

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 585 929**

21) Número de solicitud: 201600484

51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C07D 493/10 (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22) Fecha de presentación:

07.06.2016

43) Fecha de publicación de la solicitud:

10.10.2016

71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE OVIEDO (70.0%)
C/ San Francisco 3
33003 Oviedo (Asturias) ES;
HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE
ASTURIAS (20.0%) y
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CABUEÑES
(10.0%)

72) Inventor/es:

FERNÁNDEZ BRAÑA , Alfredo Javier;
BLANCO BLANCO , María Gloria ;
GARCÍA DÍAZ , Luis Arsenio ;
SARMIENTO VIZCAINO , Aida ;
PALACIOS GUTIÉRREZ , Juan José ;
OTERO GUERRA , Luis ;
FERNÁNDEZ SUÁREZ , Jonathan ;
REYES BENÍTEZ , José Fernando ;
PÉREZ-VICTORIA MORENO DE BARREDA ,
Ignacio y
MARTÍN SERRANO , Jesús Melchor

54) Título: **Cepa bacteriana de pseudonocardia carboxydivorans productora de branimicinas y branimicinas producidas por la misma**

ES 2 585 929 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 929**

21 Número de solicitud: 201600484

57 Resumen:

Cepa bacteriana de *Pseudonocardia carboxydivorans* productora de branimicinas y branimicinas producidas por la misma.

La invención proporciona una nueva cepa bacteriana de *Pseudonocardia carboxydivorans* que ha sido aislada de su medio natural y depositada en la colección española de cultivos tipo bajo el número de acceso 9108, la cual es capaz de producir eficientemente por fermentación compuestos antibióticos de la familia de las branimicinas. Concretamente, esta cepa es productora de dos nuevas branimicinas, designadas en la presente invención como branimicinas B y C, que presentan actividad antibiótica o antibacteriana in vitro e in vivo frente a bacterias patógenas, preferiblemente humanas, tanto Gram positivas como Gram negativas, preferiblemente resistentes a los antibióticos de uso habitual.

ES 2 585 929 A1

DESCRIPCIÓN

Cepa bacteriana de *Pseudonocardia carboxydivorans* productora de branimicinas y branimicinas producidas por la misma.

5

La presente invención se encuadra dentro del campo de la microbiología clínica, específicamente dentro de las cepas bacterianas productoras de antibióticos macrólidos de la familia de las branimicinas. La invención también se refiere a las branimicinas producidas y a composiciones farmacéuticas que las comprenden, las cuales son útiles para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas provocadas por bacterias patógenas, preferiblemente por bacterias patógenas humanas, más preferiblemente resistentes a antibióticos.

10

Estado de la técnica

15

Las branimicinas son nuevos antibióticos que estructuralmente pertenecen a la familia de antibióticos macrólidos conocidos como nargenicinas, con actividad antimicrobiana principalmente contra *Staphylococcus aureus*. Las nargenicinas, y branimicinas, tienen una estructura tricíclica con un anillo lactona de 9 o 10 miembros y contienen un único puente éter. En 1977, la familia de antibióticos nargenicina fue aislada por Pfizer y Upjohn tras la fermentación aeróbica de *Nocardia argentinensis* ATCC 31306. Uno de estos compuestos, nargenicina A1, fue posteriormente patentado y su estructura fue elucidada (W. D. Celmer, *et al.*, 1980, J. Am. Chem. Soc. 102: 4203-4209). Aunque se demostró su actividad antibacteriana *in vitro*, esta se restringía a bacterias Gram-positivas de la especie *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) También se demostró que la nargenicina A1 induce diferenciación celular y puede ser usada, por tanto, como posible tratamiento en enfermedades neoplásicas.

20

25

La primera branimicina fue aislada del Actinomycete GW 60/1571, según ha sido descrito en Org Lett. 2016 Feb 19; 18(4):780-3. doi: 10.1021/acs.orglett.6b00044.. Desde entonces, ha habido un gran interés en esta nueva molécula y han sido desarrolladas varias síntesis orgánicas de la misma (Marchat *et al.*, 2010, Angew Chemie Int Ed Engl. 49: 2050-2053; Enev *et al.*, 2012, Chem Eur J 18: 9651-9668). Recientemente, ha sido descrita la síntesis química de miembros adicionales de la familia (WO2015028095A1), demostrando distintas actividades antibióticas contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptomyces viridochromogenes*. Dicho trabajo también describe la actividad antibiótica que presentan las branimicinas *in vivo* en modelos de infección animal, lo que demuestra su eficacia en el tratamiento de infecciones *in vivo* particularmente por vía oral.

30

35

40

Los ambientes marinos están emergiendo como una fuente de nuevos productos naturales de importancia farmacológica. Los océanos constituyen más del 70% de la superficie de nuestro planeta, de los cuales el 92-93% son profundidades marinas, mientras que la región costera representa solamente un 7-8%. En las profundidades marinas, se estima que el 60% es agua de más de 2000 m de profundidad. Se trata de un ambiente extremo con alta presión, baja temperatura, oscuridad, alta salinidad y baja concentración de oxígeno. A pesar de ello, las profundidades marinas se han revelado como una fuente que merece ser investigada para el descubrimiento de nuevos antibióticos (Bull *et al.*, 2000, Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 573-606). Los hábitats de aguas profundas son, por tanto, fuentes de descubrimiento de productos naturales esencialmente inexploradas.

45

50

- Trabajos anteriores en el mar Cantábrico (Bahía de Vizcaya), Atlántico Noreste, han revelado que actinobacterias bioactivas, principalmente especies de *Streptomyces*, están asociadas a corales y otros invertebrados que viven hasta a 4700 m de profundidad en el cañón submarino de Avilés (Braña *et al.*, 2015, *Microb Ecol* 69: 512-524; Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2015, *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 1328-1334). Una nueva actinobacteria, *Myceligenans cantabricum*, se ha aislado de un coral solitario (escleractinia) en aguas de 1500 m de profundidad (Sarmiento-Vizcaíno *et al.*, 2015, *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 1328-1334).
- En resumen, debido a la creciente aparición en el ámbito clínico de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos de uso actual, se hace necesaria la obtención de nuevos antibióticos con potencial biomédico en el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas tanto Gram positivas como Gram negativas. Asimismo, es necesario disponer de procedimientos simples, cortos y económicos para la obtención de dichos compuestos con actividad antibacteriana.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una nueva cepa bacteriana de *Pseudonocardia carboxydivorans* que ha sido aislada de su medio natural y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso 9108, la cual es capaz de producir eficientemente por fermentación compuestos antibióticos de la familia de las branimicinas. Concretamente, esta cepa es productora de dos nuevas branimicinas, designadas en la presente invención como branimicinas B y C, que presentan actividad antibiótica o antibacteriana *in vitro* e *in vivo* frente a bacterias patógenas, preferiblemente humanas, tanto Gram positivas como Gram negativas.

Los inventores de la presente invención han aislado dicha cepa de actinobacterias, *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227, de los ecosistemas de arrecifes de coral desde el cañón submarino de Avilés. Dicha cepa fue aislada a 3.000 m de profundidad en la columna de agua y fue estudiada e identificada posteriormente. Se describe por tanto en la presente invención dicha cepa, un procedimiento para obtener branimicinas por fermentación a partir de la misma y dos nuevos antibióticos de la familia de las branimicinas con actividad antibacteriana contra bacterias patógenas clínicas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Estos nuevos compuestos presentan actividad antibiótica *in vivo* frente a bacterias Gram-negativas, como por ejemplo aunque sin limitarnos, los patógenos *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis* y *Escherichia coli*; y bacterias Gram-positivas, por ejemplo pero sin limitarnos, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium urealyticum*, *Clostridium perfringens* y *Enterococcus faecalis*.

