V OLRTERI’

L;NDL\1 A J CCMCi)

7, -076577- -00000-0000

S U PER INTEND E NC I A PA:NrEYiF Lv: 37 ENACCN . . . . ACON,

FORMULARIO UNICO DE SOLI,.--- OLL..._-PCT PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL P2007/000124

(D SOLICITUD DE:

Patente de Invención. J Patente de Modelo de

F-1 CapItulo I. x7 CapItulo II.
C,Nombre: VICURON PHARMACEUTICALS, INC IDENTIFICACI6N

Dirección: 455 South Gulph Road, Suite 305, C.C. EINIT El

King of Prussia, Pennsylvania 19406E.U.A. SOLICITANTE Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE C. E. D Otro

Lugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA Cual

TelØfono: Fax: NUmero E-mail:

IDENTIFICACION

0 Nombre: CARLOS R. OLARTE

NIT D
REPRESENTANTE Dirección: World Trade Center Torre A1 Calle

100 NO. 8A-37 Piso 10 C.E. L Otro 0 APODERADO TelØfono: 601-7700 Fax: 601-7799 Cual E-mail: office'olarteraisbeck.com Nilimero 79.782.747 Btª

TP 74.295

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

INVENTOR (ES)
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

(D PCT(86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/002733 Fecha Enero 27, 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/080920 Fecha Agosto 3, 2006

TItulo (54) ANTIBIOTICO 107891, SUS FACTORES Al Y A2, SALES Y COMPOSICIONES (3 FARMACEUTICAMENTE kCEPTABLES, Y USC DE LOS

(3 Clasificaciôn Internacional (51) C07K 1/14, C12P 1/04, C071(14/195, A61K

38/16

(33) PaIsde Origen (32) Fecha (31) NCimero de Solicitud (3 Prioridad US Enero 26, 2005 11/045.628

SIIXINOI

Comprobante de pago No. 07-60.708 Fecha 26 de Julio de 2007

LA

1A

I*

ANEXOS
Comprobarite de pago de Ia tasa de presentación de a solicitud.
Documento que acredita la existencia y representaciOn legal cuando el solicitante sea persona juridica. Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver Expediente No. 05-124,739
Documento de cesiÆri del inventoral solicitante o a su causante.
Declaraciones.

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripciOn, reivindicaciones, dibujos).
Copia del examen preliminar internacional efectuado por Ia Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
TraducciOn del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
De ser el caso, copia del contrato de acceso.
De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indIgenas.
De ser el caso, certificado de depósito del material biolOgico.
Arte final 12 x 12.
De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o tItulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o Su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
De ser el caso, modificaciories efectuadas a la solicitud internacional.
Otros. B(isqueda Internacional

FIGURA CARACTERISTICA

LISTA DE INVENTORES PCT/US2005/002733

AMERIGA LAZZARINI,
Via 29 Maggio, 5,
1-20025 Legnano
Italia
Nacionalidad: Italiana

LUCIANO GASTALDO,
Via San Martino, 7,
1-20010 Pogliano Milanese
Italia
Nacionalidad: Italiana

GIANPAOLO CANDIANI,
Via Bellini, 2/C,
1-20064 Gorgonzola
Italia
Nacionalidad: Italiana

ISMAELA CICILIATO,
Via Orazio, 7,

6-06

1-21052 Busto Arsizio
Italia
Nacionalidad: Italiana

DANIELE LOST,
Via Carso, 28/13,
1-22069 Rovellasca
Italia
Nacionalidad: Italiana

FLAVIA MARINELLI,
Via Rubens, 25,
1-20148 Milano
Italia
Nacionalidad: Italiana

ENRICO SELVA,
Via di Vittorio, 23,
1-27027 Gropello Cairoli
Italia
Nacionalidad: Italiana

FRANCO PARENTI,
Via B. Cellini, 24,
1-20020 Lainate
Italia
Nacionalidad: Italiana

0

r) LI 0UL’L.)

- .---.-.. LJC
- L /-t-C r.__f,_._;_. .-f ..,,,._ ti A......LJLtU.) I OIJULLIL//I LI) ILIOI / tL/ /0 JL)I (IlL,) 1QI I/ IL) Cl L’I LJ/ I ((ti-3OL)LJL,/.Ll, C

intØrprete of/cial debidamente licenciado bajo ResoluciÆri 395 del 22 de abril de 2002 del MThistrio de Just/cia de Colombia), de uric’s documeritos expedidos en inglØs.
Los documentos traducidos son una Apostille, un certificado suschto por un ofici de reçjistro del condado de New Cork y una constanda notaria!; acompaæa a Ios mismos un poder y una ceWficación notarl relativa al mismo que no se trducen pues estthn hedios en y en espaæol (salvo unos cuantos datos). Estos documentos se refleren a VICURON PHARMACEUTICALS INC.

Apostille

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Pals: Estados Unidos de America
Este documento pi)b!ico
2. ha sido firmado por Norman Goodman
3. obrando en su condición de Oficial de Registro del Condado
4. Ileva el sello/estampilla del condado de New York

Certificado

5. En New York, New York 6. el 14 de agosto de 2006
7. por el Vice-Secretario Especial de Estado, Estado de New York
S. No. NYC-10460556A
9. SeIlo/estampilla 10. Firma

[Sellado] [Firmado] MICHAEL ASOs!QO*
James Bizzarri TRADUCTOR E INrERrETE Q(.f
Vice-Secretario Especial
de Estado RES. 35 22-04-02 MIWJJsT;(I

[Del poder, la fecha, al final:]

11 de agosto de 2006

[Del certificado notarial, la fecha (al cornienzo), los datos del poderdante (puntos 1 y 3) y la mención de un documento en el punto 5:]

11 de agosto de 2006

Grover F. Fuller Jr

150 East 42 Street, New York, NY 10017, USA (EE.UU.)

1

ViLrJI rfl/rIMLU !-L

P ’-.-,-k-,-4 -. 1i,-1.-. -- k.-.-.,-.-.)flfl - oc e CU0 L. OLLU..n U

Estado de New York
Condado de New York a saber:

El dIa ii de agosto de 2006 se presentó personaimente ei seæorGrover F. FuHer Jr. ante ml, Susan Killian (notario pibJico del Estado de New York, condado de New York), a quien conozco como la persona que firma el poder anexo a la presente.
[Firmado y sellado]
Susan Killian
Notario Piblico

[El sello del notarlo indica que su comisión expira el 4 de octubre de 2008].

. Estado de New York

Condado de New York - a saber: 514099

Yo, Norman Goodman, Oficial de Registro del Condado y Oficial de Registro de la Corte Suprema del Estado de New York, establecida en el Condado y para el Condado de New York, una corte de poderes regulares que cuenta con el sello de ley, certifico por el presente bajo la Ley Ejecutiva del Estado de New York, que Susan Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración, testimonio, constancia de preseritación personal, reconocimiento,

o prueba anexos, era, al tiempo de recibir los mismos, un Notario Piblico en el Estado y para el Estado de New York, debidamente comisionado, juramentado y calificado para actuar

como tal; que, bajo la ley, se ha archivado en esta oficina Ia comisión o certificado de su

carÆcter oficial al igual que su propia firma autógrafa; que al tiempo de recibir dicha prueba, presentación personal, reconocimiento 0 juramento estaba debidamente autorizado para recibirlos; que conozco bien la letra de dicho Notario Piiblico o he comparado la firma del instrumento anexo con su firma registrada en mi oficina, y creo que dicha firma es genuina.

En fe de lo cual, he estampado mi firma y sello oficial hoy 14 de agosto de 2006.

. [Firmado y sellado]

Oficial de Registro del Condado y de la Corte Suprema, Condado de New York

Michael Anderson -Gomez

MAEL C-OFth5:
TFOUCTOR E NTERPRETE QEA
ESPAOLLESESPM OL
22-04-02 WNVUSTto’;.i

potttte

(Convention de La Hye du 5 Octobre 1961)

1. Country: Un!ted States of America
This public document
2. has been signed by Norman Goodman
3. acting in the capacity of County Clerk
4. bears the seal/stamp of the county of New York

. !Certtfteb

5. At New York, New York 6. the 14th day of August 2006
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10460556A

9. Seal/Stamp 10. Signature

James Bizzarri

Special Deputy Secretary of State

04135595.RSL (REV: 2/619)

OLARTERA1sEcK
OLARTE RAISECK & FRIERI LTDA.

Power of Attor Poder

The undersigned, El suscrito,
VICURON PHARMACEUTICALS
domiciled in domiciliado en

455 South Guiph Road. King of Prussia, Pen.n.syivoin 1 9-0 T-Tq 4
by means of these presents hereby grants to Car’lcs par media del presente otorga a Carlos R.
R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Olarte y/o J. Ian Raisbeck 3,/o Ana
Ana Maria Frieri and/or Juan Guillermo Maria Frieri y/o Juan Guillermo
Moure and/or Natalia Castro full and
sufficient Power of Attorney to file, prosecute,
obtain, defend and enforce any and all of the
company’s Patents for Inventions, Utility Models,
Layout-Designs (topographies) of Integrated
Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer’s Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma:

Date/Fecha: [I

Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, framitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de InvenciOn, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de
Circuitos Integrados, Diseflos hid ustriales,
Marcas, Lemas Comerciales, Nombres
Comerciales, Enseæas Comerciales,
Denominaciones de Origen, Protecciôn de
Secretos Empresariales, Certificados de
Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominfo, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compaflia en la Repüblica de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad adminisirativa o judicial de cualquier jerarquia para cumplir con lo enconiendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar irnpuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percihir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compania, otorgar poderes a quienes vayari a representar a Ia compafiIa judicial y extrajudicialrnente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que par rnotivo de lo encomendado se presentaren, dÆndoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones,

City,Country/Ciudad,PaIs: New York, New York, USA

- Raiijcch’

uan JL-mc our

E1

Zzvit Cnahu
accuei,n C}nparc,
JosØ Luis LondoOn
FJipc Msndazs
Srn6n Salinas

Of Counsel
GuiJlcrmo Chuiuin
Crciela Me1c

World Tradc Center - Torre A, Calle 100 No. 8A - 37, Piso JO, SogotÆ D.C.,Colombia
Tel – 57 1 601-7700, Fax + 57 1601-7799, ’6c olaiteraisbeck.corn, www.o1anraisbeck.com

A 514 flc Ptl

State of New York

} * / j
County oINew York ’ I, NORMAN GOODMAN. Ocursty C1er1ncrcrs ’b the gpreme Court of the Stare of- New York, in and for the County of New York, a Cour I Recc(rkhvi y Ia a seal,,

DO HEREBY CERTIFY.u.sn5rt,’ to the Execuri aw o State of ew ork,1ha

..

. . . Q2cA....

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknonled.gment r proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and tor the State of New.York duly commissior.ed, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his

autograph signature has been filed itt my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oa-th, he was duly authorized to rake the same; rhr I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or he compared thesignature on the annexd instrument with his autograph signature dpositod in my office, nd

I believe that such signature is genuine.
IN WITNESS WHEREOF, I have, hereunto set my hand aflined my official seal this AT’S

AID

County Clerk and Clerk of e Supreme Court, New York County

Notarial Certificate

On this date, ii August 2006

The undersigned Notary Public certifies:

1. That Grover F. Fuller, Jr. of legal age and
domiciled in
150 East 42"’street, New York, NY 10017 USA

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Attorney-in-Fact

3. That
VICURON PHARMACEUTICALS

having its principal place of business located
in

King of Prussia, Pennsylvania
is duly incorporated, is currently in
existence, and that the purposes for which
the Power of Attorney is granted are within
the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute
the Power of Attorney and that his/her
representation is legal.

Certificación Notarial

En esta fecha,

El Notario POblico suscrito certifica:

1. Que

Mayor de edad y domiciliado

Suscribióel docuinento que
antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito ci referido
documento en su character de
de

3. Que
con sede principal ubicada en

estæ legalmente constituida, que tiene
existencia legal vigente y que los
propósitos para los cuales se otorga ci
poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representacion
para suscribir ci poder, y que Østa es
legitirna.
5. The foundation for my certifications
contained in points 2, 3 and 4 was the 5. El fundamento de mis certificaciones
exhibition ofthe following authentic 00 \contenidas en los puntos 2, 3, y 4 fue la
document(s): r’, \xhibiciOn de los (del) siguiente (s)

documento(s) autØntico(s): Power of Attorney dated th 10 ’day of
October, 2005

NOTARY PUBLIC (Signature): !çj, L2k

rS

COUrtj Ly

it 4i’cT 2co(,

r6etj

N--’-bt

A\c1L b e

SUSANZ 1(1WAN
)loeaq Pub1ic State of New York
No. 01K16116521

Oua11ed ID New York County
imiuio Fpires October 4,

V

L;

14

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER ’Li-IE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

0

11111111111111 miii 11111 liii 11111 11111111111111111111 HIll liii liii IN 111111 IN 1111111

(43) International Publication Date PCT (10) International Publication Number
3 August 2006 (03.08.2006) WO 2006/080920 Al

(51) International Patent Classilication:
C07K 1/14(200601) C12P 1/04(2006.01)
C07K 141195 (2006-01) A61K 38/16(2006,0!)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/002733

PARENT!, Franco [IT/IT]; Via B. Cellini, 24, 1-20020 l,ainate (IT).

(74) Agent: FULLER, Grover, F., Jr.; do Jackie Lawrence, Pfizer, Inc., MS8260-1615, Eastern Point Road, Groton,
CT 06340 (US).

(22) International Filing Date: 27 January 2005 (2701.2005) (81)

(25) Fling Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
11/045,628 26 January 2005 (26.0 1.2005) US

(71) Applicant ’jbr all designated States except US): VI-

Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, 8W, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CL, DE, DK, DM. D’Z, EC, BE, l.-G, ES, FL, GB, (;D, GE, (il-I, GM,!-[R, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, K!’, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, Li’, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PIE, P1., N’, RO, RU, SC, SD, SE, SG, 5K, ST., SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, tJG, US, FL, VC, VN, YU,
LA, ZM, LW.

CURON PHARMACEUTICALS INC. [US/US]; 455 (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

. South Guiph Road, Suite 305, King of Prussia, Pennsyl- kind of regional protection available): ARIPO(BW, GH,

vania 19406 (US). GM, KE, LS, MW, ML, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
- LW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
(72) Inventors; and European (Af, BE, BG, CH, CY, CL, DE, DK, Eli, ES, El,
(75) Inventors/Applicants (for US only): LAZZARINI, FR, GB, GR, 11(3, IE, IS, IT, Li, LU, MC, NL, F!,, PT, RO,
Ameriga [IT/I’ll; Via 29 Maggio, 5, 1-20025 Legnano SE, si, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, Cl, CM, GA, (iN,
([’l’). GASTALDO, Luciano [IT/IT]; Via San Martino, 7, GQ, OW, Mt, MR, NE, SN, m, TG).
1-20010 Pogliano Milanese (IT). CANDIANI, Gianpaolo
- _ [IT/ITI; Via Bellini, 2/C, 1-20064 Gorgonzola (IT). CI- Published:
CILIATO, Ismaela (1TAT]; Via Orazio, 7,1-210-52 Bu,sto with international search report
Arsizio (IT). LOSE, Danlele ET/IT1; Via Carso, 28/B,
1-22069 Rovellasca (IT). MARINELLL, Flavia [IT/ITI; For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
Via Ruhens, 25, 1-20148 Milano (IT), SELVA. Enrico ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
[IT/IT]; Via di Vittorio, 23,1-27027 Gropello Cairoli (I’I’), fling of each regular issue ofthe PC"!’ Gazette.

_ - (54) Title: ANTIBIOTIC 107891, ITS FACTORS AL AND A2, PHARMACEIJTICALI.Y ACCEPTABlE SALTS AND COM-POSITIONS, AND USE THEREOF

-

(57) Abstract: The invention relates to an antibiotic substance of microbial origin, arbitrarily denominated antibiotic 107991 which
is produced by fermentation of Microbispora sp. AI’CC PTA-5024, the pharmaceutically acceptable salts and compositions thereof,
and their use as an antibacterial agent having inhibitory activity versus susceptible microbes. Antibiotic 107891, which is a complex

. comprising two Factors, denominated Factors Al and A2, has a peptide structure containing lanthionine and roethyllantLiionine as ii;-? constituents which are typical characteristics of the antibiotics of the]antibiotics group. Antibiotic 107891 and its Factors Al and A2

show a good antibacterial activity against Gram-positive bacteria including methicillin resistant and vancomycin resistant strains,
and is active also against some Gram-negative bacteria such as M. catharralis. Neisseria species and H. inJluenzae and Mycobacteria.

WO 2006/080929 PCT/US200I002733

ANTIBIOTIC 107891, ITS FACTORS Al AND A2, PHAB)IACEUTICALLY ACCEPTABLE SALTS AND COMPOSITIONS, AND USE THEREOF.

This application is an international filing based on U.S. Application Serial No. [Attorney Docket No. 892,280-5001, filed January 26, 2005, which is a continuation-in -part of U.S. Application Serial No. 11/035,296, filed January 12, 2005, which is a continuation-in-part of U.S. Application Serial No.10/521,336, filed on January 11, 2005, which is a § 371 national filing of PCT/EP2004/007658, filed on July 12, 2004, which claims priority to Et’ Application No. 03016306.7, filed July 18, 2003, all of which are hereby expressly incorporated by reference in-their entirety.
The present invention concerns an antibiotic substance of microbial origin, arbitrarily denominated antibiotic 107891, which is a complex comprising Factors Al and A2, the pharmaceutical acceptable salts thereof, pharmaceutical compositions thereof and their use as an antibacterial agent. Another object of the present invention is a process for preparing antibiotic 107891 which includes culturing Microbispora sp. 107891 (hereinafter identified as
Microbispora sp. ATCC PTA-5024) or a variant or mutant thereof
maintaining the ability to produce said antibiotic, recovering
the antibiotic of the invention from the mycelium and/or from
the fermentation broth, isolating the pure substance by chromatographic means and separating Factors Al and A2.
. Antibiotic 107891 is a novel antimicrobial agent with a peptide structure containing lanthionine and rnethyllanthionine
as constituents. These are the typical characteristics of lantibiotics and, in particular, of the subgroup acting primarily on cell wall biosynthesis.
Laritibiotics are peptides, which contain the thioether
amino acid lanthionine as well as several other modified amino acids (FI.G. Sahi and G.Bierbaurn, (1998) "Lantibiotics; biosynthesis and biological activities of uniquely modified

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733
2

peptides from gram-positive bacteria", Ann. ev. Microbiol.
52:41-79). The majority of known lantbiotics have
antibacterial activity, although some have be n reported as
active on different pharmacological targets. Th antibacterial
lantibiotics can be broadly divided into two groups on the basis of their structures: type-A lantibiotics are typically elongated, amphiphilic peptides, while type -B 1 ntibiotics are compact and globular (0. McAuliffe, R.P. Ross and C. Hill, (2001): ’Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of
action",. FEMS Microb. Rev. 25: 285-308). Nisin is the typical
representative of type A lantibiotic, whereas actagardine (gardimyciri) and mersacidin belong to the type B lantibiotic subclass. Both nisin-type and mersacidin-type lantibiotics
interact with the membrane-bound peptidoglyc n precursors
lipid II, although the two classes differ in th effects they
produce in the bacterial proliferation proces - Nisin-type lantibiotics primarily kill bacteria by permea ilization of the cytoplasmic membrane (H. Brotz, M. Josten,. Wiedemann,
U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum and H.G. S hi, (1998):"
Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in he formation
of pores by nisin, epidermin and other lantibotics", Mol. Microbiol. 30:317-27), whereas mersacidin-type lantibiotics primary kill the bacterial cell by inhibiting t e cell wall
biosynthesis (H. Brotz, G. Bierbauin, R. Leopold, E. Reynolds
and H.G. Sahi, (1998): ’The lantibiotic mersaci in inhibits
peptidoglycan synthesis by targeting lipid 11" Antimicrob Agents Chemother. 42:154-60).
Two antibiotics produced by Microbi.spora corallina strain NRRLL 30420, identified as antibiotic MF-BA-1768ct and MF-BA-1768I3, respectively, are described in US 6,551,591 81. The physico-chemical data reported in the above-ident fled patent (e.g. mass spectroscopy data, molecular weight, content of
aminoacids) and comparison of the retention tim s in LC -MS
experimental analyses clearly show that the antibiotic 107891 complex as well as its components Factor Al and Factor A2 are

WO 2006/980920 PCT/US2005/002733
- 60/18

chemical entities distinct from antibiotics MF-BA 1768a1 and MF-BA-17 68I.

