciones no desnaturizantes, siguiendo el protocolo de ensayo descrito por el suministrador de las glicosidasas (Boehringer Mannheim).

15

### 1.4.5 Espectro UV-Visible

La Marinocina apenas absorbe en el visible. Por el contrario, presenta un hombro-máximo relativo aproximadamente a 270 nm y un valle sobre los 257 nm, para rápidamente dispararse la absorción en el UV más lejano, por debajo de los 230 nm.

20

### 1.4.6 Carga

Los ensayos realizados ponen de manifiesto que la Marinocina:

25

S presenta una fuerte unión a DEAE-Sephadex tanto a pH 5 como a pH 7, indicativa de la existencia de una carga negativa neta sobre la molécula; a pH 7 la elución se realiza con concentraciones salinas altas, por ejemplo, NaCl entre 0,7 y 0,8 M [esta propiedad puede utilizarse para purificar la Marinocina por cromatografía de intercambio iónico];

30

S no se une a CM-Sephadex ni a pH 5 ni a pH 7, lo que indica la ausencia de zonas cargadas con carga positiva capaces de interactuar con el soporte; y

35

S no tiene afinidad por lectinas, tales como, por ejemplo, Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (judía) y aglutinina HPA de *Helix pomatia* (caracol comestible), inmovilizadas en agarosa [las afinidades de estas lectinas sobre residuos terminales  $\alpha$ -manósido y N-acetil-galactosamina indican que tales residuos no se encuentran en los extremos terminales de la posible fracción glicídica existente en la Marinocina si se tienen en cuenta los resultados obtenidos en otros ensayos (véase, por ejemplo, el ensayo del fenol-ácido sulfúrico)].

40

### 1.4.7 Estabilidad frente al pH y la temperatura

Los ensayos de estabilidad frente a pH y temperatura pusieron de manifiesto que la Marinocina:

45

S es estable, al menos, durante 6 meses, cuando se mantiene congelada a -20°C o refrigerada (4°C);

S mantenida a 37°C durante 24 ó 48 h, no solo es estable y conserva la actividad antimicrobiana sino que incluso la aumenta en valores de, aproximadamente, el 25%;

50

S la estabilidad a temperaturas superiores a 37°C depende del pH en el que se encuentre;

S a valores de pH ácidos, desde pH 2 hasta pH 5, es estable durante, al menos, 2 días a 37°C y durante, al menos, 2 h a 70°C;

55

S a valores de pH mayores de 9 se inactiva en menos de 2 h a 70°C; y

S a valores de pH mayores de 12 pierde su actividad incluso a temperatura ambiente.

## Ejemplo 2

60

### *Espectro de actividad biológica*

#### 2.1 Rango de actividad

65

Para determinar el rango de actividad se siguió el protocolo descrito en el Ejemplo 1, apartado 1.2, debidamente adaptado para cada microorganismo ensayado.

La Marinocina muestra una fuerte acción sobre diferentes microorganismos procariotas, tanto Gram positivos co-

## ES 2 214 929 B1

mo Gram negativos (Tabla 1). La única cepa procariota resistente entre las ensayadas fue una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que también muestra resistencia a diversos antibióticos tales como la ampicilina o la tetraciclina, mediante mecanismos que no han sido caracterizados. Sin embargo, la Marinocina tiene efecto contra una serie de cepas de *Escherichia coli* con plásmidos de resistencia a ampicilina (Amp), estreptomycin (Sm), cloranfenicol (Cm), kanamicina (Km), gentamicina (Gm) y tetraciclina (Tc), lo que indica que su estructura es diferente a la de todos estos tipos de antibióticos. No se ha observado un efecto apreciable sobre los hongos, tanto mohos como levaduras, ensayados.

TABLA 1

*Rango de actividad de Marinocina*

10

	Cepa ensayada		Sensibilidad
15	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Gram (-)	+
	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con plásmidos de resistencia a Amp, Km, Gm, Sm, Cm y Tc	Gram (-)	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	Gram (+)	+
20	<i>Staphylococcus sp.</i>	Gram (+)	+
	<i>Bacillus sp.</i>	Gram (+)	+
25	<i>Vibrio cholerae</i>	Gram (-)	+
	<i>Marinomonas mediterranea</i>	Gram (-)	+
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gram (-)	+
30	<i>Vibrio harveyi</i>	Gram (-)	+
	<i>Pseudomonas sp.</i> Ceftazidima <sup>®</sup>	Gram (-)	+
35	<i>Pseudomonas sp.</i> Imipenem <sup>®</sup>	Gram (-)	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram (-)	-
	<i>Streptomyces</i>	Gram (+)	+
40	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Levadura	-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	-
45	<i>Penicillium</i>	Hongo	-

### 2.2 Mecanismo de acción

La Marinocina muestra actividad bactericida, tal como se ha observado mediante seguimiento de los recuentos de viables de *E. coli* K-12 en medio líquido suplementado con el antibiótico. Asimismo, utilizando el mismo microorganismo, los métodos de dilución seriada en tubos con medio LB a 35°C y posterior siembra en placa han mostrado que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) coincide con la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Valorando el contenido en aminoácidos, mediante el empleo de un autoanalizador de aminoácidos, de las muestras con antibiótico, la CMI corresponde a aproximadamente 500 ng/ml de proteína [L. Martínez Martínez, 1999 "Métodos de estudio y valoración de los antimicrobianos", en "Antimicrobianos en medicina", J.E. García-Sánchez, R. López y J. Prieto (eds). Sociedad Española de Quimioterapia, pp 99-107]. Por otra parte, al cargar discos de antibiograma con 200 ng de proteína se obtienen halos de 15 mm.