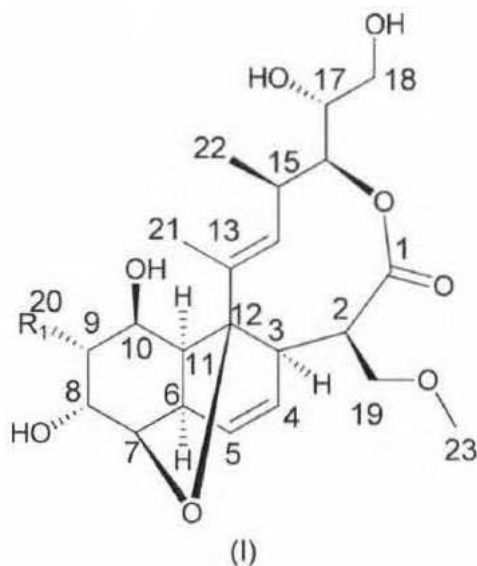
Los inventores determinaron las condiciones de cultivo de la cepa para la producción de dichas nuevas branimicinas, posteriormente purificaron las mismas, procedieron a su elucidación estructural y testaron su actividad antibiótica frente a una variedad de patógenos clínicos tanto Gram-negativos como Gram-positivos, algunos de los cuales presentaban multiresistencias frente a antibióticos de uso habitual.

La presente invención representa así una solución a la necesidad de disponer de nuevos compuestos antibióticos con potencial biomédico en el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias patógenas tanto Gram positivas como Gram negativas resistentes a los antibióticos de uso actual. Asimismo, representa

centrifugación de dicho cultivo bacteriano, mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia para tal fin, y a la eliminación de los sedimentos depositados como consecuencia de este paso de centrifugación, obteniéndose así el sobrenadante de la invención que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) y otros metabolitos producidos y secretados por la cepa de la invención en cultivo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa bacteriana de la invención para la producción de compuestos de fórmula general (I):

10



o cualquiera de sus sales,

15

donde R₁ es un grupo -CH₂R_a y R_a se puede seleccionar entre H o el grupo -OCH₃.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula general (I) descrito anteriormente, de ahora en adelante "procedimiento de la invención", que comprende:

20

- a. Cultivar la cepa bacteriana de la invención en un medio de cultivo en condiciones de fermentación, y
- 25 b. Purificar el compuesto de fórmula general (I) producido por la cepa en cultivo de la etapa (a).

El cultivo de la etapa (a) del procedimiento de la invención se puede llevar a cabo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, inoculando la cepa o esporas de la cepa en un medio de cultivo apropiado. Los expertos en la materia reconocerán los medios de cultivo bacterianos que pueden ser empleados en esta etapa del procedimiento de la invención. El "medio de cultivo" es un medio nutritivo adecuado, es decir, que comprende los nutrientes necesarios para el mantenimiento y crecimiento *in vitro* de la cepa de la invención, para el desarrollo de su actividad fermentadora y, por tanto, para la producción de los compuestos de fórmula (I) descritos anteriormente. Dicho medio de cultivo puede ser líquido, sólido o semisólido. Para que la cepa de la invención crezca adecuadamente

35

en el medio de cultivo, éste debe reunir una serie de condiciones como son temperatura, agitación, grado de humedad, luz/oscuridad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad (pH). Asimismo, el medio de cultivo debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

5

Así, el cultivo de la etapa (a) tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende, por ejemplo aunque sin limitarnos, agar o gelatina o albúmina, fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa o manitol), fuentes de nitrógeno (por ejemplo, peptonas), azufre, fósforo, fuentes de vitaminas, aminoácidos y hormonas y/o factores de crecimiento (por ejemplo, extracto de carne o extracto de levadura), MOPS, sales inorgánicas (por ejemplo, calcio en forma de CaCl_2 , magnesio, manganeso, sodio o potasio), iones de hidrógeno, etc. En una realización preferida, el medio de cultivo empleado en el procedimiento de la invención es un medio de cultivo que comprende nutrientes y propiedades físico-químicas similares a las del medio marino, más preferiblemente el medio es RSA marino.

La cepa de la invención se puede cultivar, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante cultivo en matraz con agitación, y fermentación a pequeña o a gran escala (que incluye las fermentaciones continua, discontinua o *batch*, de alimentación discontinua o *feed-batch*, o en estado sólido) llevada a cabo en un biorreactor de laboratorio o industrial en un medio adecuado y en condiciones que permitan expresar y/o aislar los compuestos de fórmula (I) descritos anteriormente. Los compuestos de la invención se secretan, junto con otros metabolitos o compuestos, en el medio nutritivo, y éstos se pueden recuperar directamente del medio.

25

El experto en la materia reconocerá las condiciones de fermentación adecuadas para ser aplicadas en el paso (a) del procedimiento de la invención. Preferiblemente, dichas condiciones comprenden la incubación en agitación, mas preferiblemente en agitador orbital, del cultivo de la invención durante entre 2 y 10 días, preferiblemente entre 3 y 7 días, más preferiblemente durante 4 días: a una temperatura esencialmente constante de entre 25 y 30°C, preferiblemente entre 27 y 29°C, más preferiblemente a 28°C; a entre 200 y 300 rpm, preferiblemente entre 250 y 270 rpm, más preferiblemente a 250 rpm y a un pH constante de entre 6 y 7.5, preferiblemente de entre 6 y 7, más preferiblemente a 6.7.

35

Tras el cultivo de la etapa (a) del procedimiento de la invención, puede tener lugar un paso adicional de centrifugación tras el cual se descartan los sedimentos y se seleccionan los sobrenadantes, obteniendo así el sobrenadante de la invención. Dichos sobrenadantes pueden ser posteriormente filtrados en el paso (b) del procedimiento de la invención y se pueden someter a continuación a un procedimiento de extracción, como por ejemplo aunque sin limitarnos, a extracción en fase sólida, con el fin de eluir los compuestos de la invención presentes en los mismos.

40

Los compuestos de la invención secretados al medio de cultivo por la cepa de la invención pueden recuperarse del medio empleando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación y/o precipitación.

45

Los compuestos de la invención producidos por la cepa en cultivo pueden purificarse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin

50

limitación, cromatografía (por ejemplo, HPLC, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica cromatoenfoco, y exclusión molecular), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico). SDS-PAGE, precipitación o extracción, con el fin de obtener uno o

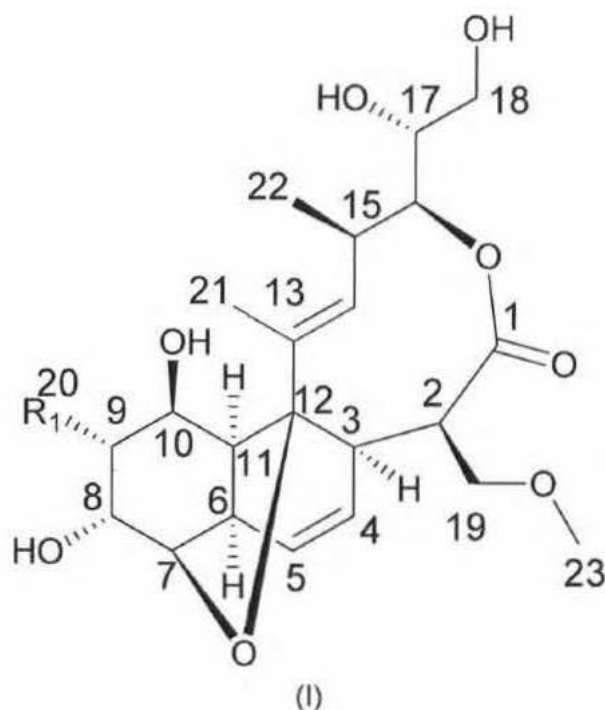
5

Los compuestos de la invención producidos por la cepa en cultivo pueden detectarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos de detección pueden incluir, por ejemplo aunque sin limitarnos, UPLC, UV, RMN, espectrometría de

10

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) o a cualquiera de sus sales (a partir de ahora "compuesto de fórmula (I) de la invención"):

15



donde R₁ es un grupo -CH₂R_a y R_a se puede seleccionar entre H o el grupo -OCH₃.