EP 0592835A2 describes antitumor antibiotics BU-4803TA1,
A2, B, C1, C2 and D. Antibiotics BU-4803TA1 A2, and B are recovered from the fermentation broth of Microbispora ATCC 55327 (AA 9966) while antibiotics BU4803TC1, C2 and D are products of transformation of antibiotic BU 4803TA1, A2 and B, respectively, when these products are stored in dimethyl sulfoxide. The physico-chemical data reported in EP 0592 835 A for the above antibiotics (e.g. aspect, U.V. absorbtion, molecular weight, antitumor activity, clearly show that they are chemical substances distinct from antibiotic 107891 complex and its Factors Al and A2.
STRAIN AND FERMENTATION

Microbispora sp. 107891 was isolated in the environment
and deposited on February 27, 2003 with the American Type Culture Collection (ATCC),10801 University Blvd, Manassas VA, 20110-2209 U.S.A., under the provision of the Budapest Treaty. The strain was accorded accession number PTA-5024.
The production of antibiotic 107891 is achieved by cultivating a Microbispora sp. strain capable of producing it, i.e. Microbispora sp. ATCC PTA-5024 or a variant or mutant thereof maintaining the ability to produce said antibiotic;. isolating the resulting antibiotic from the whole culture broth and/or from the separated mycelium and/or from the filtered fermentation broth; and purifying the isolated antibiotic by chromatographic means. In any case, it is preferred to produce antibiotic 107891 under aerobic conditions in an aqueous nutrient medium containing easy assimilable sources of carbon, nitrogen, and inorganic salts. Many of the nutrient media usually employed in the fermentation field can be used, however certain media are preferred.
Preferred carbon sources are sucrose, fructose, glucose, xylose, and the like. Preferred nitrogen sources are soybean

WO 2006/080920
- 59/18

CTIUS2005I002733

meal, peptone, meat extract, yeast extra t, tryptone,
aminoacids, hydrolized casein and the like. Among the inorganic salts which can be incorporated in the culture
media, there are the customary soluble salt capable of
yielding sodium, potassium, iron, zinc, cobal, magnesium, calcium, ammonium, chloride, carbonate, suiphat, phosphate, nitrate, and the like ions.
Preferably, the strain producing antibiotic 107891 is
pre-cultured in a fermentation tube or in a shak flask, then
the culture used to inoculate jar fermen ors for the
production of substantial quantities of substance - The medium
used for the pre -culture can be the same as that employed for
larger fermentations, but other media can also be employed. The strain producing antibiotic 107891 can e grown at
temperature between 17°C and 37°C, optimal tempe atures being
around 28-30°C.

During the fermentation, antibiotic 107891 p oduction can
be monitored by bioassay on susceptible microorg nisms and/or by HPLC analyses. Maximum production of antibiotic 107891 generally occurs after circa 90 hours and before he 200 hours of fermentation.
Antibiotic 107891 is produced by cultivating M.icrobispora
sp. ATCC PTA-5024 or a variant or mutant thereo capable of
producing antibiotic 107891, and it is found in the culture broths and/or in the mycelium.
In this description and claims the term "antibiotic
107891", unless otherwise specified, identifies th antibiotic
107891 complex comprising Factors Al and A2.
MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF Microbispora sp ATCC PTA-
5024

Microbispora sp. ATCC PTA-5024 grows well on various
standard solid media. Microscopic dimensions we e measured
using the culture grown on humic acid-Trace Salts Agar
(composition in g/l: humic acid 0.5, FeSO4* H20 0.001,
11nC12*4H20 0.001, ZnSO4*7H20 0.001, NiSO4*61120 0.0 1, MOPS 2,

WO 2006/08020 PCTIUS2005/092733
- 58/18

agar 20) added with 1 mi/i of vitamins solution (thiamine hydrochloride 25 mg/1, calcium pai-itotenate 250 mg/l, nicotinic acid 250 mg/l, biotin 0.5 mg/l, riboflavin 1.25 g/l,
cyanocobalarnin 6.25 mg/l, paraminobenzoic acid 25 mg/l, folic
acid 500 mg/l, pyridoxal hydrochloride 500 mg/1).
In liquid culture (V6 medium, composition in g/l: dextrose
22, meat extract 5, yeast extract 5, casein 3, NaCl 1.5) no fragmentation of the mycelium is observed after 6 days of growth at 28°C. Microscopic examination on f-lumic acid-Trace Salts Agar (after 21 days of incubation at 28°C) reveals a
branched, un-fragmented substrate mycelium and a monopodially
branched aerial mycelium; many long, straight and poorly branched aerial hyphae are also visible. Characteristic longitudinal pairs of spores are borne by short sporophores laterally arising from branches or directly from the main aerial hyphae. Spores are globose and non-motile. Sporangium-like bodies or other particular structures are not observed.

CULTURAL CHARACTERISTICS OF Microbispora sp. ATCC PTA-5024 Microbispora sp. ATCC PTA-5024 was grown for six days in AF/MS liquid medium (see Example 1) at 28°C and 200 rpm, then
transferred (5% inoculum) to a new AF/MS liquid medium and
grown for further 6 days and finally inoculated (7% inoculum) into 100 ml of V6 liquid medium (see Example 1). After 6 days
of growth at 28°C and 200 rpm, the mycelium was harvested by
centrifugation and washed three times by sterile saline solution, then diluted to provide a suitable inoculum.
Aliquots of the suspension were streaked in a cross -hatched
manner onto various media recommended by Shining and Gottlieb (E.B. Shining and D. Gottlieb, (1966): "Method for Characterization of Streptomyces species", mt. J. syst.
E3acteriol. 16: 313-340), and media recommended by S.A. Waksman
(1961): "The Actinomycetes", The Williams and Wilkins Co.,
Baltimore. Vol.2:328-334).
The ability to use a variety of carbohydrates as a carbon

WO 2006/080920
-57/IS

PCTIIJS2005I002733

and energy source was determined using medium SP4 without
starch, added with 1 mi/i of the vitamin soluti n described
above as basal medium; each carbon source was dded at the
final concentration of 1% (w/v)
NaCl tolerance, pH range of growth as well a ability to
grow at different temperatures was determined onto ISP2
medium. All media were incubated at 28°C for hree weeks;
descriptions are referred to 21 days unless speci ied. Colour was assessed in natural daylight, using the Colour Atlas of
Maerz and Paul (A. Maerz and M.R. Paul, 1950 - A Dictionary of
Colour, 2nd edition. McGraw-Hill Book Co. Inc.,New York). Ability to reduce nitrates to nitrites was evaluat d in sloppy
Nitrate medium according to the procedure d scribed by
Williams et al. (S.T.Williams, M.Goodfeiiow, G.Alderson,
E.M.L-L.Wellington, P.H.A.Sneath & M.J.Sackin, 1983 - Numerical
classification of Streptomyces and related genera - J. Gen.
Microbiol. 129, 1743-1813).
Growth, colonial appearance, substrate nd aerial
mycelium colour and pigment production for strain icrobispora
sp. ATCC PTA-5024 are recorded in Table I. Vegetative growth
is present on most of the media used, differently from the aerial mycelium that is present only on some o them. No evident pigmentation is shown on any medium used. Physiological characteristics of the strain are p esented in Table II. Growth and aerial mycelium production are present at
17°C but not at 43°C. Production of aerial mycelium on 1SP2 is
present at pH higher than 6, while it is absent in resence of 1% NaCl.

The ability to use various carbohydrates for growth is shown in Table III.

WO 20061080920
- 56/18

PCT/US2005/002733

Table I: growth characteristics of Microbispara sp. ATCC PTA-

5024

MEDIUM GROWTH MORPHOLOGY REVERSE
COLOUR CODE

ISP 2 Abundant growth, wrinkled surface; 5 E 12
Yeast good production of pinkish (2A8) orangish/re
extract- aerial mycelium. d
Malt Slight production of
extract orangish/light brown soluble
agar pigment.
ISP 3 Abundant growth; good production 11 H 10
Oatmeal of pinkish (2A8) aerial mycelium, orangish/pi
agar particularly on the arms of the nk
cross-hatched streakes. Slight production of orangish soluble
pigment.
ISP 4 Good growth; no aerial mycelium 11 I 9
Inorganic produced. orange
salts- No soluble pigments produced.
Starch Starch hydrolysed.
agar

Glu/A5p Discrete growth, thin; production 12 K 12
Glucose- of thin, beige/pinkish (94) orangish/li
Asparagin aerial mycelium on the arms of the ght-brown
e agar cross -hatched streakes. No soluble
pigments produced.
ISP 6 Scant growth, with pinkish single nd
Peptone- colonies grown in height,
yeast convolute, with a smooth surface;
extract- no aerial mycelium, produced. No
iron agar darkening of the medium.

WO 2006/080920 PC/US20051002733 -55/18

ISP 7 Poor growth of a thin, nd
Tyrosine orangish/light-brown substrate
agar mycelium; no aerial mycelium

produced.

No darkening of the medium.
ISP3+YE Abundant growth, wrinkled surface; 4B 12
Oatmeal I very scant production of thin,, oranjish/re
1% yeast pinkish aerial mycelium d
extract No soluble pigments produced.
agar

(ISP4 and Glucose-Asparagine agar added with 1 ml/ I of vitamins solution)

Table II: physiological characteristics of Micrcbispora sp.

ATCC PTA-5024.
TEST REACTION

Starch hydrolysis Positive
Casein hydrolysis Negative
Calcium malate digestion Negative
Litmus milk peptOnization

-

Negative
Litmus milk coagulation Negative
Gelatin liquefaction Negative to slightly
positive
Tyrosine reaction Negative
Nitrate reduction Positive
PH range of growth (14 days)

-

no growth at 4.2, god
at 5.5 to 8.8; not
tested out of this

range.

Aerial mycelium abse t
at pH:5 6.5

NaCl % tolerance 2; absence of aerial
mycelium at?! 1.

WO 2006/080920
- 54/18

PCT/US2005/002733

Temperature range of growth 17°C to 37°C. Presence -
of aerial mycelium in
the whole range; no
growth at 43°C

Table III: utilization of carbon sources by Microbispora sp ATCC PTA-5024.

Carbon source Growth (14 days)
Arabinose
Cellulose
Fructose
Inositol +1-
Mannitol +++
Raffinose
Rhamnose
Sucrose

Xylose
Glucose ++
Glycerol ++
No sugar

+++ abundant; ++ good growth; + moderate growth; +1- scant growth; - no growth; aerial mycelium always absent.

CHEMOTAXONOMICAL CHARACTERISTICS OF Microbispora sp. ATCC PTA-5024

Microbispora sp. ATCC PTA-5024 was grown in GYM medium (glucose 4q11; yeast extract 4 g/l; malt extract 10 g/l) at 28°C on a rotary shaker and the mycelium harvested, washed twice with sterile distilled water and subsequently freeze-dried. Analyses of amino acids were carried out according to the method of Staneck and Roberts, (J.L. Starieck and G.D. Roberts, (1974): "Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography", Appi.

WO 2006/080920
- 53/18

CT/US2005/002 733

Mlcrobiol. 28: 226-231). Menaquinones and pola lipids were
extracted following the procedure of Minnikin et al. (D.E.
Minnikin, A.G. O’Donnell, M. Goodfellow., G. Alderson, M.
Athalye, A. Schaal and J.H. Parlett, (1984): "An integrated
procedure of isoprenoid quinones and polar lipids", J. Microbiol. Meth.2: 233-241). Polar lipids wer analysed by thin layer chromatography (D.E. Miriniki V.Patel, L.Alshamaony, and M. Goodfellow, (1977): ’Polar lipid composition in the classification of Nocardia and related
bacteria", J. Syst. Bacteriol.. 27:104-117), menaquinories
by HPLC (R.M. Rroppenstedt, (1982): "Separation of bacterial
menaquiriones by HPLC using reverse phase RP18 nd a silver
loaded ion exchanger as stationary phase", J. Liq Id. Chromat.
5:2359-2367; R.M. Kroppenstedt, (1985): "Fatty acid and
menaquinone analysis of actinomycetes and relate organisms",
in: Chemical Methods in Bacterial Systematic t’Jo20 SAB
Technical Series pp.173-199, M. Goodfellow and E. Minnikin
eds, Academic Press, London) and fatty acid meth 1 esters by
gas -liquid chromatography respectively (L.T. Mil er, (1982):
"A single derivatization method for bacterial fatty acid
methyl esters including hydroxy acids", J. Clin. icrobiol.16:
584-586; M.,Sasser, (1990): "Identification of bac eria by gas
chromatography of cellular fatty acids", CJSFCC ews Letters
20:1-6). The presence of mycolic acids was che ked by the
method of Minnikin et al. (D.E. Minnikin, L.Alsham ony, and M.
Goodfellow, (1975): "Differentiation of My obacterium,
Nocarciia and related taxa by thin layer chr matographic
analysis of whole organism methano yzates",..J.
Gen.Microbiol.88: 200-204)
Whole cell hydrolyzates of strain Microbispo a sp. ATCC
PTA-5024 contain meso-diaminopimelic acid as the diammino acid
of the peptidoglycan. The predominant menaquinon s are MK-
9(111, VIII -H4), MK-9(H2)and MK-9(Ho). The polar ii id pattern
is characterized by the presence of phosphatidylet anolamine,
methylphosphatidylethanolamine, phosphatidy -glycerol,

WO 20061080920 PCT/US200/002733
- 2It8

diphosphatidyl-glycerol, phosphatidyl-inositol, phosphatidyl-
inositolmannosides and N-acetylglucosamirie containing phospolipd,i.e. phospholipid type IV according to Lechevalier
et al. (H.A. Lechevalier, C. De BriŒve and M.P. Lechevalier,
(1977): "Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition", Biochem. Syst. Ecol. 5: 246-260). The major components of fatty acid pattern are anteiso 15:0, iso 16:0,
n-16:0, anteiso 17:0, and 10-methyl-heptadecanoic (10 -Me -
17:0), i.e 3c sensu Kroppenstedt (R.M. Kroppenstedt, (1985): "Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms", in: Chemical Methods in Bacterial Systematics. No20 SAB Technical Series pp.173-199. M. Goodfellow and D.E. Mirinikin eds, Academic Press, London). Mycolic acids are not detected.

MICROBISPORA sp. ATCC PTA-5024 16S rONA SEQUENCING
The partial sequence of the 16 rRNA gene (165 rDNA), i.e 1443 nucleotides, corresponding to 95% of the entire rRNA, of strain Microbispora sp. ATCC PTA-5024, was achieved following published procedures (P.Mazza, P.Monciardini, L.Cavaletti, M.Sosjo and S.Donadio, (2003): "Diversity of Actinoplanes and related genera isolated from an Italian soil", Microbial Ecol. 5:362-372). It is reported in SEQ ID NO 1.
This sequence was compared with that of strain Microbispora corallina NRRL 30420 (MF-BA-1768), as reported in US 6,551,591 Bl. The two sequences were aligned and differences were found at 31 out of 1456 aligned positions, accounting for an overall sequence divergence of 2.13%. Any two strains sharing less than 97,5% sequence identity usually belong to different species (Stackebrandt, E. and Embley, M.T. (2000) "Diversity of Uncultered Microorganisms in the Environment". In: Noncuiturable Microorganisms in the Environment, R.R. Colwell

and D.J. Grimes (eds). ASM, Press, Washington DC, pp. 57-75). Therefore a 2% level of sequence divergence is quite high
(Rossellô-Mora, R., and Amann, R. (2001). "The Species Concept

WO 2006/080920 _M/18PC1IUS20051002733

for Prokaryotes". FEMS Microbiol. Rev. 25: 39-67) and
indicates that Microbispora sp. ATCC PTA-5024 and icrobispora
corallina NRRL 30420 (MF-BA-1768) are different st ains.
IDENTITY OF STRAIN MICROBISPORA sp. ATCC PT -5024
The strain producing antibiotic 107891 is assigned to the genus Microbispora, family Streptosporangiaceae be ause of the following chemotaxonomical and morphological chara teristics:
- presence of meso-diaminopimelic acid in the cell wall;
- major amount of MK-9(III, VIII -H4) and phosphol pid type IV
according to Lechevalier et al. (H.A. Lechevalier, - De SriŁve
and M.P. Lechevalier, (1977): "Chemotaxonomy of aerobic
actinomycetes: phospholipid composition", Biochem. Syst. Ecol.
5: 246-260);
- fatty acid profile of 3c sensu Froppen tedt (R.M.
Kroppenstedt, (1992): "The genus Nocardiopsis’, in: The Prokariotes, Vol II,, pp.1139-1156, A. Balows, H Truper, M.
Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer eds; New York, Springer-
Verlag);
- absence of rnycolic acids;
- formation of characteristic longitudinal pairs f spores on
the tips of short sporophores laterally branching from aerial hyphae. Non-motile spores.
- partial sequence of the 16 rRNA gene(16S rDN), i.e 1443
nucleotides, corresponding to 95% of the entire rR A, reported
in SEQ ID NO.1, showing > 97 % identity to 165 rD A sequences
from described Microbispora species.
As with other microorganisms, the characteristi s of strain
producing antibiotic 107891 are subject to va iation. For
example, artificial variants and mutants of the s rain can be
obtained by treatment with various known mutage s, such as
U.V. rays, and chemicals such as nitrous acid, N-methyl--N’- riitro-N-nitrosoguanidine, and many others. All natural and
artificial variants and mutants of strain Micr bispora sp.
ATCC PTA-5024 capable of producing antibiotic 107891 are deemed equivalent to it for the purpose of this i vention and

[ii

zI

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733
- 50/18

therefore within the scope of invention.
EXTRACTION AND PURIFICATION OF ANTIBIOTIC 107891 As mentioned above, antibiotic 107891 is found almost equally distributed both in the mycelium and in the filtered fraction of the fermentation broth.
The harvested broth may be processed to separate the mycelium from the supernatant of the fermentation broth and
the mycelium may be extracted with a water-miscible solvent
to obtain a solution containing the 107891 antibiotic, after removal of the spent mycelium. This mycelium, extract may then be processed separately or in pool with the supernatant according to the procedures reported hereafter for the supernatant fraction. When the water-miscible solvent may cause interferences with the operations for recovering the
antibiotic from the mycelium extract, the water -miscible
solvent may be removed by distillation or may be diluted with water to a non -interfering concentration.
The term "water -miscible solvent" as used in this
application, is intended to have the meaning currently given in the art of this term and refers to solvents that, at the conditions of use, are miscible with water in a reasonably wide concentration range. Examples of water-miscible organic solvents that can be used in the extraction of the compounds
of the invention are: lower alkanols, e.g. (C1. -C3) alkanols
such as methanol, ethanol, and propariol; phenyl (C1 -C3)
alkanols such as benzyl alcohol; lower ketones, e.g. (C3 -C4)
ketones such as acetone and ethyl methyl ketone; cyclic ethers such as dioxane and tetrahydrofuran; glycols and their products of partial etherification such as ethylene glycol,
propylene glycol, and ethylene glycol monomethyl ether, lower
amides such as dimethylformamide and diethylformamide; acetic acid dimethylsulfoxide and acetonitrile.
The recovery of the compound from the supernatant of the fermentation broth of the producing microorganism is conducted according to known per se techniques which include extraction