La acción de la Marinocina parece provocar un fuerte aumento de la respiración bacteriana, medida como consumo de oxígeno, antes de la muerte celular. Este hecho y su tamaño molecular sugieren que actúa a nivel de la membrana celular. No se activa por Ca<sup>2+</sup> ni por EDTA, aunque parece favorecerse un poco por la presencia de Na<sup>+</sup>. La adición de catalasa tiene un efecto protector, lo que sugiere una acción bactericida dependiente del metabolismo aerobio.

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina", **caracterizado** porque presenta las siguientes propiedades físico-químicas:

a) su estructura química contiene restos de aminoácidos y de carbohidratos;

b) tiene un peso molecular medio, determinado por cromatografía de permeación en gel a través de PDX G.F.50, superior a 30 kDa;

c) precipita en etanol;

d) es insoluble en tolueno, éter, acetona, cloroformo, y en mezclas n-butanol:ácido acético:agua (4:1:1 en volumen);

e) es de naturaleza mayoritariamente hidrófila;

f) es resistente a la acción de las enzimas hidrolíticas proteinasa K, neuraminidasa, N-glicosidasa F y N-glicosidasa H;

g) su espectro de absorción ultravioleta (UV) presenta (i) un hombro-máximo relativo aproximadamente a 270 nm, (ii) un valle a aproximadamente 257 nm, y (iii) la absorción aumenta por debajo de 230 nm; y

h) tiene carga neta negativa sobre la molécula a pH neutro.

2. Un procedimiento para la obtención de un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina", según la reivindicación 1, que comprende cultivar un microorganismo perteneciente al género *Marinomonas* capaz de producir Marinocina, y aislar dicho compuesto del medio de cultivo.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho microorganismo perteneciente al género *Marinomonas* capaz de producir Marinocina, se cultiva en un medio de cultivo que comprende una o más fuentes de carbono, una o más fuentes de nitrógeno, una o más sales inorgánicas asimilables, por el microorganismo productor de Marinocina, y, si es necesario, uno o más nutrientes orgánicos, disueltos en un medio acuoso que comprende agua de mar, natural o artificial, bajo condiciones de aireación con agitación, a una temperatura que permite el crecimiento de dicho microorganismo productor de Marinocina y la producción de dicho compuesto, y la Marinocina producida y acumulada en el medio de cultivo se aísla.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho microorganismo perteneciente al género *Marinomonas* capaz de producir Marinocina se cultiva a una temperatura comprendida entre 8°C y 30°C.

5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha Marinocina se recupera del medio de cultivo mediante centrifugación; precipitación con etanol; redisolución en tampón fosfato; separación por cromatografía en DEAE-Sephadex y elución con NaCl; concentración en filtros de tamaño de poro comprendido entre 10 y 50 kDa; cromatografía en PDX G.F. 50 con tampón fosfato como fase móvil; y concentración en tubos con membrana de tamaño de poro comprendido entre 10 y 50 kDa.

6. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho microorganismo perteneciente al género *Marinomonas* capaz de producir Marinocina es *M. mediterranea*.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho microorganismo perteneciente al género *Marinomonas* capaz de producir Marinocina es *M. mediterranea* cepa MMB-1 (CECT 4803).

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina", según la reivindicación 1, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. Empleo de un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina", según la reivindicación 1, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por bacterias.

10. Una composición para el tratamiento de superficies, con excepción de las superficies del cuerpo humano o animal, que comprende un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina", según la reivindicación 1, en una cantidad eficaz para la realización de dicho tratamiento, junto con un vehículo aceptable.

11. Un método para el tratamiento de superficies, con excepción de las superficies del cuerpo humano o animal, que comprende aplicar un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina", según la reivindicación 1, o una composición según la reivindicación 10, en una cantidad adecuada, sobre la superficie a tratar.

## ES 2 214 929 B1

12. Un marcador a nivel molecular, para aplicaciones biotecnológicas, que comprende un compuesto con actividad antimicrobiana, denominado "Marinocina", según la reivindicación 1.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 214 929

② Nº de solicitud: 200102740

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.12.2001

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C07K 2/00, C12P 21/00, A61K 38/02, 35/66, A61P 31/04

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BARJA J.L. et al. Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine <i>Alteromonas</i> species. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> , 1989, Vol. 33 (10), páginas 1674-1679.	1-12
A	MCCARTHY et al. Characterization of an antibiotic produced by <i>Alteromonas luteoviolacea</i> Gauthier 1982, 85 isolated from Kinko Bay, Japan. <i>Journal of Applied Bacteriology</i> , 1994, Vol. 77, páginas 426-432.	1-12
A	BALLESTER et al. Isolation and characterization of a high molecular weight antibiotic produced by a marine bacterium. <i>Microbial Ecology</i> , 1977, Vol. 3, páginas 289-303.	1-12
A	SAKATA, T. et al. Antibiotic production by marine pigmented bacteria - II. Purification and characterization of antibiotic substance of <i>Alteromonas luteoviolacea</i> . <i>Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.</i> , 1986, Vol. 35 (1), páginas 29-37.	1-12
A	MIKHAILOV V.V. e IVANOVA E.P. Bacteria of the genus <i>Alteromonas</i> : Systematics and physiologically active compounds. <i>Russian Journal of Marine Biology</i> , 1994, Vol. 20 (3), páginas 129-135.	1-12

#### 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

23.08.2004

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/1