20

Cuando R₁ es -CH₃ el compuesto es la branimicina B y cuando R₁ es -CH₂OCH₃ el compuesto es la branimicina C.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "composición de la invención", que comprende la cepa de la invención, el sobrenadante de la invención o el compuesto de fórmula (I) de la invención. Dicha composición puede ser una composición farmacéutica o cosmética, que comprende la cepa de la invención, el sobrenadante de la invención o el compuesto de fórmula (I) de la invención, y un excipiente o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable. Preferiblemente, la

30

invención o el compuesto de fórmula (I) de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva.

5 Se entiende por "cantidad terapéuticamente efectiva" la cantidad de cepa de la invención, sobrenadante de la invención o compuesto de la invención, que cuando se administra al sujeto para tratar y/o prevenir una infección bacteriana produce el efecto deseado. Dicho efecto deseado puede ser, por ejemplo aunque sin limitarnos, eliminar o reducir el número de bacterias causantes de la infección. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo pero sin limitarnos,
10 del tipo de infección y su severidad, así como de la edad, peso, sexo, condición física, capacidad de respuesta o tolerancia, etc., del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención.

15 Los excipientes y vehículos farmacéutica o cosméticamente aceptables que pueden ser utilizados en la composición de la invención son los conocidos por los expertos en la materia.

20 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra
25 forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio bibásico, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

30 El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia o combinación de sustancias que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se debe administrar la composición de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dicha composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden
35 ser, aunque sin limitarnos, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Ejemplos de vehículos son, aunque sin limitarnos, agua, aceites o surfactantes, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como por ejemplo, y sin sentido limitativo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, aceites de ricino, polisorbatos, ésteres de sorbitano, éter sulfatos, sulfatos, betaínas, glucósidos, maltósidos, alcoholes grasos, nonoxinolos, poloxámeros, polioxietilenos,
40 polietilenglicoles, dextrosa, glicerol, digitonina y similares. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

50 La composición de la presente invención puede formularse para su administración a un animal, preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye

5 cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, barras, lápices, vaporizadores, aerosoles, etc.), semisólida (ungüento, crema, pomada, gel, hidrogel, espuma, loción, jabón, jalea, gelatina, etc.) o líquida (soluciones acuosas o no acuosas, soluciones hidroalcohólicas o hidroglicólicas, suspensiones, emulsiones, jarabes, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, linimentos, sueros, etc.) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida o de cualquier otro sistema convencional de liberación. El término "liberación sostenida" se utiliza en sentido convencional refiriéndose a un sistema de vehiculización de un compuesto que proporciona la liberación gradual de dicho compuesto durante un periodo de tiempo y preferiblemente, aunque no necesariamente, con niveles de liberación del compuesto relativamente constantes a lo largo de un periodo de tiempo. Ejemplos ilustrativos de vehículos o sistemas de liberación sostenida incluyen, aunque no se limitan a, liposomas, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, ciclodextrinas, vesículas, micelas, micelas mixtas de tensioactivos, micelas mixtas fosfolípidotensioactivo, miliesferas, microesferas, nanoesferas, lipoesferas, microemulsiones, nanoemulsiones, minipartículas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas, nanopartículas sólidas lipídicas, soportes lipídicos nanoestructurados, materiales poliméricos, parches o implantes biodegradables o no biodegradables, o micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

25 Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, cutánea o subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, oftalmológica u ocular, mediante parches transdérmicos o vía rectal o vaginal, mediante la administración de un supositorio o encapsulado, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

35 Las composiciones de la presente invención son aptas para su aplicación mediante dispositivos médicos que permitan la liberación del principio activo en concentraciones adecuadas para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas. Estos dispositivos deben ser, preferiblemente, adecuados para la administración del principio activo de forma local, permitiendo que el tratamiento actúe en la zona afectada y no se disperse. Los dispositivos pueden, por ejemplo, pero sin limitarse, llevar el principio activo en su interior o ir recubiertos con el mismo.

40 En una realización preferida, la composición de la invención, preferiblemente farmacéutica o cosmética, además comprende otro agente antibacteriano y/o antifúngico, más preferiblemente dicho agente antibacteriano es otro antibiótico.

45 Se entiende por "agente antibacteriano" una sustancia química, producida de forma sintética o natural (sintetizada por ejemplo por hongos o bacterias), que inhibe el crecimiento (bacteriostático) o mata (bactericida) a las bacterias. El agente antibacteriano puede ser, por ejemplo aunque sin limitarnos, un antibiótico, un inhibidor de la bomba de eflujo o un agente permeabilizante de la membrana bacteriana.

50 Los antibióticos a los que se refiere la presente invención son compuestos que, preferiblemente, no comprometen la viabilidad y supervivencia de la cepa de la invención.

Ejemplos de antibióticos que pueden incluirse en la composición de la invención son, aunque sin limitarnos, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromomicina, geldanamicina, herbimicina, loracarbef, ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatin, meropenem, cefadroxilo, cefazolina, 5 cefalotina, cefalexina, cefaclor, cefamandol, ceftazidima, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuten, ceftizoxima, ceftriaxona, cefepime, ceftobiprole, teicoplanin, vancomicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomina, aztreonam, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, 10 dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina, piperacilina, ticarcilina, bacitracina, colistina, ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino, sparfloxacino, temafloxacino, mafenide, sulfonamidocrisoidina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametizol, sulfanilimida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol (co-trimoxazol), demeclociclina, doxiciclina, 15 minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, arsfenammina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácidofusídico, furazolidona, isoniácida, linezólida, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamida, quinupristin/dalfopristin, rifampicina, tiamfenicol, tinidazol, dapsona y clofazimina, así como otras 20 nargenicinas, incluyendo branimicinas distintas a las descritas en la presente invención.

La composición de la presente invención puede incluir alternativa o adicionalmente un agente antifúngico o antimicótico, dicho agente antifúngico puede ser un fungicida o un fungistático.

El uso de la cepa de la invención, del sobrenadante de la invención, del compuesto de fórmula (I) de la invención o de la composición de la invención en combinación con otros agentes antibacterianos es una estrategia interesante en la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas, preferiblemente de enfermedades de origen infeccioso 30 provocadas por bacterias patógenas resistentes o multi-resistentes, y en la inhibición de la formación de biopelículas bacterianas sobre cualquier superficie.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del sobrenadante de la invención, del compuesto de fórmula (I) de la invención o de la composición, preferiblemente 35 farmacéutica, de la invención para la elaboración de un medicamento. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al sobrenadante de la invención, el compuesto de fórmula (I) de la invención o la composición de la invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del sobrenadante de la invención, del compuesto de fórmula (I) de la invención o de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al sobrenadante de la invención, el compuesto de fórmula (I) de la invención o la composición de la invención 45 para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas.

Las infecciones bacterianas a las que se refiere la presente invención son provocadas por una o más bacterias Gram negativas o Gram positivas, o por ambas conjuntamente. En una realización más preferida, las infecciones bacterianas a las que se refiere la presente 50 invención son provocadas por una o más bacterias de los géneros seleccionados de *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*,

Escherichia, *Haemophilus* o *Neisseria*. En una realización aún más preferida, las infecciones bacterianas a las que se refiere la presente invención son provocadas por una o más bacterias seleccionadas de la lista que consiste en: *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis*. En una realización aún más preferida, la bacteria es *Micrococcus luteus*.