WO 2006/080920
- 49/18

with solvents, precipitation by adc changing the p14 of the solution, by reverse phase partition chromatc
chromatography, molecular exclusion
like or a combination of two or mor

procedure for recovering the compounc the filtered fermentation broth antibiotic 107891 with water-immisc

followed by precipitation from the

733

- ig non-sol ents or by
rtition chromatography,
raphy, io exchange
hromatogra hy and the
of said t chniques. A
of the in ention from
cludes ex raction of
Die organi solvents,
concentrat d extracts,
POSS1DIY oy aciai.ng a preciptacng ageni.
Also in this case, the term "water-immiscible solvent" as used in this application, is intended to have the meaning
currently given in the art to said term and refers to
solvents that, the conditions of use, are slightly miscible
or practically immiscible with water in a reasonably wide
concentration range, suitable for the intended use.
Examples of water-immiscible organic solvents that can be used in the extraction of the compounds of the in ention from the fermentation broth are:
alkariols of at least four carbon atoms which ma be linear,
branched or cyclic such as n-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 3,3-dimethyl-1-
butanol, 4-methyl-1-pentanol, 3 -methyl -1 -pen anal, 2,2-
dimethyl-3-pentanol, 2, 4-dimethyl-3-pentanol, 4, 4-dimethyl-
2-pentanol, 5-methyl--2--hexanol, 1-heptanol, 2-h ptanol, 5-
methyl-1-hexanol, 2-ethyl-1--hexanol, 2 -methyl -3- exanol, 1-
octanol, 2-octanol, cyclopentanol, 2-cyclopenty ethanol, 3-
cyclopenthyl-1--propanol, cyclohexanol, cycloheptanol,
cyclooctanol, 2, 3-dimethyl-cyclohexanol, 4-ethylcyclohexanol,
cyclooctylmethartol, 6-methyl-5-hepten-2-ol, 1- onanol, 2-
nonanol, 1-decanol, 2-decanol, and 3-decanol; ketones of at least five carbon atoms such as methylisopropylketone,
methyl isobutylketone, met hyl-n- amyl ketone, methylisoamyl ketone
and mixtures thereof.
As known in the art, product extraction from the filtered

WO 2006/080920
- 48/18

PCT/US2005/002733

fermentation broth may be improved by adjusting the pH at an appropriate value, and/or by adding a proper organic salt forming an ion pair with the antibiotic, which is soluble in the extraction solvent.
As known in the art, phase separation may be improved by salting the aqueous phase.
When, following an extraction, an organic phase is recovered containing a substantial amount of water, it may be convenient to azeotropically distill water from it. Generally, this requires adding a solvent capable of forming minimum azeotropic mixtures with water, followed by the addition of a precipitating agent to precipitate the desired product, if necessary. Representative examples of organic solvents capable of forming minimum azeotropic mixtures with water are: n-butanol, benzene, toluene, butyl ether, carbon tetrachloride, chloroform, cyclohexane, 2,5-dimethylfuran, hexane, and m-xylene; the preferred solvent being n-butanol.
Examples of precipitating agents are petroleum ether, lower alkyl ethers, such as ethyl ether, propyl ether, and butyl ether, and lower alkyl ketones such as acetone.
According to a preferred procedure for recovering antibiotic 107891, the filtered fermentation broth can be contacted with
an adsorption matrix followed by elution with a polar, water -
miscible solvent or a mixture thereof, concentration to an oily residue under reduced pressure, and precipitation with a precipitating agent of the type already mentioned above. Examples of adsorption matrixes that can be conveniently used in the recovery of the compounds of the invention, are polystyrene or mixed polystyrene-divinylbenzene resins (e.g. 1,1112 or S112, Dow Chemical Co.; Amberlitefi XAD2 or XAD4, Rohm & Haas; Diaion HP 20, Mitsubishi), acrylic resins (e.g. XAD7
or XAD8, Rohm & Haas), polyamides such as polycaprolactames,
nylons and cross -linked polyvinylpyrrolidones (e.g. Polyamide-
CC 6, Polyamide-SC 6, Polyamide-CC 6.6, Polyamide-CC 6AC and
Polyamide-SC 6AC, Macherey-Nagel & Co., Germany; PA 400,

WO 2006/080920-47/18 CTfUS2005/002 733

M.Woelm AG, Germany); and the polyvinylpirrolidone resin PVP-
CL, (Aldrich Chemie GmbH & Co.., KG, Germany) and controlled
pore cross -linked dextrans (e.g. SephadexO LH 20, Pharrnacia
Fine Chemicals, AS). Preferably, polystyre e resins are
employed, particularly preferred being the Diaio HP 20 resin.
In the case of polystyrene resins, polystyrene-
divinylbenzene resins, polyamide resins or acr lic resins a
preferred eluent is a water -miscible solvent o its aqueous
mixtures. The aqueous mixtures can contain buffers at appropriate pH value.
Also in this case, the term ’water-miscible solvent", as used in this description and claims, is intended to have the
meaning currently given in the art to said ter as described
above.
The successive procedures for the isolation an purification
of the antibiotic may be carried out on the po led extracts
from the broth supernatant and from the mycelium. For example,
when the portion of the antibiotic product contained in the filtered fermentation broth or supernatant is recovered by
absorption on an absorption resin and the po tion of the
antibiotic product contained in the mycelium ’s extracted
therefrom with a water -miscible solvent, ollowed by
adsorption onto an absorption resin, the eluted f actions from
each of the two sets of absorption resins may e combined,
optionally after concentration, and then further rocessed as
a unitary crop. Alternatively, when the two sets of absorption
resins utilized for the separate extraction stage are of the
same type and have the same functional character stics, they
may be pooled together and the mixture may be su mitted to a
unitary elution step, for instance, with a wa er-miscible
solvent or a mixture thereof with water.
In any case, whatever may be the procedure dopted for
recovering the crude antibiotic 107981, the successive purification step is usually carried out on the ml ture of the crude materials resulting from the combination of the products

11

WO 2006/080920 PCTIUS2005/002733
- 46/18

originating from the separate extraction stages.
Purification of the crude antibiotic 107891, can be accomplished by any of the known per se techniques but is preferably conducted by means of chromatographic procedures. Examples of these chromatographic procedures are those reported in relation to the recovery step and include also chromatography on stationary phases such as silica gel, alumina, activated magnesium silicate an the like or reverse phase chromathography on silanized silica gel having various functional derivatizations, and eluting with water miscible solvents or aqueous mixture of water-miscible solvents of the kind mentioned above.
For instance, preparative HPLC chromatography may be employed, using RP -8 or RP-18 as stationary phase and a mixture of HCOONH4 buffer: CI-I3CN as eluting system.
The active fractions recovered from the purification step are pooled together, concentrated under vacuum, precipitated by addition of a precipitating agent of the kind mentioned above and dried or lyophilised in single or iterative rounds. In the case the product contains residual amounts of ammonium formate or’ other buffering salts, these may be removed by absorption of the antibiotic 107891 on solid phase extraction column, for instance a reverse phase resin column such as SPE Superclean LCP18 Supelco (Bellefonte PA, USA) followed by washing with distilled water and elution with an appropriate aqueous solvent mixture, e.g., ethanol:water. The antibiotic is then recovered by removing the elution solvents. Accordingly, a purified antibiotic 107891 complex dried preparation is obtained as a white powder.
As usual in this art, the production as well as the recovery and purification steps may be monitored by a variety of analytical procedures including inhibitory assay against susceptible microorganisms and analytical control using the HPLC or HPLC coupled with mass spectrometry.
A preferred analytical HPLC technique is performed on a

WO 2006/080920
45/18

PT/US2005/002733

Waters instrument (Waters Chromathography, ilford, MA)
equipped with a column Waters Simmetry-shield R 8, 5p (250 x
4.6 mm) eluted at 1 ml/min flow rate and at 50°C emperature.
Elution was with a multistep program: Time=0 (30% phase B);
Time=8 mm (30% Phase B); Time=28 mm (40 % of ph se 5)
Phase A was acetonitrile: 100 mM ammonium f rmate buffer
(p11:5.0) 5:95 (v/v) and Phase B was acetonitril.tJV detector was at 282 rim.
The effluent from the column was splitted in a ratio 5:95
and the majority (Ca. 950 p1/mm) was diverted o photodiode
array detector. The remaining 50 pl/min were di erted to the
ESI interface of a Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer
(Therxnoquest, Finnigan MAT, San Jose CA).
The mass spectrometric analysis was perform d under the
following conditions:
Sample inlet conditions:
Sheat gas (N2)60 psi;
Aux gas (N2)5 psi;
Capillary heater 250°C;
Sample inlet voltage settings:
Polarity both positive and negative;
Ion spray voltage +1- 5 kV;
Capillary voltage +1- 19V;
Scan conditions: Maximum ion tixne200 ms;
Ion time 5 ms;
Full micro scan 3;
Segment: duration 30 mm, scan events positive (1 0-2000 m/z)
and negative (150-2000 m/z).
In these analytical HPLC conditions the antibiotic 107891
Factors Al and A2 showed retention times of 13,2 in and 13,9
mm, respectively. In the same HPLC system Ra oplanin A2
Factor (L.Gastaldo, R.Ciabatti, F.Assi, E.Restelli,
J.K.Kettenring, L.F.Zerilli, G.Romanô, M.D naro and
B.Cavalleri, (1992): "Isolation, structure determ nation and
biological activity of A-16686 Factors All, A’2 and A’3

F-1

WO 2006/080920
- 44/18

PCT/1J S200I002733

glycol ipodepsipeptide antibiotics", J. Ind. Microbiol. 11: 13-
18) eluted with a retention time of 7.5 ruin.
Antibiotic 107891 Factors Al e A2 may be separated from a purified sample of antibiotic 107891 complex by means of preparative HPLC.
Factor Al was separated and purified on a Symmetry Prep. C18 column from the purified antibiotic 107891 complex dissolved in DMSO: formic acid 95:5 (v/v) using a 25 minutes linear gradient elution from 30% to 45% of phase B at 3.5 ml flow

rate.

Phase B was acetonitrile. Phase A was 25 mM ammonium formate buffer pH 4.5: acetonitrile 95:5 (v/v). The eluted fractions containing pure antibiotic 107891 Factor Al were pooled and concentrated under vacuum. The residual solution was lyophilised yielding pure Factor Al as a white powder.
Factor A2 was separated and purified by isocratic elution on
a Symmetry Prep. C18 column from a sample of purified antibiotic 107891 complex dissolved in acetic acid: acetonitrile: 100 mM ammonium formate buffer (pH 4) 50:120:80 (v/v) mixture. Isocratic elution was performed at a 7 ml flow rate with a mixture 100 mM ammonium formate buffer pH 4: acetonitrile in the proportion 82.5:17,5 (v/v). The eluted fractions containing pure antibiotic 107891 Factor A2 were pooled and concentrated under vacuum. The residual solution was liophilized yielding pure Factor A2 as a white powder. Since antibiotic 107891 and its Factors Al and A2, as shown by acid/base titration in 2-methoxyethanol (MCS):H20 12:3 (v/v), contains a basic function, they are capable of forming salts with suitable acids according to conventional procedures and they may exist also in the free base form.
Antibiotic 107891 and its Factors Al and A2, when obtained in the free base form, may be converted with acids into the corresponding salts, which include non-toxic pharmaceutically acceptable salts. Suitable salts include those salts formed by standard reaction with both organic and

WO 20061080920 PTIUS2005I002733
- 43/18

inorganic acids such as, for example, hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, phosphoric, acetic, trfluoroacetjc,
trichioroacetic, succinic, citric, ascorbic, la tic, maleic,
furnaric, palmitic, cholic, pamoic, mucic, glutamic, camphoric, glutaric, glycolic, phthalic, tartaric, laur’c, stearic,
salicylic, methane sulfonic, benzenesulfonic, so bic, picric,
benzoic, cinnamic and the like acids. The addi ion salts of
antibiotic 107891 and its Factors Al and A2, with acids can be
prepared according to the usual procedures commo ly employed. As an example, antibiotic 107891 or its Facto Al. or its
Factor A2, in the free base form, is dissol ed into the
minimum amount of a suitable solvent, typica ly a lower
alkanol, or a lower alkanol/water mixture, the s oichiometric
amount of a suitable selected acid is gradually added to the obtained solution and the obtained salt is precipitated by the
addition of a non -solvent. The addition salt wh ch forms is
then recovered by filtration or evaporation of the solvents.
Alternatively, these salts can be pre ared in a
substantially anhydrous form through lyophilizaton; in this case a salt of antibiotic 107891 or its Facto Al or its Factor A2 with volatile acid is dissolved with a suitable
amount of non-volatile acid. The solution is t en filtered
from any insolubles and is lyophilized in single r iterative
rounds.
A specific addition salt may be also obta ned from a
solution of another salt form of antibiotic 10 891 or its
Factor Al or its Factor A2 when the desired salt recipitates
upon addition of the appropriate anion.
The transformation of the non salts compo nd of the
invention into the corresponding addition salt, and the
reverse, i.e. transformation of an addition salt o a compound
of the invention into the non-salt form are within the
ordinary technical skill and are encompassed by he present
invention.

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733
- 42/18

The formation of salts of antibiotic 107891 and its Factors Al and A2 may serve several purposes, including the separation, purification of said antibiotic 107891 and its Factors Al and A2 and their use as therapeutical agents or animal growth promoters. For therapeutical purposes, the pharmaceutically acceptable salts are usually employed.
The term "pharmaceutically acceptable salts" identifies those non-toxic salts which can be utilized in the therapy of warm-blooded animals.
The antibiotic 107981 complex, its Factors Al and A2 and
a mixture of said Factors in any proportion can be administered as such or in mixtures with pharmaceutically acceptable carriers and can also be administered in conjunction with other antimicrobial agents such as penicillins, cephalosporins, aminoglycosides and glycopeptides.
Conjunctive therapy, thus includes sequential, simultaneous and separate administration of the active compound in a way that the therapeutic effects of the first administered one is not entirely disappeared when the subsequent is administered.
The compounds of the invention, or its pharmaceutically acceptable addition salts, can be formulated into forms suitable for parenteral, oral or topical administration. For i v. administration in the treatment of any infection involving a microorganism susceptible to the antibiotic, a parenteral formulation is, for instance, in water with an appropriate solubilising agent such as polypropylene glycol or dimethylacetarnide and a surface-active agent (e.g. polyoxyethylene sorbitan mono-oleate or polyethoxylated castor oil) or cycladextrins or phospholipid based formulations in sterile water for injection. An injectable formulation may be also obtained with an appropriate cyclodextrin.
The antibiotic 107981 complex, its Factors Al and A2 and
a mixture of said Factors in any proportion may also be used

WO 2006/08092() ’CT/tJS2095/002733
- - 41/18

in a suitable pharmaceutical form such as a cap ule, a tablet
or an aqueous suspension for oral administr tion or with
conventional creams or jellies for topical applications.
Besides their use as medicaments in human a d veterinary
therapy, the compounds of the invention can al o be used as
animal growth promoters. For this purpose, a co pound of the
invention is administered orally in a suitable f ed. The exact concentration employed is that which is requir d to provide for the active agent in a growth promotant eff ctive amount when normal amounts of feed are consumed.
The addition of the active compound of the invention to animal feed is preferably accomplished by reparing an appropriate feed premix containing the active c mpound in an effective amount and incorporating the prernx into the complete ration.. Alternatively, an intermediate c ncentrate or feed supplement containing the active ingredient can be
blended into the feed. The way in which such feed premixes and
complete rations can be prepared and administered are
described in reference books (such as "App ied Animal
Nutrition", W.H. Freedman and CO., S. Francisco, U.S.A., 1969
or "Livestock Feeds and Feeding" 0 and S books Corvallis,
Ore., U.S.A., 1977).

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF ANTIBIOTIC 107891

A) Mass spectrometry:
in MS experiments on a Thermofinnigan LCQ deca instrument
fitted with an electrospray source, using Th rmofinnigan
calibration mix, antibiotic 107891 gives two doubi protonated
ions at mlz=4124 and at m/z 1116 corresponding to lowest isotope composition of the complex Factors A and A2,
respectively. The electrospray conditions were: Spray Voltage:
4.7 kV; Capillary temperature: 220°C; Capillary Vo tage: 3 V;
Infusion mode 10 ti/min. Spectra were recorded rom a 0.2
mg/ml solution in methanol/water 80/20 (IV) with
trifluoracetic acid 0,1% and are reported in Fig.1A (full scan

[.I

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733
- 40/18

low resolution spectrum) and lB (zoom-scan high resolution spectrum).
B) The infrared spectrum of antibiotic 107891 recorded in
KBr with a Bruker FT-IR spectophotometer model IFS 48, exhibits absorption maxima at (cm1): 3263; 2929; 1661; 1533; 1402; 1114;
1026. Infrared spectrum is reported in Fig.2. Absorption bands
at 1631, 1596 and 1346 are attributed to residual amounts of
ammonium formate.

C) The U.V. spectrum of antibiotic 107891, performed in methanol/H20 (in ratio 80:20) with a Perkin-Elmer spectrophotometer Lambda 16, exhibits two shoulders at 226 and 267 nm. UV spectrum is reported in Fig.3
D) ’H-NM spectrum was recorded in the mixture methanol-d4:H20
(pH 4.3 HCl) 40:10 (v/v) at 40°C on a Bruker AMX 600 spectrometer applying a water suppression sequence. As internal standard the residual signal of methanol-d4 at 3.31 ppm was considered
The H-NMR spectrum of antibiotic 107891 is reported in Fig.4. ii.! NMR spectrum of antibiotic 107891 dissolved in methanol - d4:H20 (0.011 HCl) 40:10 (v/v) exhibits the following groups of signals (in ppm) at 600 MHz using MeOH-d4 as internal standard
(3.31 ppm), {&ppm, multiplicity; (attribution)): 0.93 d
(CU3), 0.98 d (CF13), 1.07 t (overlapped CH3’s), 1.18 t
(overlapped CU3’s), 1.26 s (CH3), 1.30 t (overlapped
CH31s)1 1.62-1.74 m (CU2), 1.78 d (CH3), 1.80 d (CU3),
2.03 m (CH2), 2.24 m (CU), 2.36 m (CU2), 2.72 - 3.8 m
(peptidic alpha CU’s), 3.8 - 5.2 m (peptidic alpha CU’s),
5.53 - 6.08 s (CH2), 5.62 d (CH double bond), 6.42 m
(CH), 6.92 d (CU double bond), 7.0 -. 7.55 m (aromatic CH’s),
7.62 - 10.4 d and m (aromatic and peptidic NH
E) 13C-NMR spectrum was recorded in the mixture Osmethanol-d4:H20
(pH 4.3 HCI)40:10 (v/v) at 40°C on a Bruker AMX 600 spectrometer using as internal standard the residual signal of
methanol -d4 at 49.15 ppm. The 13C-NMR spectrum bb decoupled of
antibiotic 107891 is reported in Fig.5.