En otra realización preferida, las bacterias a las que se refiere la presente invención son bacterias resistentes, más preferiblemente multiresistentes, a uno o más antibióticos.

Como ejemplos de bacterias resistentes a antibióticos, se encuentran aquellas cepas resistentes a aminoglicósidos, carbapenemas, cefalosporinas, glicopéptidos, lincosamidas, lipopéptido, macrólidos, monobactámico, nitrofuranos, oxazolidononas, penicilinas, quinolonas, sulfonamidas, ácido fusídico, ácido pseudomónico, rifamicinas, lipoglicopéptidos, novobiocina y/o tetraciclinas, entre otros. Más preferiblemente, las bacterias a las que se refiere la presente invención son bacterias resistentes a al menos un antibiótico seleccionado de la lista que consiste en: amikacina, amoxicilina, ampicilina, capreomicina, ciprofloxacina, ácido clavulánico, clindamicina, cotrimoxazol, etambutol, eritromicina, fosfomicina, isoniazida, kanamicina, nitrofurantoina, quinolonas, rifampicina, estreptomina y/o tetraciclina.

En una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (I) es la branimicina B y la bacteria es *Micrococcus luteus*.

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es la branimicina B o C y la bacteria es *Corynebacterium urealyticum*, *Clostridium perfringens*, *Neisseria meningitidis* y/o *Micrococcus luteus*.

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es la branimicina 8 y la bacteria es *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* y/o *Bacteroides fragilis*.

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es la branimicina e y la bacteria es *Enterococcus faecalis* y/o *Staphylococcus aureus*.

En otra realización preferida, el medicamento al que se refiere la presente invención es para el tratamiento y/o prevención de enfermedades infecciosas bacterianas o enfermedades provocadas por infecciones bacterianas. Más preferiblemente, dichas enfermedades se seleccionan de la lista que consiste en: enteritis necrótica, gangrena gaseosa, infecciones del tracto genitourinario (tales como cistitis, uretritis, prostatitis, pielonefritis, epididimitis), infecciones cutáneas (tales como impétigo, foliculitis, celulitis, abscesos, infección de heridas), osteomielitis, mastitis, faringoamigdalitis, conjuntivitis, epiglotitis, otitis, meningitis, meningococemia, bacteriemia, sepsis, endocarditis, infecciones del tracto respiratorio (tales como neumonía o sinusitis), infecciones intraabdominales (colecistitis, peritonitis, abscesos viscerales), así como infecciones nosocomiales.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta invención, hace referencia a cualquier sustancia usada para la prevención, alivio, tratamiento o curación de infecciones en el hombre, o cualquier otro animal, y plantas. En el contexto de la presente invención, este término se refiere a una preparación que comprenda el sobrenadante de la invención, el compuesto de fórmula (I) de la invención o la composición de la invención.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario, incluyendo, pero sin limitarse, a las premezclas medicamentosas. Se entiende por "premezcla medicamentosa" o "premezcla para alimentos medicamentosos", todo medicamento veterinario preparado de antemano con vistas a la fabricación ulterior de alimentos medicamentosos. Se entiende por "alimento medicamentoso" toda mezcla de medicamento(s) veterinario(s) y de alimento(s) preparada previamente a su comercialización y destinada a ser administrada a los animales sin transformación, en razón de las propiedades curativas o preventivas o de otras propiedades del medicamento.

Los medicamentos de la invención pueden utilizarse tanto solos como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas. Así, los medicamentos de la presente invención pueden ser empleados junto a otros principios activos o terapias a modo de terapia combinada. Los otros principios activos pueden formar parte de la misma composición o bien pueden ser proporcionados mediante una composición distinta, siendo administrados al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la infección, enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la infección, enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la infección, enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la infección, enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la infección, enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la infección o enfermedad infecciosa o biopelícula bacteriana, es decir, evitar la aparición de una biopelícula en una superficie o evitar que se produzca la infección o la enfermedad infecciosa en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular cuando dicho sujeto tiene predisposición para sufrir una infección pero aún no se ha diagnosticado que la tenga, como es el caso, por ejemplo, de neonatos, ancianos o pacientes inmunodeprimidos o sometidos recientemente a intervención quirúrgica.

El término "infección" es el término clínico empleado para describir la colonización de un organismo huésped por microorganismos de otras especies. En clínica, el organismo

colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y supervivencia del huésped. Como se usa aquí, el término "enfermedades infecciosas bacterianas" o "enfermedades de origen infeccioso provocadas por bacterias" se refiere a enfermedades precedidas por una infección bacteriana, incluyendo infecciones sistémicas (bacteriemia y sepsis) e infecciones en cualquier órgano o tejido del organismo huésped. Los órganos o tejidos incluyen, pero sin limitación, músculo esquelético, piel, tejidos blandos o mucosas, torrente sanguíneo, riñones o cualquier otro tejido del tracto urinario, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, órganos sexuales, oído, ojo, corazón, pulmones o hueso. Estas infecciones pueden estar causadas por bacterias Gram positivas y/o Gram negativas.

En la presente invención, dichas infecciones ocurren en un sujeto que puede ser, pero sin limitarnos, un animal, en particular un mamífero y más particularmente un humano, o un animal doméstico, por ejemplo cerdo, ratón, rata, gato, jerbo conejo, perro, mono, chimpancé, etc., o un ave.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de la invención, del sobrenadante de la invención, del compuesto de fórmula (I) de la invención o de la composición de la invención para la eliminación y/o prevención y/o inhibición de la formación de biopelículas bacterianas, preferiblemente sobre superficies inertes, es decir *ex vivo*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, las biopelículas bacterianas son provocadas por una o más bacterias de los géneros seleccionados de *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Haemophilus* o *Neisseria*. En una realización más preferida, las biopelículas bacterianas son provocadas por bacterias seleccionadas de la lista que consiste en: *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis*. En una realización aún más preferida, la bacteria es *Micrococcus luteus*.

En una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (I) es la branimicina B y la bacteria es *Micrococcus luteus*.

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es la branimicina B o C y la bacteria es *Corynebacterium urealyticum*, *Clostridium perfringens*, *Neisseria meningitidis* y/o *Micrococcus luteus*.

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es la branimicina B y la bacteria es *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* y/o *Bacteroides fragilis*.

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es la branimicina e y la bacteria es *Enterococcus faecalis* y/o *Staphylococcus aureus*.

Se entiende por "biopelículas" o "biofilms" las comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o a un tejido *in vivo* o *ex vivo* (en cultivo). Es una comunidad de bacterias (de una única especie o varias) que se adhiere a una superficie sólida. Las biopelículas son una causa común de infecciones bacterianas, tanto en humanos como en otros animales y plantas. Ejemplos de biopelículas son aquellas que se forman en la cavidad oral, tales como las caries (placa dental) o enfermedad periodontal.

Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, pero se ha sugerido que las bacterias del biofilm pueden producir exotoxinas, se pueden liberar grupos de bacterias al torrente sanguíneo, se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune y, por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos. Este último aspecto puede ser especialmente relevante dado que las bacterias resistentes originadas en un biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario.

Por otro lado, la contaminación biológica de superficies por formación de biofilms es común, pudiendo desarrollarse el biofilm sobre superficies hidrófobas, hidrófilas, bióticas o abióticas, y conduce a la degradación del material, productos de contaminación, bloqueo mecánico e impedancia de la transferencia de calor en procesos acuáticos. Los biofilms son también la primera causa de contaminación biológica en alimentos, catéteres, drenajes o implantes, así como en los sistemas de distribución de agua potable, y otras conducciones, siendo especialmente importante el control de biofilms en los sistemas antiincendios.

El término "Gram negativa" se refiere a las bacterias que no retienen la coloración violeta en el protocolo de tinción Gram e incluyen, pero sin limitarse, *Enterobacteriaceae*, incluyendo *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Haemophilus*, *Bacteroides*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas* (incluyendo *P. aeruginosa*) y especies tales como *Moraxella* spp. (incluyendo, *M. catarrhalis*) y *Neisseria* spp.

El término "Gram positiva" se refiere a las bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta en el protocolo de tinción Gram e incluyen, pero sin limitarse, *Staphylococcus* (incluyendo *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*), *Streptococcus* (incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. avium*, *S. bovis*, *S. lactis*, *S. sanguis* y *Streptococcus* del grupo C, *Streptococcus* del grupo G y *Streptococcus viridans*), *Enterococcus* (incluyendo *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*), *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium jeikeium*, *Chlamydia* spp. (incluyendo *C. pneumoniae*), *Micrococcus* y *Mycobacterium tuberculosis*. Las cepas habituales de *S. aureus* son resistentes a la penicilina. La aparición de cepas de esta especie resistentes a la meticilina y vancomicina representa un serio problema sanitario.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

45 Descripción de las figuras

FIG. 1. Árbol filogenético obtenido por el método " neighbour-joining" obtenido por análisis matriciales de distancias de las secuencias del gen 16S rRNA, mostrando la posición de *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227 y sus parientes filogenéticos más próximos. Los números de los nodos son valores *bootstrap* (1000 muestreos; solo se presentan valores >70%). Los asteriscos indican que los

correspondientes nodos también se obtuvieron en el árbol obtenido por el método de la máxima verosimilitud (*maximum-likelihood*). La barra indica un 1% de divergencia de secuencias.

5 Ejemplos

A continuación se ilustrara la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la cepa de la invención en la producción de dos nuevos antibióticos macrólidos de la familia de las branimicinas (designados en la presente invención como branimicinas B y C), así como la actividad antimicrobiana de estos nuevos antibióticos frente a bacterias patógenas tanto Gram negativas como Gram positivas.

15 Ejemplo 1. Sección experimental

15 Procedimientos experimentales generales

Los análisis y separaciones mediante HPLC semipreparativo se llevaron a cabo utilizando un sistema cromatográfico de Alliance con una columna SunFire C18 (10 μ m, 10 x 250 mm, Waters). Para los análisis de UPLC se usó un UPLC Acquity equipado con una columna BEH C18 (1,7 μ m, 2.1 x 100 mm, Waters), la rotación óptica fue determinada con un polarímetro JASCO P-2000. Los espectros de IR fueron medidos con un espectrómetro JASCO FT/IR-4100 equipado con un accesorio ATR de PIKE MIRacle™ (reflexión simple). Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III (500 y 125 MHz para ^1H y ^{13}C RMN, respectivamente) equipado con una sonda TCI MicroCryoProbe™ de 1,7 mm, usando la señal del solvente residual como referencia interna (δ_{H} 7,27 y δ_{C} 77,0 ppm para CDCl_3). Los espectros de HRESIMS fueron adquiridos usando un espectrómetro de masas Bruker maXis QTOF.

30 Microorganismos y condiciones de fermentación

La cepa M-227 (CECT 91 08) fue aislada de una muestra de aguas profundas recogida en el mar Cantábrico a 3000 m de profundidad. Un cultivo de siembra fue preparado inoculando esporas de esta cepa en 50 ml de medio GCM (1,5% glucosa, 2% peptona de soja, 0,15% extracto de levadura, 1% MOPS, 0,01% CaCl_2 , pH 6.7) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Este cultivo fue incubado en un agitador orbital durante 4 días a 28°C y 250 rpm y usado para inocular (al 2%, v/v) veinte matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo cada uno 50 ml de medio R5A, que fueron incubados durante 10 días en las condiciones arriba descritas.

40 Análisis filogenético (taxonomía) del microorganismo productor

La cepa M-227 fue sometida a análisis filogenético en base al análisis de la secuencia del 16S rRNA. El análisis filogenético fue realizado usando MEGA versión 6.0 después de un alineamiento múltiple de los datos mediante CLUSTALO. Las distancias (opciones de distancia según el modelo de dos parámetros de Kimura) y alineamiento con el método *neighbor-joining* fueron determinadas usando valores *bootstrap* basadas en 1000 replicaciones.

50

Actividad antimicrobiana de las branimicinas B y C contra patógenos clínicos

Se determinó la actividad antimicrobiana de las branimicinas B y C y la concentración inhibitoria mínima (CIM) contra un grupo de patógenos humanos (Tabla 1).

5

| Patógenos clínicos | Aislado | Hospital | Año | Resistencias a antibióticos |
|---|------------|------------|------|-------------------------------|
| Gram-positivas | | | | |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv | ATCC 27294 | | | - |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR-1 | 14595 | SNRL-Spain | 2013 | Multirresistente ^a |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR-2 | 14615 | SNRL-Spain | 2013 | Multirresistente ^b |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 103281 | HUCA | 2013 | - |
| <i>Corynebacterium urealyticum</i> | 1492 | Cabueñes | 2014 | Multirresistente ^c |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 10544 | Cabueñes | 2015 | Ery, clin, tet |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 51299 | | | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 29212 | | | - |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 10701 | Cabueñes | 2015 | Amp, quin, ery |
| <i>Micrococcus luteus</i> | ATCC 14452 | | | - |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 64412 | HUCA | 2013 | Ery |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 81293 | HUCA | 2013 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 11497 | Cabueñes | 2015 | Susceptible a meticilina |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 43300 | | | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538P | | | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 | | | - |
| Gram-negativas | | | | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 61592 | HUCA | 2013 | Amo, tet |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | ATCC 25285 | | | - |
| <i>Escherichia coli</i> | ESS | | | - |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 10996 | Cabueñes | 2015 | Amp, cot, quin |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | ATCC 49247 | | | - |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 71327 | HUCA | 2013 | Clin |

Tabla 1. Descripción de los patógenos clínicos. ^a Inh, rif, emb. ^b Inh, rif, emb, str, amk, kan, cap ^c Amp, amo/clav, ery, cot, cip, fos, nitro. Amk amikacina; amo: amoxicilina; amp: ampicilina; cap: capreomicina; cip: ciprofloxacina; clav: ácido clavulánico; clin: clindamicina; cot: cotrimoxazol; emb: etambutol; ery: eritromicina; fos: fosfomicina; inh: isoniazida; kan: kanamicina; nitro: nitrofurantoina; quin: quinolonas; rif: rifampicina; str: estreptomycin; tet: tetraciclina.

10

15

Algunos de ellos han sido aislados e identificados en los laboratorios de microbiología clínica a partir de muestras obtenidas de pacientes con infecciones clínicas. El medio Mueller-Hinton (Biomedics) fue utilizado en los bioensayos frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus luteus*, *Haemophilus influenzae*, siendo suplementado de acuerdo a las condiciones CLSI (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, documento M100-S24 2014) para

20

5 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Neisseria meningitidis*, Trypticaseína de soja con sangre de carnero al w/5% (DIFCO) fue usada para *Corynebacterium urealyticum*. Brucella Broth (SIGMA) suplementado con hemina (5 µg/ml), vitamina K1 (1 µg/ml) y sangre de caballo sometida a lisis (5% v/v) fue usada para *Bacteroides fragilis* y *Clostridium perfringens*.

10 Para la mayoría de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se realizaron los ensayos antimicrobianos según normas del protocolo CLSI. Las pruebas de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* se realizaron en medio agarificado Middlebrook 7H10 suplementado con OADC al 10% y glicerol al 0,5% de acuerdo al método de proporción en agar para micobacterias de lento crecimiento (CLSI documento M24-A2, 2011).