WO 2006/080920
- 39/18

P4T/US20)5/002733

’3C NMR spectrum of antibiotic 107891 dissolve4 in methanol-d4:H20 (0.01 N HC1) 40:10 (v/v) exhibits the f4lowing groups
of signals (in ppm) at 600 MHz using MeOH-d as internal
standard (49.15 ppm), (8-ppm; (attribution)): 13.6 - 23.2 (aliphatic CH31s), 26.16 - 73 (aliphatic CH2’s and peptidic
alpha CH’s), 105 - 136 (aromatic and double b nds Cl-I’s and
quaternary carbons), 164.3- 176.3 (peptidic carbon is).
F) Antibiotic 107891 complex was dissolved in 2- ethoxyethanol
(MCS):H20 12:3 (v/v) containing a molar exces of 0.01 M
hydrochloric acid. The solution was then back ti rated with a
solution of 0.01 N potassium hydroxide. T e resulting
titration curve showed one basic ionizable functi n.
AMINO ACIDS COMPOSITION OF ANTIBIOTIC
107891 AND ITS FACTORS Al AND A2
A) Determination of "acid resistant" am noacids in
Antibiotic 107891 complex
Antibiotic 107891 was submitted to complete acidic
hydrolysis (HC1 6N, 105°C, 24h) and amino acid c mponents of
the antibiotic resistant to acid treatment were identified. Acid labile amino acids are not detectable with this approach. The hydrolysate was studied by HPLC-MS and GC- S analysis,
after suitable derivatization, in comparison with mixture of
standard amino acids similarly derivatized. For H LC analysis
the hydrolyzed sample was treated with 6-aniin quinolyl-N-
hydroxysuccinimidyl carbamate (AccQ-TagTM Fluor reagent kit), for GC anlysis with a mixture of 3N HC1 in anhydr us methanol and trifluoroacetic anhydride.
The qualitative HPLC analysis was carried out on a liquid chromatography system with simultaneous DAD and MS etection. The HPLC method had the following conditions:
Column: AccQ-TagTM (Waters C18 NovoPak 4pm 3.9 x 1 0mm)
Column temperature: 37°C
Flow: 1 mL/min.
Phase A: Ammonium acetate 140mM pH 5 (acetic acid)
Phase B: Water:acetonitrile 60:40 (v/v)

C

WO 2006/080920
38/18

Elution Program

PCT/US200/002733

Time 0 5 30 35 40 41

5 5 80 95 95 5

UV detection: 254rim
MS conditions were the following:
Spectrometer: Finnigan LCQ Deca equipped with standard electrospray source.
Capillary temperature: 250°C
Source voltage: 4.70 Ky
Source current: 80 pA
Capillary voltage: -15V
The qualitative GC analysis was carried out on a gas cromatographer fitted with MS -El detection.
The GC method had the following conditions:
Column: J & W Scientific DB-5, 30m x 0.254 mm ID x 0.25 turn FT
Carrier gas: helium
Injection mode: splitless
Injector temperature: 200°C
Transfer line temperature: 300°C
Temperature program: from 50°C to 100°C at (10
from 100°C to 250°C at 10°C/mm (15 15 min at
250°C

Injection volume: 1.tl
MS conditions were the following:
Spectrometr: Finnigan TSQ700
Ionisation mode: Electron impact Voltage setting:
Filament current: 400 mA Electron multiplier: 1400 V Electron energy:70 eV
Positive ion mode
Scan condition:

WO 2006/080920 CT/LJS20051002733
- 37/18

Scan range:40-650 amu
Scan time:1 sec
In the LC/MS and GC/MS chromatograms obtained on the
hydrolysate of antibiotic 107891, the followi g amino acids
were identified along with other uniden ified peaks:
lanthionine, methyllanthionirte, glycine, pro me, valine, aspartic acid (NMR studies indicate that this is a transformation product of asparagine, which gene ates aspartic acid by hydrolysis), phenylalanine and leucine.
Antibiotic 107891 Factors Al and A2 were submitted to complete acidic hydrolysis in the same conditions (derivatization and HPLC-MS) reported for the corn lex. The GC -
MS analysis was carried out on a Thermo Finniga Trace CC-MS
instrument equipped with PTV injector
The GC method had the following conditions:
Column: Restek RTX-5MS, 15m x 0.25 mm ID x 0.25 FT Carrier gas: helium
Interface temperature: 250°C
Temperature program: 1.5 min at 50°C, from 5 0C to 100°C
at 1 min at 100 DC, from 100°C to 135°C t
1 min at 135°C, from 135°C to 250° at 1 in at 250°C
Injection volume: 1 Al
Injector: splitiess mode, base temperature
temperature 280°C, transfer rate 14.5°C/mm
MS conditions were the following:
lonisation mode: Electron impact
Voltage setting:
Filament current: 149 I.iA
Electron multiplier: 200 V
Electron energy: 70 eV
Positive ion mode:
Scan condition:
Scan range:
Scan time:

33-500 amu
0.6 sec

50°c, transfer

In the hydrolysate of Factor Al of antibiotic 107891,

Ll

(3

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733 k)
- 36/18

HPLC/MS and GC/MS chromatograms showed the presence of the following amino acids along with other unidentified peaks: lanthionine, methyllanthionine, glycine, proline, valine, aspartic acid (NMR studies indicate that this is a transformation product of asparagine, which generates aspartic acid by hydrolysis), pheriylalariine and leucine.
The above procedure carried out on Factor A2 revealed
the presence of the following amino acids along with other unidentified peaks: lanthionine, methyllanthionine, glycine,
proline, valine, aspartic acid (NMR studies indicate that this
is a transformation product of asparagine, which generates
aspartic acid by hydrolysis), phenylalanine and leucine.
B) Determination of 5-chiorotyptophan in antibiotic
107891 complex and in its Factor Al and Factor A2.
. Complete hydrolysis of purified 107891 complex and its single Factors Al and A2 was performed according to the method described by Simpson RJ, Neuberger MR, Liu TY, "Complete Aminoacid Analysis of Proteins from a Single Hydrolysate".
Journal Biol. Chem (United States), April 10, 1976, 251 (7),

1936-40.

This hydrolysis procedure prevents degradation of amino acids normally unstable during mineral acid digestion and thus allows the determination of these amino acids, including tryptophan, from a hydrolysate of a peptide. A standard sample of 5-chloro-DL-tryptophan was purchased from Biosynt AG, Staad, Switzerland and its structure was confirmed by NMR analysis; DL-tryptophan was purchased from Merck KGaA, Darmstadt, Germany.
Factor Al (1,5 mg) was suspended in 0,6 ml of 44 methanesulfonic acid containing 0,2% (w/v) 3-(2-aminoethyl)indole as catalyst for the hydrolysis. The hydrolysis was carried out at 115°C for 16 hours. The hydrolysate was then neutralized with SN NaOH and diluted with an equal amount of distilled water. 100.i1 of this solution was analysed by LC -MS. The separation was performed on a

WO 2006I080920 PCT/US200/002733
- 3JI8

Symmetry C (5 pm) 4.6 x 250 mm. column (Wate s Co. Milford
MA, USA) equipped with a Symmetry C (5 pm) 3,9 x 20 mm
precolurnn. Elution was performed at 1 ml/min fl w rate with a
25 linear gradient from 0% to 50% of Phase. Phase A was
25 mM HCOONH4 buffer pH 4.5:CH3CN 95:5 (v/v) an Phase B was
CH3CN. UV detection was at 280 nm. The i-IPLC equipment was coupled with a Finnigan LCQ ion trap Mass Spectrometer (Thermnoquest, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA). 50 pl/min of the effluents from the column were diverted to the
Electrospray Ionization (ESI) interface of t e LCQ mass
spectrometer. The MS analysis was performe under the following conditions: sample inlet: shear gas (N2) 60 psi;
capillary heater 210°C; sample inlet voltage p larity: both
positive and negative; ion spray voltage +1-4,5 V; capillary
voltage +/-21 V; scan conditions: maximum ion tim 50 ms; full
micro: scan 3.
Standards of tryptophan and 5-chiorotryptoph n eluted at retention times of 8.1 minutes and 11.5 minutes c rresponding
to a M+H at m/z 205 and 239, respectively. In the hydrolysate
of antibiotic 107891 Factor Al the presence of a eak at 11.5
minutes with m/z at 238,97 indicated the presence f 5-chioro--
tryptophan.
Standard tryptophan was detectable with the
chromatographic system used with a detection ii it of 0,3
pg/mi. This value is lower than the value which would have
been indicative of the presence of said amirioa id in the
tested antibiotic sample. No tryptophan was dete ted within
the above said limit in the chromatogram of the hyd olysate of
antibiotic 107891 Factor Al. Identical results were obtained
from LC -MS analysis of a hydrolysate of Factor A2 and of a
hydrolysate of a purified sample of antibiotic 10789 complex.
MASS SPECTROMETRY OF ANTIBIOTC 107891 FACTOR Al AND FACTOR A2 Antibiotic 107891 Factor Al gives a doubly prot nated ion
at m/zz1124 and Factor A2 at m/z 1116 correspondi g to the lowest isotope composition in MS experiment on a

WO 2006/080920 PCT/IJS200/002733
- 34/18

Thermofinnigan LCQ deca instrument fitted with an electrospray source, using Therrnofinnigan calibration mix. The electrospray conditions were: Spray Voltage: 4.7 kV; Capillary temperature: 250°C; Capillary Voltage: 8 V; Infusion mode 10
Spectra were recorded from a 0.1 mg/ml solution in acetonitrile:water 50:50 (v/v) with acetic acid 0,5% and are reported in Fig.6A (full scan low resolution spectrum) and 6B (zoom-scan high resolution spectrum) and in Fig 7A (full scan low resolution spectrum) and B (zoom-scan high resolution spectrum)
The exact mass of antibiotic Factor Al and Factor A2 has
been determined by using a Bruker Daltonics APEX II, 4.7 Tesla spectrometer fitted with an electrospray source. On the basis
of these data, Factor Al is assigned a molecular weight of
2246.71–0.06, calculated monoisotopic mass from (M+21-112t at
rn/i 1124.36124 (accuracy 30 ppm), determined by high resolution ESI-FTMS. Factor A2 is assigned a molecular weight
of 2230.71–0.06, calculated rnonoisotopic mass from LM+2H12 at
m/z 1116.36260 (accuracy 30 ppm), determined by high resolution ESI-FTMS.
COMPARISON OF ANTIBIOTIC 107891 FACTOR Al AND FACTOR A2 WITH ANTIBIOTICS MF-5A-1768a AND MF-BA-176881

A) Nicrobispora corallina NNRL 30420 (MF-BA-1768), described
in US 6,551,591 Bi, was acquired from NNRL collection. In an
exploratory experiment, the M. corallina NNRL 30420 (MF-BA-1768) strain has been fermented in Erlenmeyer flask in the conditions described in US 6,551,591 Bi. The harvested broth was extracted by dilution with methanol. After centrifugation of the mycelium, the supernatant was loaded on a HP20 polystyrenic absorption resin, eluted with a methanol:water 70:30 mixture, which was reduced to small volume and was then lyophilized.
In the chromatogram two peaks showed 1091 and 1108 [M+2Fi12signa1s, corresponding to the [M+2F1]2 reported in US 6,551,581 81 for MF-BA-1768 and MF-BA-1768a1, respectively.

WO 2906/080929 PTItS200/002733
- 33/18

The above extract was then spiked with aritiIiotics 107891
Factors Al and A2 and the mixture was analyzed by LC -MS. The
peaks of antibiotics MF-BA-176881 and MF-BA-1768a1 and of antibiotics 107891 Factors Al and A2 were fund to have
distinct retention time and distinct [M+2HJ2 MS ragments.

B) In a further experiment, a 30 1 thank fe mentation of
Microbispora sp. strain NRRL 30420 (MF-BA-1768) was performed and the harvested broth was processed by ollowing the description of US 6,551,591 81. After purification steps
sequentially on I-1P20 polystyrenic resin and po yaxnide CC 6
0.1-0.3 mm (Macherey-Nagel) resin, two individu 1 substances
were obtained in pure form by preparative HP C on a p10
particle size C18 Phenomenex (Torrance CA, USA) L na (250x12..2
mm) column eluted at flow rate 27 ml/min with he following
multistep program: Time=0 mm (32% of phase B) Tirrte=8
(32% of phase B); Time=20 mm (36% of phase B); Time=32
(90% Phase B). Phase A was formic acid 0.05% (vi) in water,
Phase B was CH3CN.

These substances showed antibacterial acti ity against
staphylococci and enterococci as shown in Table V. In LC-MS
experiments the two substances showed IM+2 J double
protonated ions signals corresponding to antibiotic MF-BA-
1768ai and MF-BA-1768131, as described in (33 pate t 6,551,591
81.
Table IV
MIC_(gig/mi)
STRAIN MF-BA- MF-BA- 107891 1078-91 107891
1768a1 176881 Al A2 cozzçlax

1400 Staphylococcus aureus 0.13 0.5 0.13 0. 3 0.13
cl.isoi. Met r

568 Enterococcus faecium 4 16 1 2 2
ci. isol.

569 Enterococcus faecium 4 8 1 2 2
ci.isol. Van A

559 Enterococcus faecalis 4 8 1 2 1
cl.isol.

30

WO 2006/080920 PCT/US200/002733
- 32/18

Enterococcus faecalis JO 10_--5 11 [0. 5
cl.isol. Van A I L

Experimental conditions of the antimicrobial tests were
the same as those utilized for the tests reported in Table VI below.

The LC -MS analyses of the isolated antibiotics MF-BA-
1768ct1 and MF-BA-176611 were performed on a Symmetry C18 (5:m)
4.6 x 250 mm. column (Waters; Milford MA, USA) equipped with a
Symmetry C1.8 (5:m) 3.9 x 20 mm precolumn (both maintained in
an overt at 50 °C temperature). Elution was performed at 1 ml/min flow rate with the following multistep elution program:
Time=0 mm (30% Phase B); Time8 (30% Phase B); Time=20
min (45% Phase B); Time=24 mm (90% Phase B); and Time28 rniri
(90% Phase B). Phase A was 25 mM HCOONH4 buffer pH 45:CH3CN 95:5 (vlv) and phase B was CH3CN. The I-iPLC equipment was coupled with a Finnigan LCQ ion trap Mass Spectrometer
(Thermoquest, Finnigan MAT, San JosØ CA, USA). 100 Ill/min of
the effluents from the column were diverted to the ESI interface of the LCQ Mass Spectrometer. The MS analysis was performed under the following conditions: sample inlet: sheat gas flow (N2) 25 psi, aux gas flow 5 psi; capillary heater: 21-00C; sample inlet voltage polarity both positive and
negative; ion spray voltage: +1- 4,75 KV; capillary voltage:
+1- 12 V; scan conditions: maximum ion time 50 ms; full micro:
scan 3.
Individual antibiotic Factors MF-BA-1768a1 and MF-BA-1768B, and antibiotics 107891 Factors Al and A2 were analyzed individually and in mixture. The results are summarized in the following Table V.

TABLE V

Ret. time(min) [M+2H]’
MF-BA-1768I 12,86 1091
Antibiotic 107891 Al 16.3 1124
Antibiotic 107891 A2 - 16,81 1116
MF-BA-1768a1 18,1 1108

31

WO 2006/080929 PCT1tJS20951002733
- 31118

In the same chromatographic system ramoplanin factor A2
(LGastaldO, R.Ciabatti, F.Assi, E.Restelli, .K.Kettenring,
L.F.Zerilli, G.Romanà, M.Denaro and B.Cava len, (1992):
"Isolation, structure determination and biologi al activity of
A-16686 Factors All, Al2 and A13 glycol’podepsipeptide
antibiotics", J. Ind. Microbiol. 11: 13-18) w s eluted with
11,00 min retention time.
NMR SPECTROSCOPY OF ANTIBIOTIC 107891 ACTOR Al
AND FACTOR A2

’l-1-NMR spectra of antibiotic 107891 Factor Al and Factor
A2 were recorded in the mixture CD3CN:D20 (1:1) t 298 K on a
Bruker ANX 600 spectrometer applying a wate suppression
sequence. As internal standard the residua signal of acetonitrile-d3 at 1.94 ppm was considered.
A) The ’H-NMR spectrum of antibiotic 107891 actor Al is
reported in Fig.8.
1H NMR spectrum of antibiotic 107891 Factor 1, dissolved
in CD3CN:D0 (1:1), exhibits the following group of signals
(in ppm) at 600 MHz using CD3CN as internal s andard (1.94
ppm), [5=ppm, multiplicity; (attribution)]: 0.84 d (CH3),
0.89 d (CH3), 0.94 t (overlapped CH3’3), 1.1 d (CH3),
1.13 d (CH3), 1.15 t (overlapped CH3’s), 149 m (CU2),
1.69 ci (CH3), 1.75 m (CR2), 2.11 rn (CU), 2.26 m (CU),
2.5 m (CH2), 2.68 - 3.8 m (peptidic CH’s), 3.8 - 5.0 m
(peptidic CH’s), 5.45 - 6.17 s (CR2), 5.58 d (CU double
bond), 6.36 m (CH), 6.86 d (CH double bond),.0 -’- 7.45 m
(aromatic CU’s). The dimethyl sulfoxide signal is present at 2.58 ppm and the formate signal is also present at 8.33 ppm as impurities.
B) The ’H NMR spectrum bb decoupled of antibi tic 107891
Factor A2 is reported in Fig. 9.
’H NMR spectrum of antibiotic 107891 Factor A2 dissolved
in CD3CN:D20 (1:1), exhibits the following groups of signals
(in ppm) at 600 MHz using CD3CN as internal sta dard (1.94
ppm), [&’ppm, multiplicity; (attribution)]: 0.84 ct (CH3),

WO 2006/080920
-30/18

PCT/US200/002733 ?01

0.85 d (CU3), 0.94 d (CU3), 1.06 d (CU3), 1.14 d
(CH3), 148 in (CU2), 1.65-1.75 in (CU2), 1.67 d (CH3), 2.15
in (CU), 2.25 in (CU), 2.5 m (CH2), 2.77 - 3.8 in (peptidic
C1131s), 3.8 - 4.9 in (peptidic CHa’S), 5.45 6.14 S (CH2),
5.59 d (CU double bond), 6.34 in (CU), 6.84 d (CH double
bond), 7.0 - 7.42 in (aromatic CH’s). The dimethyl sulfoxide
signal is present at 2.58 ppm and the formate signal is also present at 8.32 ppm as impurities.
13C-NMR spectra of antibiotic 107891 Factor Al and Factor
A2 were recorded in the mixture CD3CN:D20 (1:1) at 298 K on a Bruker AMX 600 spectrometer using as internal standard the residual signal of acetonotrile-d3 at 1.39 ppm.
C) The 13C-NMR spectrum of antibiotic 107891 Factor Al is
shown in Fig.10. 13C NMR spectrum of antibiotic 107891 Factor Al, dissolved in CD3CN:D20 (1:1), exhibits the following groups
of signals (in ppm) at 600 MHz using CD3CN as internal
standard (1.39 ppm), [=ppm; (attribution)]: 13.6 - 23.03
(aliphatic CH3’s), 25.69 - 77.9 (aliphatic CH21s and peptidic
CHa’S), 105 - 137.3 (aromatic and double bonds CH’s and
quaternary carbons), 165.6- 176.6 (peptidic carbonyls).
0) The 13C-NMR spectrum bb decoupled of antibiotic 107891
Factor A2 is shown in Fig.11.
13C-NMR spectrum of antibiotic 107891 Factor A2, dissolved
in CD3CN:D20 (1:1), exhibits the following groups of signals
(in ppm) at 600 MHz using CD3CN as internal standard (1.39
ppm), [ô=ppm; (attribution)]: 13.6 - 22.9 (aliphatic C143’s),
25.65 - 73 (aliphatic CH2’s and peptidic CH’s), 105 - 137.3
(aromatic and double bonds Cl-I’s and quaternary carbons), 165.7-
176.1 (peptidic carbonyls).
UV AND I.R. SPECTRA OF ANTIBIOTIC 107891 FACTOR Al and
FACTOR A2.