Ejemplo 2. Resultados

15 Taxonomía de la cepa M-227

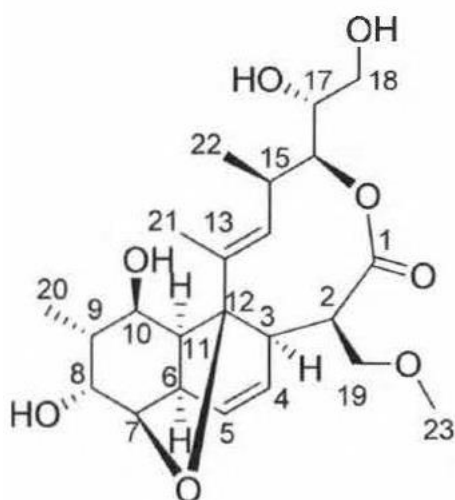
20 El 16S rDNA de la cepa productora M-227 fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciado. El análisis de la secuencia demostró una identidad del 99,9% con *Pseudonocardia carboxydivorans* Y8. El árbol filogenético generado por el método "*neighbor-joining*", basado en la secuencia del gen 16S rRNA, reveló claramente la relación evolutiva de la cepa M-227 con un grupo de especies conocidas del género *Pseudonocardia* (Figura 1). Por lo tanto, esta cepa fue señalada como *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227.

25 Aislamiento y purificación de branimicinas B y C guiados por bioactividad

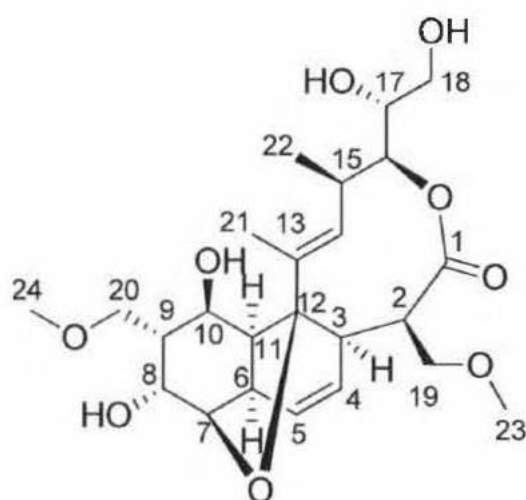
30 Los cultivos se centrifugaron, se descartaron los sedimentos y los sobrenadantes fueron filtrados y aplicados a un cartucho de extracción en fase sólida (Sep-Pak Vac C18, 10 g, Waters). El material retenido se eluyó con una mezcla de metanol y 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua. Un gradiente lineal de 0 a 100% metanol en 60 min, a 10 ml/min, fue utilizado. Las fracciones fueron recogidas cada 5 minutos y su actividad antibiótica fue detectada por la prueba de difusión en disco, utilizando *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador. La mayor parte de la actividad fue localizada en las dos fracciones recogidas entre 15 y 25 minutos, que se evaporaron en vacío y el material seco fue posteriormente redisoluto en 3 ml de DMSO y metanol (1:1). Muestras (100 µl) de las fracciones activas fueron cromatografiadas en una columna SunFire C18 (10 µm, 10 x 250 mm, Waters) con acetonitrilo y 0,05% TFA en agua como solventes. La elución se realizó con un gradiente lineal de 20 a 100% de acetonitrilo en 10 min, a 5 ml/min, y el eluyente se recogió en fracciones recolectadas cada 10 segundos. Una vez más, la actividad antibiótica de estas fracciones fue localizada por bioensayo y posteriormente todo el material activo fue cromatografiado en inyecciones múltiples en las mismas condiciones. Se agruparon las fracciones activas recogidas, correspondientes a los mismos tiempos de retención, se diluyeron cuatro veces con agua y se desalaron y concentraron por extracción en fase sólida (Sep-Pak C18, Waters). El análisis por UPLC de estas fracciones indicó que la actividad antibiótica pareció correlacionarse con la presencia de dos picos principales. Estos picos se purificaron aún más usando la misma columna y solventes, pero esta vez fue empleada una elución isocrática con acetonitrilo al 20%. Los compuestos purificados se diluyeron con agua y se extrajeron en fase sólida como se indica arriba. Finalmente, fueron disueltos en una mezcla de agua y tert-butanol (1:1) y liofilizados. Los rendimientos resultantes fueron de 58,6 mg de branimicina B y 61,7 mg de branimicina C.

Branimicina B: sólido blanco; $[\alpha]_D^{20} +106.6^\circ$ (c 0.1, CHCl₃); IR (ATR) ν_{\max} 3419, 3038, 2961, 2929, 2878, 2832, 1719, 1457, 1378, 1248, 1147, 1117, 1082, 1030, 984, 944, 890 cm⁻¹; para los datos de ¹H y ¹³C RMN ver Tabla 2; HRESIMS m/z 456.2596 (M+NH₄)⁺ (calcd. para C₂₃H₃₈NO₈⁺, 456.2592), 439.2326 [M+H]⁺ (calcd. para C₂₃H₃₅O₈⁺, 439.2326), 421.2222 [M-H₂O+H]⁺ (calcd para C₂₃H₃₃O₇⁺, 421.2221).

Branimicina C: sólido blanco; $[\alpha]_D^{20} +101.2^\circ$ (c 0.1, CHCl₃); IR (ATR) ν_{\max} 3422, 3038, 2961, 2931, 2879, 2833, 1722, 1457, 1386, 1248, 1140, 1118, 1083, 1030, 979, 945, 889 cm⁻¹; para los datos de ¹H y ¹³C RMN ver Tabla 2; HRESIMS m/z 486.2709 [M+NH₄)⁺ (calcd. para C₂₄H₄₀NO₉⁺, 486.2698), 469.2432 [M+H]⁺ (calcd. para C₂₄H₃₇O₉⁺, 469.2432), 451.2333 (M-H₂O+H)⁺ (calcd. para C₂₄H₃₅O₈⁺, 451.2326).



Branimicina B



Branimicina C

| Posición | Branimicina B | | Branimicina C | |
|----------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|
| | δ_C , tipo | δ_H (J en Hz) | δ_C , tipo | δ_H (J en Hz) |
| 1 | 179.6, C | | 179.5, C | |
| 2 | 46.1, CH | 3.10, ddd (10.9, 9.6, 5.0) | 46.1, CH | 3.08, ddd (10.6, 9.6, 5.1) |
| 3 | 51.5, CH | 3.03, br d (9.6) | 51.5, CH | 3.02, br d (9.6) |
| 4 | 126.4, CH | 5.37, dd (9.8, 1.5) | 126.4, CH | 5.36, dd (9.7, 2.0) |
| 5 | 131.5, CH | 6.06, dd (9.8, 6.9, 1.3) | 131.5, CH | 6.05, dd (9.7, 6.9, 1.0) |
| 6 | 38.6, CH | 2.67, br d (6.9) | 38.4, CH | 2.71, br d (6.9) |
| 7 | 84.0, CH | 4.14, d (4.8) | 83.8, CH | 4.09, d (4.8) |
| 8 | 72.4, CH | 3.85, dd (4.8, 4.0) | 71.5, CH | 4.06, dd (4.8, 4.2) |
| 9 | 35.7, CH | 2.15, ddq (10.8, 4.0, 6.8) | 40.1, CH | 2.31, m |
| 10 | 75.5, CH | 3.56, m | 71.9, CH | 4.00, d (10.9) |
| 11 | 48.6, CH | 2.47, br s | 48.1, CH | 2.46, d (1.9) |
| 12 | 88.4, C | | 88.5, C | |