A) The infrared spectrum of antibiotic 107891 Factor Al
recorded in KBr with a Bruker FT-IR spectophotometer model IFS 48, exhibits absorption maxima at (cm-1): 3294; 3059; 2926; 1661; 1529; 1433; 1407; 1287; 1114; 1021. Infrared spectrum is

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733
- 29/18

reported in Fig. 12.
B) The U.V. spectrum of antibiotic 107891 Factor Al recorded
in methariol:H20 80:20 (v/v) with a Perkin-Elmer spectrophotometer Lambda 16, exhibits two should rs at 226 and 267 nm. U.V. spectrum is reported in Fig. 13.
C) The infrared spectrum of antibiotic 107 91 Factor A2
recorded in KBr with a Bruker FT-IR spectophotom
48, exhibits absorption maxima at (cm’): 3296
1661; 1529; 1433; 1407; 1288; 1116. Infrarec
reported in Fig. 14.
D) The U.V. spectrum of antibiotic 107891 Fact
in rnethanol:H20 80:20 (v/v) with a spectrophotometer Lambda 16, exhibits two should 267 nm. U.V. spectrum is reported in Fig. 15.
On the basis of the physico chemical data r
the following structure formula can be assigned

107891:

ter model IFS
3060; 2928;
spectrum is

A2 recorded
Perkin-Elmer
s at 226 and

orted above,
o antibiotic

wherein X is H or a halogen (F, Cl, Br, I), Y1, Y2,, Y4, and
Y5 may independently be S, S-0, S=O, 0-S=0, and 0= =0, and wherein R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, and R8 may indepen ently be H,
OH, alkyl (branched or unbranched, substituted or
unsubstituted), or aryl (substituted or unsubstitute).
In an alternative embodiment, R1, R2, R3, and R4 may be H or
OH. Therefore, the possible combinations of R1, R2, 3, and R4
include the following.

WO 2006/08090 PCT/US2005/002733 1.
- 28/18

p.2
H H H H OH H 1-1 H H OK H H H H OH H H H H OH OH OH H H OH H OH H OH H H OH H OH OH H 1-1 H OH OH H OH H OR 011 OH OR H OH OH I-I 01-1 OH H OH 011 H OH OH OH OH OH OH OH

Similarly, R5, R6, R7, and R8 may be H or OH. Therefore, the

possible combinations of R5, R6, R7, and P.8 include the following

R5 R6 R, Re H H H H OH H H 1-I
H OH H H
H H OH H
H - H H OH
OR OH H H
OH H OH H
01-1 H H OR -
H 01-I OH H
H - H OH OR
H OH - H OH
OH OH OH H
OH OH H 01-1
OH H OH OH H OH OH OH OR OH OH OH

Moreover, on the basis of the physico chemical data

reported above, the following structure formula can be assigned to antibiotic 107891 Factor Al, wherein X is Cl; Y1, Y2, y, Y4, and Y5 are 5; P.1 is H; S2 is OH; R3 is H; and R4, 55, R6, R7, and 58 are H, which is a preferred embodiment of the

WO 20061080920 /US2005/002 733 27/1S

invention together with the pharmaceutically
thereof:

eptable salts

Additionally, on the basis of the physicochemical data reported above, the following structure form la can be assigned to antibiotic 107891 Factor A2, wherein is Cl; Y1,
Y2, Y3, Y4, and Y, are S; R1 is OH; R2 is OH; R3 i H; and R4,
R5, R6, R7, and R9 are 1-1, which is a preferred embodiment of the invention together with the pharmaceutically acce table salts thereof:

0 1 0 C"

IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIBIOTIC 1078!1 Antimicrobial activity of the antibiotic 17891 was determined by the broth microdilution method according to the

WO 2006/08092()
-26118

PCT/US20051002733 "
a??

National Committee for Clinical Laboratory Standards
recommendations (NCCLS, document M7 -A5).
The strains used were clinical isolates or strains from American Type Culture Collection (ATCC). The result of the tests are reported in Table VI and Table VII.
Antibiotic 107891 was dissolved in DM50 to obtain a 1000 pg/mi stock solution, and subsequently diluted in water to obtain working solution. The media used were cation-adjusted Mueller Hinton broth (CANJ-IB) for Staphylococci, M. catarrhalis, Enterococci and L. monocytogenes; Todd Hewitt
broth (THB) for Streptococci; GC medium + 1% Isovitalex +1%
haemine for Neisseria spp.; Brain Hearth Infusion +1% C
supplement for H. influenzae; Lactobacillus broth for Lactobacilli; Middlebrook 7119 with Middlebrook OADC enrichment
. for M..srnegmatis; RPMI 1640 Medium for C.albicans. Wilkins
Chaigreri broth + oxyrase(1:25 v/v) for Clostridia; Brucella
broth containing cisteine (0.5 g/L) for Propionibacteria. Inocula for bacteria were 105 CFCl/ml. C.albicans inoculum was
ix104 CFU/ml. All the tests were performed in presence of 0.02%
of bovine serum albumin (BSA). Cultures were incubated at 35°C
in air except Clostridia and Propioniobacteria strains that needed anaerobic atmosphere. After 18-24 hours visual readings were performed and MICs determined. The MIC was defined as the lower concentration of antibiotic at which there is no visible growth.

WO 2006/080920
- 25118

TABLE VI: Antimicrobial activity of

tCTIUS2005/002733

antibiotLc 107891

MIvn$

- tit Sppkaunw Scmith.&TCCI%6 0. 13-
401 AV& I?VISJ L.li’vfl
370 qI4rLrL* dh.L UQrtV%A 2
thn $bi1 UC.k 5. L13

41 Sap*. avow din 4sc Mct-R
37 S4P& it clia. behu VISA Mc 1 2.
4 Svok, ejwtw LA(ciL _____ ks

1729 iip earMU-ft1730 S
2

t4? Sp1. epMdtt A1CCI22Z2 0. L
4

44 Sbpt. ptenw# PcnS 0 13
Pce4 _________

. L 4 t3
Si tecalZv Vin$ 1
50 e.VLfa&Vj& f -A OS
A53i Vas-A I.
i* EfaecMn Vin9 2
EirLftrethan Vta-A
juirn 2
69M345 nLfi?cfrn /JI-A Lnz 4

32
4

li

L

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733 -24118

TABLE VII: Antimicrobial activity of antibiotic 107891 against anaerobes bacteria

Micrc’ipnirn

MIC (ig/ml)

Antibiotic 107891

ATCC V520Prod uplwpMurt
ATCC 2S564 AmpkmibaereiimW pzflui’v

ATCC 14151 apwt#,
P9 propwtbaow4m amgw
13,-19 PrOPOMAdCWi1rAOMAO0,5 ATICt 25746 PmpWbPnw.4um acnes
ATCC 69F ibadrluu rz
ATCC M2PiVPiVAAbMddriMW WMtt
04S nV(dfdbddsHNW 40M

l,W
0,01
4
V23

’.4015
0. L15

-

60039ATCC

401 * CkW&i&M cIij76M
4025 CkrW)jłw d4fcif
4122tJfflc1

43.2 O3Ir*Th.w pgiJtignj
4043 CXi&rm lcimi41D
Clłsittdlin,v beIjes*ic*I4052

4106..P

0L25 -
L25

75

j

0. L25
I2$

Antibiotic 107891 shows a good antibacterial activity

against Gram-positive bacteria.

The MIC range against Staphylococcus spp., including

Methicillin Resistant (MRSA) and Glycopeptides Intermediate

(GISA) resistant strains, is = 0.13-4 pg/mi and against recent

clinical isolates of Eriterococcus spp.., including Vancomycin

Resistant (VRE), is 0.5-4 pg/mi. Against Streptococcus spp.

MICs are 5 0.13 pg/mi.

Antibiotic 107891 is also active against anaerobic Gram-

positive strains; the MICs are:!? 0.13 pg/mi against Clostridia

and <0.004-4 pg/mi against Propionibacteria. Antimicrobial

activities were showed against L.rnonocytagenes (MIC 0.125

pg/mi) and Lactobacilli strains (MICs range <0.13-4 pg/mi).

WO 2906/980920 PCT/US2005/002733
- 23/IS

Some Gram-negative bacteria are susceptible to antibiotic 107891; MICs are 1-0.25 pg/mi versus M. cathar alis, 0.5-0.25 pg/mi against Neisseria spp. and 32 pg/rn against H. influenzae.
Antibiotic 107891 is not active against t e E. coli and
C. albicaris strains tested.
In time-kill experiments antibiotic 07891 shows bactericidal activity against S.aureus GISA and E.faecalIs VanA strain; at 24 hours the bactericidal conceri ration is the MIC value in Mueller Hinton broth.
S.aureus can cause life -threatening infect ons and MRSA
is of particular clinical significance because it is resistant to all penicillins and cephalosporins and also to multiple other antibiotics; in addition it easily spreads from patient
to patient causing outbreaks of infection wi h important
implications for healthcare facilities (W. Wi te, (1999)
"Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects", Journal of ntimicrobial
Chemotherapy 44:1-9). The Centers for Disease C ntrol (CDC)
National Nosocomial Infection Surveillance Sy tern (NMIS)
reported that methicilliri resistance among S. aureus in US hospitals increased from 2.4% in 1975 to 29% in 991, with a higher degree of resistance in intensive care units (L. Archibald, L.E’hilips, D.Monriet, J.E.Jr Mc Gowan, F. Tenover,
R.Gaynes, (1997): "Antimicrobial resistance in is lates from
inpatients and outpatients in the United States: increasing
importance of the intensive care unit", Clinic I fect. Die.
24: 211-5). Nosocomial staphylococcal infections are associated with considerable morbidity and mortality, prolonging the duration of stay and increasing hospitalization costs. The majority of MRSA strains are resistant to several of the most commonly used antimicrobial agents, including macrolides, aminoglycosides, and the r3-lactams antibiotics in
current use, including the latest gener tiori of
cephalosporins.

WO 2096/080920 PCT/US2005/002733
- 22/18

Varicornycin resistant hospital -acquired pathogens responsible for infections (such as endocarditts, meningitis and septicemia) are posing an increasing therapeutic challenge (Y.Cetinkaya, P.Falk and C.G.I4ayhall, (2000): "Vancomycin-resistant enterococci", Clin. Microbiol Rev. 13: 686-707; L.B.Rice, (2001): "emergence of vancomycin-resistant enterococci",. Emerg. Infec. Dis.7:183-7).
S. pneumoniae and M. catarrhalis are recognized important pathogens of humans. They are a common cause of respiratory tract infections, particularly otitis media in
children and lower respiratory tract infections in the eldery.
M. catarrhalis and S. pneumoniae have been recently accepted
as the commonest pathogens of the respiratory tract (M.C.
Enright and H. McKenzy, (1997): "Moraxella (E.ranhamella)
. catarrhalis. Clinical and molecular aspect of a rediscovered pathogen", J. Med. Microbiol. 46:360-71)
Clostridia are responsible of different diseases: gas
gangrene and related wound infections, tetanus, botulism, antibiotic associated diarrhea (CDAD) and pseumembranous
colitis. Most of these microorganisms produce exotoxins that
play an important role in the pathogenesis of the diseases. C.di,fficile is the causative agent responsible for 25% of cases of CDAD and for virtually all cases of pseudomembranous colitis. Over the last years the occurrence of C.difficile coinfection has occurred in patients with vancomycin resistant enteroccoccal infection or colonization (J.G. Bartlett, (1992): "Antibiotic associated diarrhea", Clinic. Infect. Dis. 15: 573-581)

IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIBIOTIC 107891 FACTORS Al AND A2 Table VIII reports the antimicrobial activities of the individual Factors Al and A2 of antibiotic 107891. MICa were determined by microbroth dilution method as above described.

WO 2006/080920 PCT/1JS2005/002733

TABLE VIII: Antimicrobial
Factors Al and A2

- 21/18

activity of antibiotic 107891

Microorganism

MIC (pg/mi)

Factor Al Factor A2
819 Sfaph.aureus Met-S 0.03 003
1524 Staphaureus Met-R 003 0.03
2235 Staph.aureus Met-R 0,06 0,06
3894 Staph.epidermidis Met-R 003 0,06
3881 Staph.epidermidis Met-R 0,06 0.03

602

Staph.haemolyticus Met-
R 0,25 0,25

3919

Strept.pneumoniae Pen-
R 0.O015 <0.005

3915

Streptpneumoniae Pen-
S 00015 00015

4323 Ent, faecalisVanA <003 0.03 1
JI Ent. faecalisVanA I I
4341 Enf.faecalis VanB 0,5 0,5
4397 Ent. faecalis VanB I I
4341 Ent.faacalis VanB 2 2

6349

Entfaecium Van A LNZ-
R 2 2

4 Ent, aecium Van A
3 Entfaecium Van A 0,5 0,5
0561 Ent. faecium Van A 2 2
AS Entfaecium Van A 0,5 0,5
4339 Ent. aecium VanD 0,25 0,25
4174 Ent. gallinarum 1
997 Neissena gonon-haee 0,5 0,25
1613 NeLssena meningitidis 0,25 0,25
1016 Propionibactenum. acnes 0.03 006

IN VIVO BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIBIOTIC 1O7891

Female ICR mice (Harlan Italia SpA - S. ietro al

(7

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733
- 20/18

Natisone, Italy) weighing 23-25 g were used in experiments of acute lethal infection in immnunocompetent or neutropenic mice. Neutropenia was induced by two intraperitoneal administrations of cyclophospharriide, 200 and 100 mg/kg, at four days and one day, respectively, before the mice were infected.
Infection was induced by inoculating intraperitoneally in iinrnunocompetent mice (8 animals/dose/treatment group) a bacterial suspension of either a clinical isolate of methicillin resistant staphylococcus (Staph. aureus SA3817) or
a standard rnethicillin susceptible strain (Staph. aureus Smith ATCC19636), or by inoculating in rieutropenic mice a clinical
isolate of glycopeptide resistant enterococcus (Ent. faecalis
A533). The bacterial challenges (ca 106 cells/mouse) were given suspended in 0.5 rnL of 5% bacteriological mucin (Difco). SUntreated animals died within 24-72 h after infection. Antibiotic treatment began within 10-15 min after challenge. Antibiotic 107891 was administered once intravenously or subcutaneously in different aqueous formulations. The 50% effective dose (ED0) and 95% confidence limits were calculated
by the Spearman--Kärber method (D.J. Finney, (1952): "The Spearman-Karber method", in: Statistical methods in biological assay. pp. 524-530, Charles Griffin & Co., Ltd., London) from the percentage of animals surviving at day 7. Results are reported in the following Table IX.
Antibiotic 107891 is not toxic up to the maximum tested dose of 200 mg/kg.

WO 20061080920 PCT1JS2005/002733
- 19118

Table IX ED50s of antibiotic 107891 in acute le hal infections in mice.
Formulation Strain Route ED50 9 % confidence
mg/kg limits

A MSSA iv 2.1 1.7 2.7
Sc 2.1 1.7 2.7

A VanA iv 3.2 2.7 3.9
Sc 11.1 .2 - 13.5

B MRSA SC 4.2 .5 5.1

C VanA iv 3.7 .8 4.9
Sc 12.7 1.7 15.0

Formulations:

A: 10% (v/v) DM50, 10% (w/v) Beta hydroxy-propyl cyclodextrin (Sigma), 80% (v/v) of 5% (w/v)glucose in H20
B: 10% (v/v) OMSO, 40% (v/v)PEG 400 in 0.1 M aqueous

CH3COOH

C: 50% (v/v) PEG 400 in 1120
Strains:
I. M$SA: Staph. aureus Smith 819 ATCC19636
II. MRSA: Staph. aureus 3817, clinical isolate
III. VanA: Ent. faecalis A533, clinical – olate, in
neutropenic mice

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG.1A (full scan low resolution spectrum) and lB (zoom-scan high resolution spectrum) represent mass spectra of antibiotic 107891 showing a doubly protonated ion at m/z 11 4 and mlz

1116.

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733

- 18/18 (L

FIG.2 represents the I.R. absorption spectrum of antibiotic 107891 dispersed in KBr.
FIG.3 represents the UV spectrum of antibiotic 107891 dissolved in rnethanol:H20.

FIG.4 represents the H-NMR spectrum recorded in the mixture methanol -d4:H20 (pH 4.3 HC1)40:10 (v/v) at 40°C on a Bruker AMX 600 spectrometer applying a water suppression sequence.
FIG. 5 represents the13C-NR spectrum recorded in the mixture methanol-d4:H20 (pH 4.3 HC1)40:10 (v/v) at 40°C on a Bruker AMX 600 spectrometer.
FIG.6A (full scan low resolution spectrum) and 66 (zoom-scan high resolution spectrum) represent mass spectra of antibiotic 107891 Factor Al showing a doubly protonated ions [M+2H12 at m/z 1124.

FIG.71‰ (full scan low resolution spectrum) and 76 (zoom-scan high resolution spectrum) represent mass spectra of antibiotic 107891 Factor A2 showing a doubly protonated ions (M+211)2t at rn/z 1116.
FIG.8 represents the 1H-NMR spectrum of antibiotic 107891 Factor Al recorded in the mixture CD3Ct:020 (1:1) at 298 K on a Bruker AMX 600 spectrometer applying a water suppression sequence.
FIG.9 represents the H-NMR spectrum of antibiotic 107891
Factor A2 recorded in the mixture CD3CN:020 (1:1) at 298 K on a
Bruker AMX 600 spectrometer applying a water suppression sequence.
FIG. 10 represents the13C-NMR spectrum of antibiotic 107891
Factor Al recorded in the mixture CD3CN:D20 (1:1) at 298 K on a
Bruker AMX 600 spectrometer.
FIG. 11 represents the’3C-NMR spectrum of antibiotic 107891
Factor A2 recorded in the mixture CD3CN:020 (1:1) at 298 K on a
Bruker AMX 600 spectrometer.
FIG. 12 represents the I.R. absorption spectrum of antibiotic 107891 Factor Al dispersed in KBr.
FIG. 13 represents the U.V. spectrum of antibiotic 107891

WO 2061080920
- 17/IS

/US2005I0027.33

Factor Al dissolved methanol:H20.

Fig. 14 represents the I.R. absorption spectrum of antibiotic 107891 Factor A2 dispersed in KBr.
Fig, 15 represents the U.V. spectrum of antbiotic 107891 Factor A2 dissolved methanol:H20.

EXAMPLES
Example 1: Fermentation method of Microbi ra sp. ATCC
PTA-5024

Microbispora sp. ATCC PTA-5024 strain was aintained on
oatmeal agar slants for 2-3 weeks at 28°C. he microbial
content of one slant was scraped with 5 ml ster le water and
inoculated into 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml
of seed medium (AF/MS) which is composed of (g 1): dextrose
20, yeast extract 2, soybean meal 8, NaCl 1 and calcium
carbonate 4. Medium was prepared in distilled ater and pH
adjusted to 7.3 prior to sterilization at 121°C for 20 mm. The inoculated flasks were grown at 28°C, on a ro atory shaker
operating at 200 rpm After 4-6 days, 5% of this culture was
inoculated into a second series of flasks containing the same
fermentation medium. After. 72 hours of incubation, 200 ml were
transferred into 4 1 bioreactor containing 3 1 f the same
vegetative medium.
The fermentation was carried out at 30°C, with 700 rpm
stirring and 0.5 vvm aeration. After 72 hours the culture
(1.5 1) was transferred into a 20 1 bioreactor con aining 15 1
of the same vegetative medium. The fermentation as carried
out for 48 hours at 30°C, at 500 rpm stirring and at 0.5 vvm aeration and then was transferred to the production tank.
The production of antibiotic 107891 was performed in a 300 1 fermenter containing 200 1 of the production medium M8
composed of (gil): starch 20, glucose 10, yeast extract 2,
casein hydrolysed 4, meat extract 2 and calcium c rbonate 3.
The medium was prepared in deionized water and the H adjusted
to 72 before sterilization at 121°C for 25 After cooling

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733

the fermenter was inoculated with about 14 1 (7%) of pre-culture. Fermenter was run at 29°C, at 10 rpm stirring and at 0.5 vvm aeration with a head pressure of 0.36 bar. The fermenter was harvested after 98 hours of fermentation.
The production of the antibiotic 107891 was monitored by UPLC as previously described, after extraction of the whole culture broth with the same volume of methanol. The extraction was performed at room temperature under stirring for one hour. Example 2: Alternative Fermentation method of Microbispora sp. ATCC PTA-5024
Nicrobispora sp. ATCC PTA-5024 was inoculated in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of growing medium (Gi) consisting of g/l: glucose 10, maltose 10, soybean oil 10, soybean meal 8, yeast extract 2 and calcium carbonate 4. The medium was prepared in deionised water and sterilized at 120°C x 20 without p1-I adjustment. The inoculated flasks were incubated for 120-168 hours at 28°C, under 200 rpm stirring till a good growth was observed. The flasks were then used to inoculate (3 %) a 4 1 bioreactor containing 3 1 of seed medium AF/HS, which is composed as described in Example 1. After 120 hours of fermentation at 30°C, 700 rpm stirring and 0.5 vvm aeration, 1.5 1 of the culture was transferred to a 20 1 bioreactor containing 15 1 of the same vegetative medium. The fermentation was carried out for 96 hours at 30°C, 600 rpm stirring and 0.5 vvm aeration, and was then transferred to the production tank.
The antibiotic production was obtained in a 300 1 fermenter containing 200 1 of the productive medium (V6) consisting of (gil): dextrose 20, yeast extract 5, meat extract 5, hydrolysed casein 3, peptone 5 and NaCl 1.5. The medium was prepared in deionised water at p1-I adjusted to 7.5 with NaOH, and was sterilized at 121°C for 20
The fermenter was inoculated with 14 1 of seed culture
(7%) and the fermentation was carried out at 29°C, stirred at 180 rpm, aerated with 100 1 of standard air per minute (0.5

WO 2006/080920
- 15/I8

PCT/US2O05/002733

vvm). The antibiotic 107891 production was monitored by HPLC
as previously described. The fermentation was arvested after
about 160 hours.
Example 3 Recovery of antibiotic 107891
The fermentation broth described in the xample 1 was
filtered by tangential filtration system (0.1 pin pore size
membrane, Koch Carbo-Cor, Koch Wilmington, USA) to obtain 170
1 of supernatant and 30 1 of concentrated myceli m. Antibiotic 107891 complex was found both in the filtrate () and in the
mycelium. (5)
(A) The filtered broth was stirred one night at room temperature in the presence of IDialon HP-20 poly tyrenic resin (4 1). The resin was then recovered, washe with 10 1
methanol:water 4:6 (v/v) and eluted batchwise i itially with
10 1 methanol:water 9:1 (v/v) and then with 10 1
methanol:butanol:water: 9:1:1 (v/v). The p oled eluted
fractions containing antibiotic 107891 were co centrated to
small volume on a rotary evaporator and then era freeze-
dried, yielding 32 g of raw material. This raw material was
dissolved in n-butanol (1 1) and then extracted three times
sequentially with 800 ml water. The organic layer was concentrated under reduced pressure to an oily residue, which
was dissolved in methanol. Upon addition of petrol urn ether, 5
g of crude antibiotic preparation was o tamed by
precipitation.
(B) After addition of 25 1 of methanol, the reteri ate portion
containing the mycelium was stirred for 1 ho r and was
filtered to obtain 45 1 of mycelium extract. T is solution
was then diluted with water (20 1) and was stirre one night
at room temperature with Diaiori HP-20 polystyren’c resin (1 1). The resin was then recovered, washed with 2 1 methanol:water 40:60 (v/v) and eluted batch-wise sequentially
with 3 1 methanol:water 85:15 (v/v) and then with 2 1
methanol:water 90:10 (v/v). The eluted fractions were
monitored for the presence of antibiotic 107891 by agar

WO 2006/080920 PCTIUS2005/002733
- 14118

diffusion assay on staphylococcus aureus and by analytical HPLC method as previously reported.
The eluted fractions containing antibiotic 107891 were pooled, were concentrated under reduced pressure and were freeze dryed, yielding 8.1 grams of crude antibiotic 107891. Example 4: Alternative recovery of antibiotic 107891
The harvested broth from the 200 1 tank fermentation described in example 2 was brought to pH 6.8 and the broth was filtered by tangential filtration (0.1 i pore size membrane, Koch Carbo-Cor). The permeate (180 1) was stirred batch -wise overnight at room temperature with 2 1 of Diaion HP20 resin (Mitsubishi Chemical) and the resin was then collected. Methanol (25 1) was added to the retentate portion in the tangential filtration equipment (about 20 1) containing the concentrated mycelium. This suspension was stirred for 1 hour and then was filtered with the microfiltration system to a residual reteritate volume of about 20 1. Additional methanol (25 1) was then added and the above process was repeated sequentially for a total of 5 cycles. The pooled methanol extracts (about 125 1) were diluted with 160 1 of demineralized water and were stirred batch-wise overnight at room temperature with 3 1 of Diaion HP 20 resin. The resin was then collected, and was pooled with the Diaion HP 20 resin used to extract the broth permeate according to the process above described. The pooled resin was washed into a chromatographic column with 20 1 of water:methanol 6:4 (v/v) The antibiotic 107891 was eluted with 23 1 of methanol: 50 mM ammonium formate buffer pH 3.5: n-butanol 9:1:1 (v/v). This eluate was then concentrated under vacuum to a final volume of 3 1. The concentrated solution was then loaded at pH 4..5 on a column of 2.5 1 of polyamide CC 6 0.1-0.3 mm (Macherey-Nagel) conditioned with water:methanol 7:3 (v/v). The column was washed with water:methanol 7:3 (v/v) and then with 25 mm ammonium formate buffer pH 3.5: methanol 7:3 (v/v). The antibiotic was eluted with water:methanol 3:7 (v/v) and then

WO 2006/080920
- 13118

PCT/US200/002733

with 1:9 (v/v) mixture. The elution was cornple ed with 25 mM
ammonium formate buffer pH 2.8: methanol in he ratio 1:9
(v/v). The eluates containing antibiotic 1078 1 were pooled
and concentrated under vacuum to a final volume f 1 1. The pH
of the concentrated solution was brought from 4 to 5.7 with 7
M ammonium hydroxide and then the mixture was eritrifuged to
collect the precipitate. This solid was suspende in water and
freeze-dried, yielding 6.96 g of antibotic 107891 preparation.
Example 5: Purification of antibiotic 107891
Crude antibiotic 107891 (3,6 g), prepared as described in
Example 3, was purified by medium pressure chro atography on
100 g of reverse phase C8 (EC) 40-70 jim partic e size, 60A
pore size, 1ST (International Sorbent Technology, Mid-Glamorgan, UK) by using a Bichi B-680 Medium Pressure
Chromatography System (BCichi labor atoriums-techni AG, Flawil
Switzerland) equipped with B-687 gradient fo iner, 5-684
fraction collector, 5-685 glass column 70 X 460 . The resin
was previously conditioned with a mixture of phas A: phase B
8:2 (v/v) and was then eluted at 25 ml/min with 6 min linear
gradient from 20 % to 60 % of phase B in 60
Phase A was acetonitrile: 20 mM ammonium fo mate buffer

(pH 6.6) 10: 90 (vlv); and phase B was acetonit ile: 20 mM
ammonium formate buffer (pH: 6.6) 90: 10 (v/v).
The fractions containing antibiotic 107891 re pooled,
concentrated under vacuum and lyophilized twice rom water,
yielding 430 mg of purified antibiotic 107891.
Example 6: Purification of antibiotic 07891 by preparative HPLC
Antibiotic 107891 was further purified by reparative HPLC on a Hibar prepacked lichrosorb RP8 (7;m particle size)
column RT 250-25 mm, Merck, by using a 25 minu es linear
gradient elution from 30% to 45% of Phase B, at 30 1/min flow
rate. Phase A was 25 mM ammonium formate buffer pH 4.5
acetonitrile 95:5 (v/v) and Phase 8 was acetonitrile.

WO 2006/1180920 PCT/US20115/002733
- 12/18

A sample of Antibiotic 107891 from example 5 (300 mg) was dissolved in 1,5 ml 350:1 of DMSO:formic acid 95:5 (v/v) and 300 p.i were processed per chromatographic run. Antibiotic 107891 was typically eluted in 15-16 minutes. The eluted fractions of 5 chromatographic runs, containing antibiotic 107891, were pooled and were concentrated under vacuum. The residual solution was lyophilised from water three times sequentially, yielding 31 mg of antibiotic 107891 as a white powder.
Example 7: Separation and Purification of individual
Factors Al and A2 of antibiotic 107891
Factors Al and A2 were separated and purified from the antibiotic 107891 complex of Example 5 by preparative HPLC on a Symmetry Prep C18 (7 pm particle size) column 7..8x300 mm Waters (Mildfold USA) using two different elution programs.
A) Factor Al was purified by a 25 minutes linear gradient elution from 30% to 45% of Phase B, at 3.5 ml flow rate. Phase A was 25 mM ammonium formate buffer pH 4.5 acetonitrile 95:5 (v/v) and Phase B was acetonitrile. Purified antibiotic 107891 complex (15 mg) was dissolved in 350 i1 of DMSO:formic acid 95:5 (v/v) and was processed per chromatographic run. The Al and A2 Factors were typically eluted in a 11-13 minutes time frame. The eluted fractions were then analysed by HPLC under the analytical conditions described above. The fractions of 14 chromatographic runs, containing pure antibiotic 107891 Factor Al, were pooled and were concentrated under vacuum. The residual solution was lyophilized from water three times sequentially, yielding 15 mg of pure Factor Al as a white powder.
B) Factor A2 was purified by isocratic elution at 7 ml flow rate with 100 mM ammonium formate buffer pH 4: acetonitrile 82.5: 17.5 (v/v). Purified antibiotic 107891 complex (5 mg) was dissolved in.250 3.11 of acetic acid: acetonitrile: 100 mM ammonium formate buffer pH 4 50:120:80 (v/v) mixture and was processed per chromatographic run. The Al and A2 Factors

WO 20061080920
40/18

cL1)I
1. A compound of the formula

PCT/US2005/002733

wherein X is selected from the group consisting of H, F,
Cl, Br, and I;
wherein Y1, Y2, Y3, Y4, and Y5 are independently selected
from the group consisting of S, S -O-, S=O, O -SO, and OSO;
and
wherein R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, and R8 are independently selected from the group consisting of H, OH, alkyl, and aryl.

2. The compound of claim 1, wherein X is Cl, Yi, Y2, Y3,
Y4, and Y5 are S, R2 is OH, and R1, R3, R4, R5, R6, R7, and Re are
H.

3. The compound of claim 1, wherein X is Cl, Y1, Y2, Y3,
Y4, and Y5 are 5, R1 is OH, R2 is OH, and R3, R4, R, R6, R1, and

Re are H.

4. The compound of claim 1, wherein R4, R5, R6, R7, and

R8 are H.

5. The compound of claim 4, wherein R1 is H, R2 is H,
and R3 is H.

WO 2006/080920
-9/18

6. The compound of claim 4, wherein R1 is H, R2 is H,
and R3 is OR.

7. The compound of claim 4, wherein R1 s H, R2 is OH,
and R3 is

8. The compound of claim 4, wherein R1 is OH, R2 is OR,
and R3 is OR.

9. The compound of claim 4, wherein R1 i OH, R2 is H,
and R3 is H.

10. The compound of claim 4, wherein R1 is OH, R2 is H,
and R3 is OH.

11. The compound of claim 1, wherein Y1 is elected from
the group consisting of S-0, SO, 0--S=O, and OSO, and Y21
Y3, Y4, and Y5 are S.

12. The compound of claim 1, wherein Y2 is s1ected from
the group consisting of S -O, SO, 0--S=O, and O= =O, and Y,
Y3, Y4, and Y5 are S.

13. The compound of claim 1, wherein Y3 is slected from
the group consisting of S-0, 5=0, O -S=O, and OS=O, and Y1,
Y2, Y4, and V5 are S.

14. The compound of claim 1, wherein Y4 is seected from
the group consisting of S-0, 5=0, 0 -S=O, and O=S 0, and Y1,
Y2, V3, and V5 are S.

15. The compound of claim 1, wherein V5 is selcted from
the group consisting of S-0, 5=0, 0 -S=O, and O=S=, and Y1,
Y2, V3, and V4 are S.

PCT/US2005/002733

WO 20061080920 iS

16.. A compound of the formula

17. A compound of the formula:
a

WO 2006/080929
- 7/18

PCl/US200/002733

18. Antibiotic 107891 complex comprising Eactor Al and Factor A2 being a white powder having the fo1lowing characteristics:

(A) Mass spectrum recorded from a 0.2 mg/ml
solution in methanol:water 80/20 (v/v) with
trifluoracetic acid 0.1% on a Thermofinniga LCQ deca
instrument fitted with an electrospray sour e, using Thermofinnigan calibration mix under the fo lowing electrospray conditions: spray voltage: 4.7 kV; capillary temperature: 220° C; capillary voltage: 3V; infusion mode
10 p.1/mm, showing two double protonated ion at rn/z 1124
and m/z 1116, corresponding to the lowest is tope composition of Factor Al and A2, respectivel;
(8) Infrared spectrum recorded in KBr ith a Bruker
FT-IR spectophotometer model IFS 48, exhibiting absorption maxima at (cm’): 3263; 2929; 1661; 1533; 1402;
1114; 1026;
(C) U.V. spectrum performed in methanol:H20 80:20
(vlv) with aPerkin-Elmer spectrophotometer L mbda 16, exhibiting two shoulders at 226 and 267 nni;
(D) ’FI-NMR spectrum recorded at 600 MHz in the
mixture methanol-d4:H20 (pH 4.3 HC1) 40:10 (v v)at 40°C on
a Bruker AMX 600 spectrometer applying a wate
suppression sequence using as internal standa d the residual signal of methanol-d4 at 3.31 ppm, e hibitirtg
the following signals [8=ppm muliplicity;
(attribution)):0,93 d (CH3), 0.98 d (CH3), 1.0 t (overlapped CH31s), 1.18 t (overlapped CH3’s), 1.26 s
(CH3), 1.30 t (overlapped CH3’s), 1.62-1.74 m (H2), 1.78
d (CH3), 1.80 d (CH3), 2.03 m (CU2), 2.24 m (CH 2.36 rn
(CU2), 2.72-3.8 m (peptidic alpha CH’s), 3.8-5.2 m
(peptidic alpha CH’s), 5.53-6.08 s (CR2), 5.62 (CH
double bond), 6.42 m (CH), 6.92 d (CH double b nd), 7.0-
7.55 m (aromatic CU’s), 7.62-10.4 d and m (aro atic and
peptidic NH’S);

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733 6/18

(E) 13C-NMR spectrum recorded in the mixture
methanol-d4:H20 (pH 4.3 HC1) 40:10 (v/v) at 40°C on a
Bruker AMX 600 spectrometer, using as internal standard
the residual signal of methanol -d4 at 49.15 ppm,
exhibiting the following signals: [ppm; (attribution)]:
13.6-23.2 (aliphatic CH3’s), 26.16-73 (aliphatic Cl-!2’s and
peptidic alpha CH’s), 105-136 (aromatic and double bonds CH’s and quartenary carbons), 164.3-176.3 (peptidic carbonyls);
(F) the acid hydrolysate in 6N HC1, (105°C, 24 h)
showing the presence of the following amino acids, along with other unidentified peaks, after derivatization with 6-aminoquinolyl--N--hydroxysuccinirnidyl carbamate:
lanthionine, methyllanthionine, glycine, proline, valine, . aspartic acid (hydrolysis product of asparagine), phenylalanine and leucine;
G) the acid hydrolysate in 4N methanesulfonic acid
containing 0.2% (w/v) 3-(2-aminoethyl) iridole as catalyst (115°C, 16h) showing the presence of 5-chiorotryptophan; and

H) a basic ionizable function detected by
acid/base titration performed with 001 N potassium
hydroxide in 2-methoxyethanol (MCS):H20 12:3 (v/v)
containing a molar excess of 0.01 N hydrochloric acid.

19) Factor Al of antibiotic 107891 being a white powder having the following characteristics:
A) a doubly protonated ion at mhz 1124
corresponding to the lowest isotope composition in mass spectrum recorded from a 0.1 mg/ml solution in acetonitrile:water 50:50 (v/v) with acetic acid 0.5% on a Thermofinnigan LCQ deca instrument fitted with an electrospray source, using Thermofinnigan calibration mix under the following electrospray conditions: spray voltage: 4.7 kV; capillary temperature: 250° C; capillary

WO 2006/080920 S2005/002733
- 5/18

voltage: 8V; infusion mode 10 pd/min;
B) the exact mass of antibiotic dete mined by
using a Bruker Daltonics APEX Il, 4.7 Tesla spectrometer
fitted with an electrospray source, corresp nding to a
molecular weight of 2246.71–0.06, calculate monoisotopic
mass from [M+2H]2 at m/z 1124.36124 (accuracy 30 ppm);
C) when dissolved in CD3CN:D20 (1:1), ’II NMR
spectrum exhibiting the following groups of ignals (in
ppm) at 600 MHz using CD3CN as internal stan ard (1.94
ppm), [=ppm, multiplicity; (attribution)]: .84 ci
(CH3), 0.89 ci (CH3), 0.94 t (overlapped CH3’s), 1.1
d (Cl-I3), 1.13 d (CH3), 1.15 t (overlapp d CF13’s),
149 m (CH2), 1.69 d (CH3), 1.75 ni (Cl-I2, 2.11 m
(CU), 2.26 m (CU), 2.5 m (Cl-I2), 2.68 - 3.8 m (peptidic
CH’s), 3.8 - 5.0 m (peptidic CH’s), 5.45 6.17 s
(CH2), 5.58 ci (CU double bond), 6.36 m (C), 6.86 d
(CH double bond), 7.0 - 7.45 m aromatic CU’s);
D) when dissolved in CD3CN:D20 (1:1), 13 NMR
spectrum exhibiting the following signals(in ppm) at 600 MHz using CD3CN as internal standard (1.39 ppm),
{&ppm; (attribution)): 13.6 - 23.03 (aliphati CH3’s),
25.69 - 77.9 (aliphatic CH2’s and peptidic CH,,’), 105 -
137.3 (aromatic and double bonds Cl-I’s and quat rriary carbons), 165.6- 176.6 (peptidic carbonyls);
E) Infrared spectrum recorded in KBr wi h a Bruker
FT-IR spectophotometer model IFS 48 exhibiting absorption maxima at (cm’): 3294; 3059; 2926; 1661; 1529; 1433; 1407;
1287; 1114; 1021;
F) U.V. spectrum recorded in methanol:f12 (in ratio
80:20) with a Perkin-Elmer spectrophotometer L rnbda 16 exhibiting two shoulders at 226 and 267 nm;
G) the acid hydrolysate in 6N HCl, (1050, 24 h)
showing the presence of the following amino aci s, along
with other unidentified peaks, after derivatiza ion with
6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidy1 carbamate

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733

- - t/L8 W,
lanthionine, inethyllanthionine, glycine, prolirie, valirie, aspartic acid (hydrolysis product of asparagine), phenylalanine, and leucine; and
H) the acid hydrolysate in 4N methanesulfonic acid
containing 0,2% (w/v) 3-(2-aminoethyl)indole as catalyst (115°C, 16h) showing the presence of 5-chiorotryptophan.