| | | | | |
|----|-----------------------|--|-----------------------|---|
| 13 | 133.4, C | | 133.8, C | |
| 14 | 138.9, CH | 5.74, br d (7.6) | 138.4, CH | 5.70, br d (7.6) |
| 15 | 32.2, CH | 2.91, m | 32.1, CH | 2.90, m |
| 16 | 79.8, CH | 5.03, dd (9.9, 6.6) | 79.8, CH | 5.02, dd (10.0, 6.5) |
| 17 | 69.3, CH | 3.91, br d (9.8) | 69.3, CH | 3.90, br d (9.7) |
| 18 | 64.2, CH ₂ | 3.81, dd, (12.1, 2.5) 3.71, br d (12.1) | 64.2, CH ₂ | 3.79, dd, (12.2, 2.9) 3.70, br d (11.5) |
| 19 | 73.5, CH ₂ | 3.55, m 3.48, dd (11.2, 5.0) | 73.5, CH ₂ | 3.55, dd (10.6, 8.6) 3.47, dd (8.2, 4.8) |
| 20 | 12.9, CH ₃ | 1.03, d (6.8) | 73.3, CH ₂ | 3.76, dd (9.5, 4.6) 3.63, dd (9.5, 5.6) |
| 21 | 16.8, CH ₃ | 1.68, s | 16.8, CH ₃ | 1.70, s |
| 22 | 15.1, CH ₃ | 1.26, d (6.9) | 15.1, CH ₃ | 1.25, d (6.8) |
| 23 | 59.2, CH ₃ | 3.31, s | 59.1, CH ₃ | 3.30, s |
| 24 | - | - | 59.1, CH ₃ | 3.35, s |

Tabla 2. Espectros ¹H y ¹³C de RMN para las branimicinas B y C (500 MHz, CDCl₃).

5

Actividad antimicrobiana de las branimicinas B y C

La actividad antimicrobiana de las branimicinas B y C fue probada contra un grupo de patógenos humanos (Tabla 1). Algunos de ellos fueron aislados e identificados en laboratorios de microbiología clínica a partir de muestras obtenidas de pacientes con infecciones clínicas.

La Tabla 3 muestra las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM). Ambos compuestos exhiben actividades moderadas contra las bacterias Gram-positivas *Corynebacterium urealyticum* y *Clostridium perfringens*. La branimicina B mostró actividades moderadas contra las Gram-negativas *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Escherichia coli* ESS y *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y fuerte actividad contra la Gram-positiva *Micrococcus luteus*, con un valor de CIM de 1 µg ml⁻¹. La branimicina C mostró actividades moderadas contra las Gram-positivas *Enterococcus faecalis* 10544, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Micrococcus luteus*, y la Gram-negativa *Neisseria meningitidis*.

| | Branimicina B | Branimicina C |
|--|---------------|---------------|
| Gram-positivas | | |
| <i>Clostridium perfringens</i> 103281 | 32 | 16 |
| <i>Corynebacterium urealyticum</i> 1492 | 8 | 16 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 10544 | >64 | 64 |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 14452 | 1 | 16 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P | >128 | 32 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | >64 | 64 |
| Gram-negativas | | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 | 32 | 128 |
| <i>Escherichia coli</i> ESS | 64 | 128 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247 | 32 | >64 |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 32 | 64 |

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a un panel de patógenos clínicos.

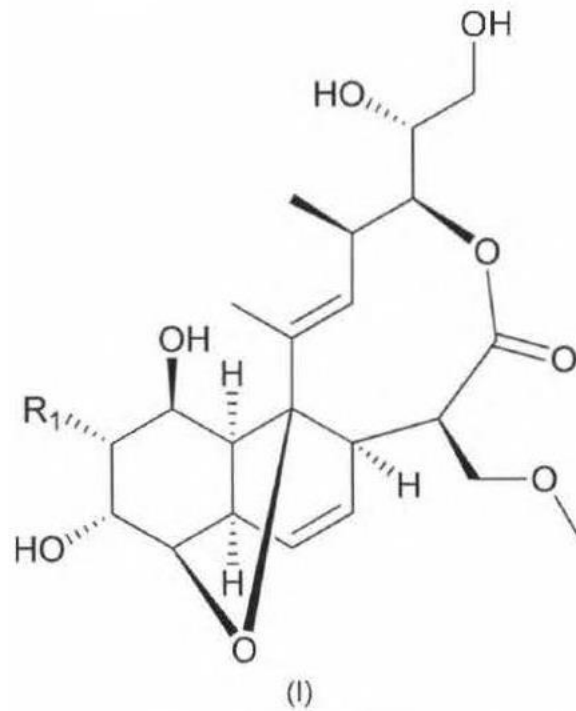
- 5 En conclusión, dos nuevos antibióticos, las branimicinas B y C, fueron aislados y caracterizados a partir de una actinobacteria abisal, *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227, aislada de la columna de agua a 3.000 m de profundidad en el mar Cantábrico. Estos compuestos exhiben importantes actividades inhibitorias contra diversas bacterias patógenas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, aisladas de los principales
- 10 Hospitales (HUCA y Cabueñes) de la misma región geográfica. Estos resultados son un ejemplo de la relevancia de los productos naturales marinos como candidatos para el tratamiento de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos.

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana de *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227 depositada en la Colección Española de Cultivo Tipo bajo el número de acceso 9108.

2. Sobrenadante de un cultivo de la cepa según la reivindicación 1.

3. Uso de la cepa según la reivindicación 1 para la producción de compuestos de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales: OH



15 donde: R₁ es un grupo -CH₂Ra y Ra se puede seleccionar entre H o el grupo -OCH₃.

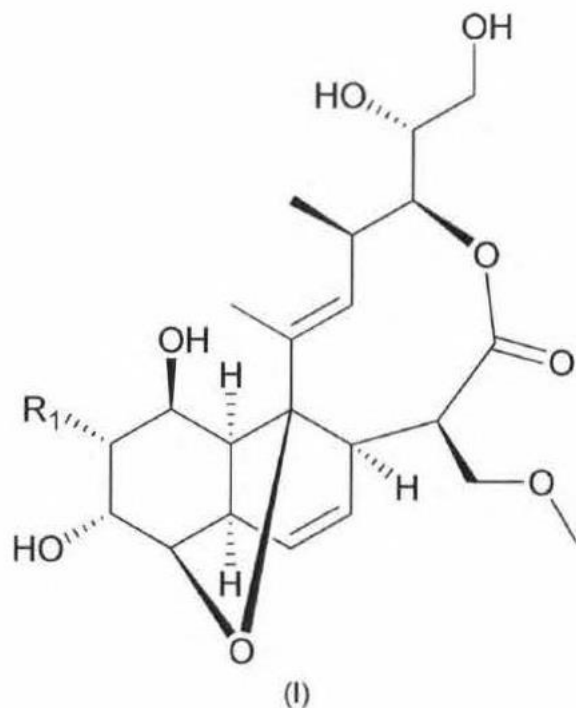
4. Procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula general (I), o cualquiera de sus sales, descrito en la reivindicación 3, que comprende:

20 a. Cultivar la cepa según la reivindicación 1 en un medio de cultivo en condiciones de fermentación, y

b. Purificar el compuesto de fórmula (I) producido por la cepa en cultivo de la etapa (a).

25

5. Compuesto de fórmula general (I):



o cualquiera de sus sales,

5

donde: R₁ es un grupo -CH₂Ra y Ra se puede seleccionar entre H o el grupo -OCH₃.

6. Composición que comprende el sobrenadante según la reivindicación 2 o el compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 5.

10

7. Composición según la reivindicación 6, que además comprende otro agente antibacteriano y/o antifúngico.

8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde la composición es una composición farmacéutica o cosmética y además comprende un excipiente o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.