20. Factor A2 of antibiotic 107891 being a white powder
having the following characteristics:
A) a doubly protonated ion at m/z 1116
corresponding to the lowest isotope composition in mass spectrum recorded from a 0.1 mg/ml solution in acetonitrile:water 50:50 (v/v) with acetic acid 0.5% on a Thermofinnigari LCQ deca instrument fitted with an
electrospray source, using Thermofinnigan calibration mix
under the following electrospray conditions: spray voltage: 4.7 kV; capillary temperature: 250° C; capillary
voltage: 8V; infusion mode 10 il/min;
B) the exact mass determined by using a Bruker
Daltonics APEX II, 4.7 Tesla spectrometer fitted with an electrospray source, corresponding to a molecular weight of 2230.71–0.06, calculated monoisotopic mass from {M-i-2H]24 at m/z 1116.36260 (accuracy 30 ppm);
C) when dissolved in CD3CN:D20 (1:1), ’H NMR
spectrum exhibiting the following signals (in ppm) at 600 MHz using CO3CN as internal standard (1.94 ppm),
(&ppm, multiplicity; (attribution)): 0.84 d (CH3),
0.88 d (CH3), 0.94 d (CR3), 1.06 d (CR3), 1.14 d (CR3), 148 m (CR2), 1.65-1.75 m (CR2), 1.67 ci (CR3),
2.15 m (CH), 2.25 m (CH), 2.5 m (CR2), 2.77 - 3.8 in
(peptidic CH’s), 3.8 - 4.9 in (peptidic CRa’S), 5.45 -
6.14 s (CR2), 5.59 d (CH double bond), 6.34 in (CR),
6.84 d (CH double bond), 7.0 - 7.42 in (aromatic CH’s);
D) when dissolved in CD3CN:020 (1:1), ’C NMR

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733
- 3/18

spectrum, exhibiting the following signals
600 MHz using CD3CN as internal standard (1

(in ppm) at
ppm),
[&ppm; (attribution)]: 13.6 - 22.9 (aliphatic CH31s),
25.65 - 73 (aliphatic CH21s and peptidic CH s), 105
137.3 (aromatic and double bonds CH’s and quaternary
carbons), 165.7- 176.1 (peptidic carbonyls);
E) Infrared spectrum recorded in [(Br ith a Bruker
FT-IR spectophotometer model IFS 48, exhibit ng absorption
maxima at (cm-1): 3296; 3060; 2928; 1661; 152; 1433; 1407;
1288; 1116;
F) U.V. spectrum recorded in methanol H20 (in ratio
80:20) with a Perkin-Elmer spectrophotometer Lambda 16 exhibiting two shoulders at 226 and 267 nm;
G) the acid hydrolysate in 6N HC1, (1 5°C, 24 h)
showing the presence of the following amino cids, along
with other unidentified peaks, after deriva ization with
6-arninoquinolyl-N--hydroxysuccinimidy1 carbamate: lanthionine, methyllanthionine, glycine, proine, valine, aspartic acid (hydrolysis product of asparagi e), phenylalanine and leucine; and
H) the acid hydrolysate in 4N methariesu fonic acid
containing 0,2% (w/v) 3-(2-amInoethyl)indole a catalyst
(115°C, 16h) showing the presence 5-chiorotryp ophari.

21. A process for producing antibiotic 107891\ and its Factors Al and A2 and the salts thereof with acids omprising the steps of:
cultivating Microbispora sp. ATCC PTA-502 or a
variant or mutant thereof maintaining the ability to
produce said antibiotic, under aerobic conditi ns, in an
aqueous nutrient medium containing an assimila le source
of carbon, nitrogen and inorganic salts;
isolating the resulting antibiotic from th mycelium
and/or the filtered fermentation broth; and
purifying the isolated antibiotic 107891.

WO 2006/080920 PCT/US2005/002733
- 2/18

22. The process according to claim 21, wherein the
strain Microbispora sp. ATCC PTA-5024 or the antibiotic 107891 producing a variant or mutant thereof are pre -cultured.

23. The process according to claim 21, wherein the
isolation of the antibiotic 107891 is carried out by filtering the fermentation broth and the antibiotic is recovered from the filtered fermentation broth according to a technique selected from the group consisting of extraction with a water - immiscible solvent, precipitation by adding a non-solvent or by changing the pH of the solution, absorption chromatography, partition chromatography, reverse phase partition
chromatography, ion exchange chromatography, molecular
exclusion chromatography, and a combination of two or more of said techniques.

24. The process according to claim 21, wherein the
isolation of the antibiotic 107891 is carried out by separating the mycelium from the supernatant of the fermentation broth and the mycelium is extracted with a water - miscible solvent whereby, after the removal of the spent
mycelium, a water -miscible solution containing the crude
antibiotic is obtained, which can be processed either separately or in pool with the filtered fermentation broth to recover the antibiotic 107891 by means of a technique selected from the group consisting of extraction with a solvent, precipitation by adding a non-solvent or by changing the pH of the solution, absorption chromatography, partition
chromatography, reverse phase partition chromatography, ion
exchange chromatography and molecular exclusion
chromatography, and a combination of two or more of said
techniques.

25. The process according to claim 24, wherein the
concentration of the water-miscible solvent in the mycelium extract is reduced before it is processed to recover the

WO 2006/080929

antibiotic therefrom.

26. The process according to claim 23, whE
filtered fermentation broth is contacted with ar resin, and said resin is eluted with a polar, w solvent or a mixture thereof with water, whereb containing the crude antibiotic 107981 is obtai

PCT/US2905/002733

rein the
absorption
ter -miscible
a solution
d.

27. The process according to claim 26, whe ein the
absorption resin is selected from the group cons sting of a polystyrene, a mixed polystyrene-divinylbenzene, and a polyamide resin,

28. The process according to claim 24, whe the
mycelium is ex.racted with a C1 -C3 alkariol, and tie mycelium
extract is contacted with an absorption resin, an eluted
therefrom with a polar water-miscible solvent or mixture
thereof with water, whereby a solution containing the crude antibiotic 107891 is obtained.

29. The process according to claim 23, wher in the
solutions containing the crude antibiotic 107891 re pooled and processed for further purification of said an ibiotic 107891.

30. The process according to claim 26, wherein the
solution containing the crude antibiotic 107981 is
concentrated and then freeze-dried to yield a crud antibiotic
107891 solid product.

31. The process according to claim 26, wherein the
absorption resins containing the absorbed antibiot c are pooled and their mixture is eluted with a polar, w ter - miscible solvent or a mixture thereof with water.

32. The process according to claim 21, wherei
antibiotic 107981 is purified by means of a chromat
procedure, preferably by preparative HPLC or medium

the
)graphic
pressure

WO 20061080929 PCT/US2905/002 733 0/18

chromatography.

33. The. process according to claim 21, wherein Factor Al
and Factor A2 are separated by preparative HPLC from the purified antibiotic 107891.

34. A pharmaceutical composition comprising an
antibiotic selected from antibiotic 107891, antibiotic 107891 Factor Al, antibiotic 107891 Factor A2, and a mixture of said Factors in any proportion or a pharmaceutically acceptable salt thereof with an acid.

35 The pharmaceutical composition according to claim
28, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

36. The antibiotic 107891, its Factor Al, its Factor A2,
or a mixture of said Factors in any proportion or a pharmaceutically acceptable salt thereof with an acid for use as a medicament.

37. Use of antibiotic 107891, its Factor Al, its Factor
A2, or a mixture of said Factors in any proportion or a pharmaceutically acceptable salt thereof with an acid for the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of bacterial infections.

38. Use of the antibiotic 107891, its Factor Al, its
Factor A2 or a mixture of said Factors in any proportion and a non-toxic salt thereof with an acid as animal growth promoter.

39. A biologically pure culture of the strain
Microbispora.sp. ATCC PTA-5024, or a variant or mutant thereof maintaining the ability to produce antibiotic 107891 when cultivated under submerged aerobic conditions in the presence of assimilable sources of carbon, nitrogen and inorganic salts.

PCT/US2005/002733

WO 2006/08092 6118

E

El

.0

0
I,

0
co

0
r4

0
w

(-I

0
co
f-I

Y9 91.4
ooei OOQL 00$1 gOi-OOOtTOOi act

vgnvt*oogt wow rifit --"Cl W-109 -o

ti

21

vff

h

C)

- oe

Zn

to

Abundance MA

81/6
OZ6080/900Z OM

A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT International pplicauon No.

L PCT/US05/0 733
A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(1) CO7K 1/14, 14/195;C12P 1/04; A61K38/16
US CL. 5301300,317,324,326; 514/2,9.13
According
FIELDS

to International

SEARCHED

Pateflt Classification (LPC) or to both national classification and I

P C B .

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S.:5301300,317,324,326; 514/2,9,13

Documentation searched other than documentation to the extent that such documents
include’

in the fields searched

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, S Lrch terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONS1DRED TO BE RELEVANT

Category Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant Relevant to claim No.

A US 6,551,591 B (LEE) 22 April 2003 (22.04.2003), throughout. 1-36

A EP 0-592-835 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.) 20 April 1994 (20,04.93), throughout 1-36

[] Further documents are listed in the continuation of Box C. [Ii] See patent family annex.

Special categories ofcited dcumenta: later published ufler the malional Orpnority
date and not with the stico understand the
document defining the general state considered to be principle theory underlying the
particular relcviince
docwneet orpasictdar relevance; the claimed invention cannot
tacker application patent or after the tiling dale considentd novel or cannot caitaid involve an inventive step
when the docwncnt taken
throw doubt, priority or which Cited to
establish date citation other special reason olparticialur relevance; the ctaimtd invention
specified) considered to involve an when the document combined
with one other such combinatica,
document refemng an oral disclosure, use. exhibition or other to skilled the

docwnent published to the international date but later then the docotnent nanrØn, the patent
priority claimed

Date the actual completion ofthe international search Date the international sea h report

mailing

Alexandria, Telephone
Facsimile 305-3230

Form PCT/ISAJ2 10 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatinal application No.

PCrfuS 5/02733

Box No. 11 Observations where certain claims were found unsearchable (Continuati ii of Item 2 of first sheet) This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2 (a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 37-39
because they relate to subject mailer not required to be searched by this Authority, namel
Please See Continuation Sheet

2. FIClaims Nos.:

because they relate to parts ofthe international application that do not comply with the an extent that no meaningilil international search can be carried out, specifically:

3 [II] Claims Nos.:

because they are dependent claims and arc not drafted in accordance with the second and

requirements to such

sentences of Rule 6.4(a).

Box No. Lii Observations where unity of Invention is lacking (Continuation of Item 3 Of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as

i. [J As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international

searchable claims.

2. [J As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this

payment of any additional fee.
3. As only some ofthe required additional search fees were timely paid by the applicant, this covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. D No required additional search fees were timely paid by the applicant- Consequently, this il
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on ProtestEl The additional search fees were accompanied by the applicant’s protest.

11 No protest accompanied the payment of additional search fee&

report covers all

did not invite

search report

search report is

ANTIBIOTICO 107891, SUS FACTORESA1 YA2, SALES Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAMENTE ACEPTABLES, Y USO DE LOS MISMOS.

5 Esta solicitud es una presentaciôn internacional basada en la solicitud de
EE.UU. con n° de serie [expediente n° 892.280-500], presentada el 26 de enero
de 2005, la cual es una continuaciOn en parte de la solicitud de EE.UU. con n°
de serie 11/035.296, presentada el 12 de enero de 2005, Ia cual es una continuación en parte de la solicitud de EE.UU. con n° de serie 10/521.336,
10 presentada el 11 de enero de 2005, la cual es una presentaciOn nacional 371 del PCT/EP2004/007658, presentada el 12 de Julio de 2004, la cual reivindica prioridad respecto a la solicitud de patente europea n° 03016306,7, presentada
el 18 dejulio de 2003, el total de las cuales se incorpora expresamente por este medio como referencia en su totalidad.
15 La presente invenciôn se refiere a una sustancia antibiOtica de origen
microbiano, denominada arbitrariamente antibiOtico 107891, el cual es un complejo que comprende los Factores Al y A2, las sales farmacØuticamente aceptables de los mismos, composiciones farmacØuticas de los mismos y su
uso como agente antibacteriano.
20 Otro objeto de la presente invenciOn es un procedimiento para preparar
el antibiótico 107891, el cual incluye cultivar Microbispora sp. 107891 (de aqul
en adelante identificada como Microbispora sp. ATCC PTA-5024) o una de sus variantes o mutantes manteniendo la capacidad para producir dicho antibiOtico, recuperar el antibiótico de la invenciOn a partir del micelio y/o a partir del caldo
25 de fermentación, aislar la sustancia pura por medios cromatogrÆficosy separar

los Factores Al y A2.
El antibiOtico 107891 es un agente antimicrobiano novedoso con una estructura peptIdica que contiene como constituyentes lantionina y metiHantionina. Estas son las caracterIsticas tipicas de los lantibiOticos y, en
S particular, del subgrupo que actUa principalmente sobre la biosintesis de la
pared celular.
Los lantibióticos son pØptidos que contienen el aminoÆcido con funciôn
tioØter lantionina asi como otros diversos aminoÆcidosmodificados (H. G. SahI
y G. Bierbaum, (1998) "Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of
10 uniquely modified peptides from gram-positive bacteria", Ann. Rev. Microbiol.
. 52: 41-79). La mayor parte de los lantibiOticos conocidos tienen actividad
antibacteriana, aunque se ha visto que algunos son activos sobre diferentes
dianas farmacolOgicas. Los Iantibióticos antibacterianos pueden dividirse
ampliamente en dos grupos en base a su estructura: los lantibiOticos de tipo A
15 son tipicamente pØptidos anfifIlicos alargados, mientras que los lantibiôticos de
tipo B son compactos y globulares (0. McAuliffe, R. P. Ross y C. Hill (2001):
"Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action",. FEMS Microb. Rev.
25: 285-308). La nisina es el tIpico lantibiOtico representativo de tipo A, mientras que la actagardina (gardimicina) y la mersacidina pertenecen a la
20 subclase de lantibióticos de tipo B. Los Iantibiôticos de tipo nisina y de tipo
mersacidina interaccionan con el lipido II como precursor de peptidoglicano unido a membrana, aunque las dos clases difieren en los efectos que producen en el proceso de proliferación bacteriana. Los lantibiOticos de tipo nisina matan bacterias principalmente por permeabilizaciOn de la membrana
25 citoplasmàtica (H. Brotz, M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Gotz, G.

3

Bierbaum y H. G. SahI, (1998): "Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics", Mol. Microbiol. 30: 317-27), mientras que los lantibiOticos de tipo mersacidina matan las cØlulas bacterianas principalmente inhibiendo la biosintesis de la pared celular
5 (H. Brotz, G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds y H. G. SahI, (1998): "The
lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II",
Antimicrob. Agents Chemother. 42: 154-60).
Dos antibiOticos producidos por la cepa de Microbispora Coral/ma
NRRLL 30420, identificados como antibióticos MF-BA1768a1 y MF-BA-176831
10 respectivamente, se describen en el documento US 6.551.591 Bi. Los datos
. fisico-quImicos recogidos en la patente identificada anteriormente (por ejemplo
datos de espectroscopla de masas, peso molecular, contenido de aminoÆcidos)
y la comparaciOn de los tiempos de retención en los anÆlisis experimentales
por CL-EM muestran claramente que el complejo del antibiOtico 107891 asI
15 como sus componentes Factor Al y Factor A2 son entidades quimicas distintas
de los antibiOticos MF-BA-1 768a, y ME-BA-1 7683.
El documento EP 0592835A2 describe los antibióticos antitumorales BU-
4803TA1, A2, B, C,, C2 y D. Los antibióticos BU-4803TA1, A2 y B se recuperan a partir del caldo de fermentación de Microbispora 55327 ATCC (AA 9966),
20 mientras que los antibióticos BU-4803TC1, C2 y D son productos de
transformaciOn de los antibiOticos BU-4803TA,, A2 y B respectivamente, cuando estos productos se almacenan en sulfôxido de dimetilo. Los datos fisico-quimicos recogidos en el documento EP 0592 835 A para los antibiOticos anteriores (por ejemplo aspecto, absorción U.V., peso molecular, actividad
25 antitumoral) muestran claramente que son sustancias quimicas distintas del

5;)

4

complejo del antibiótico 107891 y de sus Factores Al y A2.

CEPA Y FERMENTACION

Se aislO Microbispora sp. 107891 en el ambiente y se depositó el 27 de
5 febrero de 2003 con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, American
Type Culture Collection), 10801 University Blvd., Manassas VA, 201102209
EE.UU., al amparo del Tratado de Budapest. Se acordO como nUmero de
adquisicion de la cepa el PTA-5024.
La producciôn de antibiOtico 107891 se logrO cultivando una cepa de
10 Microbispora sp. capaz de producirlo, es decir, Microbispora sp. ATCC PTA
. 5024 o una de sus variantes a mutantes que mantenga la capacidad para
producir dicho antibiOtico; aislando el antibiÆtico resultante apartir del caldo de
cultivo completo y/o a partir del micelio separado yio a partir del caldo de
fermentaciOn filtrado; y purificando el antibiôtico aislado por medios
15 cromatogrÆficos. En cualquier caso, se prefiere producir antibiôtico 107891 en
condiciones aerôbicas en un medio acuoso rico en nutrientes que contenga
fuentes fÆcilmente asimilables de carbono, nitrôgeno y sales inorgÆnicas. Pueden usarse muchos de los medios nutrientes empleados normalmente en el campo de Pa fermentación, sin embargo Se prefieren ciertos medios.
20 Son fuentes de carbono preferidas la sacarosa, fructosa, glucosa, xilosa y similares. Son fuentes de nitrógeno preferidas harina de semilla de soja, peptona, extracto de came, extracto de levadura, triptona, aminoÆcidos, caselna hidrolizada y similares. Entre las sales inorgÆnicas que pueden incorporarse en los medios de cultivo se encuentran las sales solubles
25 habituales capaces de proporcionar sodio, potaslo, hierro, cinc, cobalto,

5

magnesio, caiclo, amonlo, cloruro, carbonato, sulfato, fosfato, nitrate e jones simHares.
Preferiblemente, la cepa que produce antibiOtico 107891 se cuitiva previamente en un tubo de fermentaciôn o en un matraz de agitaciOn,
5 usÆndose despuØs el cultivo para inocular recipientes fermentadores para la
producciOn de cantidades sustanciales de sustancias. El medio usado para el
cultivo previo puede ser el mismo que aquel empleado para fermentaciones
rnÆs voluminosas, pero se pueden usar tambiØn otros medios. Puede crecerse
la cepa que produce antibiótico 107891 a temperatura entre 17°C y 37°C,
10 estando las temperaturas óptimas alrededor de 28-30°C.
. Durante la fermentaciOn, puede seguirse la producciôn de antibiOtico 107891 mediante ensayo biolOgico sobre microorganismos susceptibles y/o per
anÆlisis por HPLC. La producciOn maxima de antibiOtico 107891 se da generalmente despuØs de aproximadamente 90 horas y antes de las 200 horas
15 de fermentación.
El antibiOtico 107891 se produce cultivando Microbispora sp. ATCC PTA
5024 o una de sus variantes o mutantes capaz de producir antibiOtico 107891,
y se encuentra en los caldos de cultivo y/o en el micelio.
En esta descripciOn y reivindicaciones, el tØrmino "antibiOtico 107891", a
20 menos que se especifique de otra forma, identifica el complejo de antibiótico
107891 que comprende los Factores Al yA2.