15

9. Uso del sobrenadante según la reivindicación 2, del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 5 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, para la elaboración de un medicamento.

20

10. Uso del sobrenadante según la reivindicación 2, del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 5 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas.

25

11. Uso según la reivindicación 10, donde las infecciones bacterianas son provocadas por bacterias seleccionadas de la lista que consiste en: *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis*.

30

12. Uso según la reivindicación 11, donde la bacteria es *Micrococcus luteus*.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde las bacterias son bacterias resistentes a antibióticos.
- 5 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R₁ es -CH₃ y la bacteria es *Micrococcus luteus*.
- 10 15. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del sobrenadante según la reivindicación 2, del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 5 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, para la eliminación y/o prevención de la formación de biopelículas bacterianas sobre superficies inertes.
- 15 16. Uso según la reivindicación 15, donde las biopelículas bacterianas son provocadas por bacterias seleccionadas de la lista que consiste en: *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis*.
- 20 17. Uso según la reivindicación 16, donde la bacteria es *Micrococcus luteus*.
18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R₁ es -CH₃ y la bacteria es *Micrococcus luteus*.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201600484

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.06.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A | WO 2015/028095 A1 (GALAPAGOS NV) 05.03.2015, Párrafos [0001], [0010], [0091], [0282]-[0283]; página 75, tabla 1A; tabla 1B. | 1-18 |
| A | ČIKOŠ, A. et al. "Reinvestigation of the Branimycin Stereochemistry at Position 17-C". Organic Letters 2016, Volumen 18, páginas 780-783. [Publicado el 05.02.2016]. Ver página 780. | 1-18 |
| A | MULZER, J. et al. "Toward the Synthesis of the Antibiotic Branimycin: Novel Approaches to Highly Substituted <i>cis</i> -Decalin Systems". Chemistry: A European Journal 2006, Volumen 12, páginas 5992-6001. [Disponible en línea el 19.05.2016]. Ver página 5992, resumen e introducción. | 1-18 |
| A | TANVIR, R. et al. "Rare actinomycetes <i>Nocardia caishijiensis</i> and <i>Pseudonocardia carboxydivorans</i> as endophytes, their bioactivity and metabolites". Microbiological Research 2016, Volumen 185, páginas 22-35. [Disponible en línea el 23.01.2016]. Ver página 22, resumen; página 27, tabla 4; página 33, conclusiones. | 1-18 |

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
26.09.2016

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)
C07D493/10 (2006.01)
C12P17/18 (2006.01)
A61K31/365 (2006.01)
A61K35/74 (2015.01)
A61P31/04 (2006.01)
A61P31/10 (2006.01)
C12R1/01 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07D, C12P, A61K, A61P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, REGISTRY, HCAPLUS, NPL, XPESP, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.09.2016

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-18 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-18 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01 | WO 2015/028095 A1 (GALAPAGOS NV) | 05.03.2015 |
| D02 | ČIKOŠ, A. et al. Organic Letters 2016, Vol. 18, pp. 780-783 | 05.02.2016 |
| D03 | MULLZER, J. et al. Chemistry: A European Journal 2006, Vol. 12, pp. 5992-6001 | 19.05.2016 |
| D04 | TANVIR, R. et al. Microbiological Research 2016, Vol. 185, pp. 22-35 | 23.01.2016 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es una **cepa bacteriana** de *Pseudonocardia carboxydivorans*, el **sobrenadante** de un cultivo de esta cepa; el **uso** de la cepa para la producción de compuestos de fórmula general (I); un **procedimiento** para la obtención del compuesto (I) mediante la cepa bacteriana; el **compuesto** de fórmula general (I); una **composición** que comprende el sobrenadante; el **uso** del sobrenadante o de la composición que lo comprende para la elaboración de un medicamento; y el **uso** de la cepa, del sobrenadante, del compuesto de fórmula (I) o de la composición que comprende el sobrenadante para la eliminación y/o prevención de la formación de biopelículas bacterianas sobre superficies inertes.

El documento D01 divulga un compuesto de fórmula general (I) con esqueleto tetracíclico, que cuando A-B es $-\text{CH}=\text{CH}-$, es similar al esqueleto de branimicina y, por tanto, al del compuesto de la invención, pero que se diferencia de éste en la configuración estereoquímica del carbono en posición 2 y en que el grupo hidroxilo terminal del sustituyente en posición C-16 se encuentra en forma de éter metílico (ver párrafo [0010]). En concreto, se recogen la branimicina (ver página 75, tabla 1A) y derivados de ésta (ver párrafo [0091]; tabla 1B), la mayoría de los cuales, a diferencia del compuesto de la invención, presentan el grupo hidroxilo en posición 8 protegido en forma de éster.

Estos compuestos, que tienen aplicación para el tratamiento de enfermedades infecciosas (ver párrafo [0001]), se preparan a partir de la branimicina, producto natural obtenido por fermentación a partir de un cultivo de *Saccharothrix xinjiangensis* (ver párrafos [0282]-[0283]).

La diferencia entre la branimicina divulgada en el documento D01 y los compuestos de la invención es que estos últimos tienen configuración estereoquímica opuesta en C-2, además de que el grupo hidroxilo terminal del sustituyente en posición C-16 se encuentra libre y no en forma de éter metílico. Por otro lado, los derivados recogidos en este documento presentan el grupo hidroxilo en posición 8 protegido en forma de éster y no libre, como ocurre en los compuestos de la invención.

El documento D02 divulga un estudio conformacional sobre branimicina que dio lugar a la revisión de la configuración estereoquímica del carbono en posición 17.

Del mismo modo, el documento D03 divulga la branimicina, su origen natural, actividad biológica y un procedimiento para su síntesis.

El documento D04 divulga una cepa identificada como *Pseudonocardia carboxydivorans* (AGLS 2) asilada como endófito a partir de *Ageratum conyzoides*, cuyos extractos resultaron tener actividad antricrobiana frente a *Bacillus subtilis* DSM, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA), *Escherichia coli* K12 y *Chlorella vulgaris*. Se realizó también un análisis de los metabolitos presentes, encontrándose borrelidina y 2-piranona, tanto en el extracto de micelio como en el cultivo de la cepa (ver página 22, resumen; página 27, tabla 4; página 33, conclusiones).

Aunque la cepa divulgada en el documento D04 pertenece a la misma especie que la cepa de la invención, la primera es de origen vegetal, mientras que la de la invención se aisló de actinobacterias. Así mismo, los metabolitos producidos por ambas cepas son diferentes, aunque ambos posean actividad antibiótica o antibacteriana.

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga ni contiene sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia el **compuesto** de fórmula general (I) (reivindicación independiente 5) ni hacia una **cepa bacteriana** de *Pseudonocardia carboxydivorans* (reivindicación independiente 1); y, por tanto, tampoco hacia el **sobrenadante** de un cultivo de esta cepa (reivindicación independiente 2); el **uso** de la cepa para la producción del compuesto (I) (reivindicación independiente 3); un **procedimiento** para la obtención del compuesto (I) mediante la cepa bacteriana (reivindicación independiente 4); una **composición** que comprende el sobrenadante (reivindicación independiente 6); el **uso** del sobrenadante o de la composición que lo comprende para la elaboración de un medicamento (reivindicación independiente 9); y el **uso** de la cepa, del sobrenadante, del compuesto de fórmula (I) o de la composición que comprende el sobrenadante para la eliminación y/o prevención de la formación de biopelículas bacterianas sobre superficies inertes (reivindicación independiente 16).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-18 reúne los requisitos de patentabilidad (novedad, actividad inventiva y aplicación industrial) establecidos en el Artículo 4.1 de la Ley de Patentes 11/1986.