CARACTERSTlCAS MORFOLOGICAS DE Microbispora sp. ATCC PTA-5024 Microbispora sp. ATCC PTA-5024 crece bien en varies medics sôlidos
25 convencionales. Se midieron las dimensiones microscópicas usando el cultivo

crecido sobre sales de elementos traza - Æcido hümico en agar (composiciOn en gil: âcido hümico 0,5, FeSO4*7H20 0,001, MnCI24H2O 0,001, ZnSO4*7H20 0,001, NiSO4*6H20 0,001, MOPS 2, agar 20) aæadido con I mi/I de soluciôn rica en vitaminas (25 mg/I de clorhidrato de tiamina, 250 mg/I de pantotenato de
5 caIcio, 250 mg/I de Æcidonicotinico, 0,5 mg/I de biotina, 1,25 g/l de riboflavina,
6,25 mg/I de cianocobalamina, 25 mg/I de Æcidoparaminobenzoico, 500 mg/I de
Æcidofólico, 500 mg/I de clorhidrato de piridoxal).
En cultivo liquido (medio V6, composición en gil: dextrosa 22, extracto
de came 5, extracto de levadura 5, caseina 3, NaCl 1,5) no se observa
10 fragmentaciOn del micelio despuØs de 6 dias de crecimiento a 28°C. El examen
. microscópico sobre sales de elementos traza - ÆcidohOmico en agar (despuØs
de 21 dias de incubación a 28°C) revela un micelio sustrato ramificado no fragmentado y un micelio aØreo monopodialmente ramificado; tambiØn quedan
visibles muchas hifas aØreas largas, rectas y a penas ramificadas. Los pares de
15 esporas longitudinales caracterIsticos estân sostenidos por esporoforos cortos
que surgen lateralmente a partir de ramas o directamente a partir de las
principales hifas aØreas. Las esporas son globosas y no móviles. No se observan cuerpos del tipo esporangio u otras estructuras particulares.

20 CARACTERISTICAS DEL CULTIVO DE Microbispora sp. ATCC PTA-5024 Se cultivó Microbispora sp. ATCC PTA-5024 durante 6 dias en un medio
liquido de AF/MS (VØase Ejemplo 1) a 28°C y 200 rpm, despuØs se transfirió (inóculo del 5%) a un nuevo medio liquido de AF/MS y se dejô envejecer durante 6 dias adicionales y finalmente se inoculó (inOculo del 7%) en 100 ml
25 de medio liquido V6 (VØase Ejemplo 1). DespuØs de 6 dias de crecimiento a

7

28°C y 200 rpm, el micelio se recuperO por centrifugación y se Iavó tres veces con soluciOn sauna estØril, diluyOndose despuØs Para proporcionar un inOculo adecuado. Se hendieron ailcuotas de la suspension en forma de raspaduras en forma de cruz sobre varios medios recomendados por Shining y Gottlieb (E. B.
5 Shining y D. Gottlieb, (1996): "Method for Characterization of Streptomyces
species", mt. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340), y medios recomendados por S. A.
Waksman (1961): "The Actinomycetes", The Williams and Wilkins Co.,
Baltimore, Vol. 2: 328-334.
La capacidad Para usar una senie de hidratos de carbono como fuente
10 de carbono y energia se determinO usando el medio ISP4 sin almidOn, aæadido
. con lml/I de la soluciÆn rica en vitaminas descrita anteriormente como medio
base; cada fuente de carbono se aæadiO a la concentraciôn final de un 1% (peso/volumen).
Se determinaron la tolerancia a cloruro sódico, intervalo de pH de
5 crecimiento asI como la capacidad Para crecer a diferentes temperaturas sobre
un medio ISP2. Todos los medios se incubaron a 28°C durante ties semanas;
las descripciones se refieren a 21 dias a menos que Se especifique de otra forma. El color se determinó a la luz natural del dia usando el atlas de color de Maerz y Paul (A. Maerz y M. R. Paul, 1950 - A Dictionary of Colour, 2 edición.
20 McGraw Hill Book Co.lnc,, New York). La capacidad Para reducir nitratos a
nitritos se evaluô en un medio de nitrato casi liquido segün el procedimiento descrito por Williams y cols. (S. T. Williams, M. Goodfellow, G. Alderson, E. M.
H. Wellington, P. H. A. Sneath & M. J. Sackin, 1983 - Numerical classification of Streptomyces and related genera - J. Gen. Microbiol. 129, 1743-1813).
25 En la Tabla I se recogen el crecimiento, apariencia de la colonia, color

(7!

del micelio sustrato y aØreo y producciôn de pigmentos para la cepa Microbispora sp. ATCC PTA-5024. El crecimiento vegetativo estÆ presente en
la mayoria de los medios usados, a diferencia del micelio aOreo que estÆ presente solamente en algunos de ellos. No se muestra pigmentaciôn evidente
5 en ninguno de los medios usados. Las caracteristicas fisiológicas de la cepa se presentan en la labia II. El crecimiento y la producciOn de micelio aØreo estÆn presentes a 17°C pero no a 43°C. La producción de micelio aØreo en ISP2 estÆ presente a un pH superior a 6, mientras que est5 ausente en presencia de NaCl al 1%.
10 La capacidad para usar varios hidratos de carbono para el crecimiento se muestra en la Tabla III.

labia I: caracteristicas de crecimiento de Microbispora sp. ATCC PTA-5024.
MEDIO CRECIMIENTO Y MORFOLOGIA CODIGO DE
COLOR INVERSO

ISP2 Crecimiento abundante, superficie 5 E 12
Extracto de arrugada; producciOn abundante de anaranjado/rojo
levadura micelio aØreo rosado (2A8).
extracto de malta Escasa prod ucción de pigmento
en agar soluble anaranjado/marrOn claro.
ISP3 Crecimiento abundante; prod ucciOn 11 H 10
Harina de avena abundante de micelio aØreo rosado anaranjado/rosa
en agar (2A8), particularmente en los brazos
de las hendiduras en cruz.
Escasa producciôn de pigmento

[-I

soluble anaranjado.
ISP4 Buen crimiento; sin prod Lción de 11 1-9 -____________
Sales micelio aØreo. naranja
inorgÆnicas sin prod ucciOn de pigmentos
almidOn en agar solubles.
El almidOn se hidroliza.
Glu/Asp CreciiTento discreto, fino; 12 K 12
Glucosa- producción de micelio aØreo fino anaranjado/marrªn
asparagina en beige/rosado (9134) en los brazos de claro
agar las hendiduras en cruz.
Sin producciOn de pigmentos
solubles.
ISP6 Escaso crecimiento, con colonias no definido
Pepetona rosadas individuales crecidas con
extracto de enrollamiento hacia arriba, con una
levadura hierro superficie lisa; sin producción de
en agar micelio aØreo.
Sin oscurecimiento del medio.
ISP7 Crecimiento escaso de un micelio no definido
Tirosina en agar sustrato anaranjado/marrOn claro
fino; sin producciôn de micelio aØreo.
Sin oscurecimiento del medlo.

TSP3 EL Crecimiento abunciante, superfici 4 B 12
Harina de avena arrugada; producciOn muy escasa de anaranjado/rojo
extracto de micelio aØreo rosado fino.

I ’)

10

levadura al 1% Sin produccion de pigmentos
en agar solubles.

(ISP4 Y Glucosa-Asparagina en agar anadidos con I mi/l de solución
con vitaminas).
Tabla II: caracterIsticas fisiologicas de Microbispora sp. ATCC PTA-5024.
ENSAYO REACCION
Hidrôiisis de almidOn Positiva
Hid rôlisis de caseina Negativa
Digestion de malato de calcio Negativa
PeptonizaciOn de leche de tornasol Negativa
CoagulaciOn de leche de tornasol Negativa
Licuefacción de gelatina Negativa a ligeramente positiva
Reacción de tirosina Negativa
ReducciOn de nitrato Positiva
Intervalo de pH de crecimiento (14 Sin crecimiento a 4,2, bueno a 5,5 a
dIas) 8,8; no sometido a ensayo fuera de
este intervalo.
Ausencia de micelio aØreo a pH:5 6,5.
de tolerancia a NaCI 2; ausencia de micelio aØreo a 2! 1.
Intervalo de temperatura de 17°Ca 37°C. Presencia de micelio
crecimiento aØreo en todo el intervalo; sin
crecimiento a 43°C.
5

Tabla III: utflización de fuentes de carbono por Microbispora sp. ATCC PTA-5024.

Fuente de carbono Crecimiento (14 dias)
Arabinosa ++
Celulosa
Fructosa ++
Insitol +1-
Manitol +++
Rafinosa
Ramnosa
Sacarosa
Xilosa
Glucosa ++
Glicerol ++
Sin azücar

+.+ abundante; ++ buen crecimiento; + crecimiento moderado; +1- crecimiento
5 escaso; sin crecimiento; micelio aØreo siempre ausente.

O

CARACTERISTICAS QUIMIOTAXONOMICAS DE Microbispora sp. ATCC PTA-5024,
Se dejó crecer Microbispora sp. ATCC PTA-5024 en un medio GLM (4g11
10 de glucosa; 4 gIl de extracto de levadura; 10 gIl de extracto de malta) a 28°C en un agitador rotatorio y el micelio se recuperó, se lavO dos veces con agua destilada estØril y posteriormente se secó por congelaciôn. Los anÆlisis de

12

aminoÆcidosse Ilevaron a cabo segUn el procedimiento de Staneck y Roberts
(J. L. Staneck y G. D. Roberts, (1974): "Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography", Appi. Microbiol. 28: 226-231). Se extrajeron menaquinonas y Ilpidos polares siguiendo el procedimiento
5 de Minnikin y cols. (D. E. Minnikin, A. G. O’Donnell, M. Goodfellow, G.
Alderson, M. Athalye, A. Schaal y J. H. Parlett, (1984): "An integrated procedure
of isoprenoid quinones and polar lipids", J. Microbiol. Meth.2: 233-241). Los Ilpidos polares se analizaron por cromatografIa en capa fina (D. E. Minnikin, V. Patel, L. Alshamaony y M. Goodfellow, (1977): "Polar lipid composition in the
10 classification of Nocardia and related bacteria", mt. J. Syst. Bacteriol. 27: 104-

01

117), las menaquinonas por HPLC (R. M. Kroppenstedt, (1982): "Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase RP18 and a silver loaded ion exchanger as stationary phase", J. Liquid. Chromat, 5:2359-2367; R.
M. Kroppenstedt, (1985): "Fatty acid and menaquinone analysis of
15 actinomycetes and related organisms", en: Chemical Methods in Bacterial
Systematics, No20 SAB Technical Series pp. 173-199, ediciones M. Goodfellow
y D.E. Minnikin, Academia Press, Londres) y los Østeres metilicos de Æcidos grasos por cromatografia gas-liquido respectivamente (L. T. Miller, (1982): "A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including
20 hydroxy acids", J. Clin. Microbiol. 16: 584-586; M. Sasser, (1990): "Identification
of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids", USFCC News Letters
20: 1-6). Se comprobO la presencia do Æcidos micólicos mediante el procedimiento de Minnikin y cols. (D. E. Minnikin, L. Alshamaony y M. Goodfellow, (1975): "Differentiation of Mycobacterium Nocardia and related taxa
25 by thin layer chromatography analysis of whole organism methanolyzates", J.

13

Gen. Microbiol. 88: 200-204).

,Y7

Los hidrolizados de cØlulas completas de la cepa Microbispora sp. ATCC
PTA-5024 contienen Æcido mesodiaminopimØlico como el diaminoÆcido del peptidoglicano. Las menaquinonas predominantes son MK-9 (Ill, Vlll-1-14), MK-9
5 (1-12) y MK-9 (H0). El modelo de Ilpido polar Se caracteriza por la presencia de
fosfatidiletanolamina, metilfosfatid iletanolam ma, fosfatid il-glicerol, d ifosfatidil-
glicerol, fosfatidilinositol, fosfatidil-inositolmanOsidos y N-acetilglucosamina que contiene fosfolipido, es decir, fosfoilpido de tipo IV segün Lechevalier y cols. (H.
A. Lechevalier, C. de l3riŁve y M. P. Lechevalier, (1977): "Chemotaxonomy of
IC) aerobic actinomycetes: phospholipid composition", Biochem. Syst. Ecol. 5: 246-
260). La mayor parte de los componentes del modelo de Æcido graso son anteiso 15:0, iso 16:0, n-16:0, anteiso 17:0 y 10metil-heptadecanoico (10-Me-17:0), es decir 3c serisu Kroppenstedt, (R. M. Kroppenstedt, (1985): "Fatty acid
and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms", en:
15 Chemical Methods in Bacterial Systematics, No20 SAB Technical Series pp.
173-199, ediciones M. Goodfellow y D.E. Minnikin, Academic Press, Londres).
No se detectan Æcidosmicôlicos.

SECUENCIACION deADNr 16S de MICROBISPORA sp. ATCC PTA-5024
20 La secuencia parcial del gen ARNr 16 (ADNr 165), es decir, 1443 nucleOtidos, correspondiente a un 95% del ARN completo de la cepa Microbispora sp. ATCC PTA-5024, so alcanzO siguiendo los procedimientos publicados (P. Mazza, P. Monciardini, L. Cavaletti, M. Sosio y S. Donadio, (2003): "Diversity of Actinoplanes and related genera isolated from an Italian
25 soil", Microbial. Ecol. 5: 362-372). Se recoge en el n° de identificaciôn de

14

secuencia 1.

Esta secuencia se comparó con aquellas de la cepa Microbispora
Coral/ma NRRLL 30420 (MF-BA-1 768), tal y como Se recoge en el documento US 6.551.591 Bi. Las dos secuencias se alinearon y se encontraron
5 diferencias en 31 de las 1456 posiciones alineadas, justificando una
divergencia general entre secuencias de un 2,13%. Cualesquier dos cepas que compartan menos de un 97,5% de identidad de secuencia generalmente pertenecen a especies diferentes (Stackebrandt, E. y Embley, M. T. (2000) "Diversity of Uncultured Microorganisms in the Enviroment". En: Nonculturable
10 Microorganisms in the Environment, R. R. Colwell y D. J. Grimes (ediciones),
ASM, Press, Washington DC, pÆginas57-75). Por lo tanto un nivel de un 2% de divergencia en la secuencia es bastante elevado (Roselló-Mora, R. y Amann,
R. (2001). "The Species Concept for Prokaryotes".FEMS Microbiol. Rev. 25: 39-
67), e indica que Microbispora sp. ATCC PTA-5024 y Microbispora Coral/ma
15 NRRL 30420 (MF-BA-1 768) son cepas diferentes.

IDENTIDAD DE LA CEPA MICROBISPORA sp. ATCC PTA-5024
La cepa que produce el antibiótico 107891 se incluye en el gØnero Microbispora, familia Streptosporangiaceac en virtud de las siguientes
20 caracteristicas quimiotaxonOmicas y morfolOgicas:
- presenci de Æcido meso-diaminopimØlicoen la pared celular;
- cantidad mayoritaria de MK-9 (Ill, VllJ-1-14) y fosfolipido de tipo IV segUn Lechevalier y cols. (H. A. Lechevalier, C. de BriŁvey M. P. Lechevalier, (1977): "Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition",
25 Biochem. Syst. Ecol. 5: 246-260);

15

- perfil de Æcido grasode 3c Kroppenstedt, (R. M. Kroppenstedt, (1992): "The Genus Nocardiopsis"1 en: The Prokariotes, Vol II, pÆginas 1139-1156, A. Balows, H. Truper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer eds; Nueva York, Springer-Verlag);
5 - ausencia de ÆcidosmicOlicos;
- formación de pares longitudinales caracteristicos de esporas en las puntas de esporóforos cortos ramificÆndoselateralmente a partir de hifas aØreas. Esporas
no mOviles;
- secuencia parcial del gen ARNr 16 (ADNr 16S), es decir, 1443 nucleótidos,
10 correspondiente a un 95% del ARNr completo, recogida en el n° de
identificación de secuencia 1, mostrando una identidad superior a un 97% respecto a las secuencias de ADNr 16 S de la especie Microbispora descrita.
De igual modo que con otros microorganismos, las caracterIsticas de Ia
cepa que produce el antibiótico 107891 estân sujetas a variación. Por ejemplo,
15 pueden obtenerse variantes artificiales y mutantes de la cepa por tratamiento
con varios mutàgenos conocidos, como par ejemplo rayos U -V., y especies qulmicas coma por ejemplo Æcidonitroso, N-metil-N’-nitro-Nnitrosoguanidina y muchos otros. Todas las variantes naturales y artificiales y mutantes de la cepa Microbispora sp. ATCC PTA-5024 capaces de producir el antibiOtico 107891
20 son consideradas equivalentes a la misma para el propOsito de esta invención,
y por lo tanto dentro del alcance de la invención.

EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ANTIBIOTICO 107891
Tal y como se ha mencionado anteriormente, el antibiOtico 107891 se
25 encuentra casi igualmente distribuido en el micello y en la fracción filtrada del

16

caldo de fermentaciOn.
El caldo recuperado puede ser procesado para separar el micelio del sobrenadante del caldo de fermentación y el micelio puede extraerse con un disolvente miscible con agua para obtener una solución que contenga el
5 antibiôtico 107891, despuØs de la retirada del micelio gastado. Puede
procesarse entonces este extracto de micelio por separado o en combinación
con el sobrenadante segUn los procedimientos recogidos a continuación para la
fracciôn sobrenadante. Cuando el disolvente miscible con agua pueda provocar
interferencias con las operaciones a la hora de recuperar el antibiOtico del
10 extracto de micelio, puede eliminarse el disolvente miscible con agua par
. destilaciOn o puede diluirse con agua hasta una concentraciOn que no interfiera.
El tØrmino "disolvente miscible con agua" tal y como se usa en esta
solicitud, pretende tener el significado dado actualmente en la tØcnica de este
tØrmino y se refiere a disolventes que, en las condiciones de uso, son miscibles
15 con agua en un intervalo de concentración razonablemente amplio. Son
ejemplos de disolventes orgÆnicos miscibles conagua que pueden usarse en la
extracción de los compuestos de la invenciOn: alcanoles inferiores, por ejemplo alcanoles (C1 -C3) como por ejemplo metanol, etanol y propanol; fenilalcanoles
(C1 -C3) como por ejemplo alcohol bencIlico; cetonas inferiores, por ejemplo
20 cetonas (C3-C4) como par ejemplo acetona y etilmetilcetona; Øteres ciclicos
como por ejemplo dioxano y tetra hid rofurano; glicoles y sus productos de eterificación parcial como par ejemplo etilenglicol, propilenglicol y etilenglicol monometil Øter, amidas inferiores coma par ejemplo dimetilformamida y dietilformamida; ÆcidoacØtico d imetilsulfOxido y acetonitrilo.
25 La recuperación del compuesto a partir del sobrenadante del caldo de

17

fermentación del microorganismo productor se lieva a cabo segün las tØcnicas conocidas per se, las cuales incluyen extracción con disolventes, precipitaciOn por adición de no disolventes o por cambio del pH de la solución, por cromatografia de reparto, cromatografIa de reparto en fase inversa,
5 cromatografIa de intercamblo iOnico, cromatografla de exclusion molecular y
similares o una combinaciOn de dos o mÆs de dichas tØcnicas. Un
procedimiento para recuperar los compuestos de la invenciOn a partir del caldo
de fermentaciOn filtrado incluye la extracciOn del antibiOtico 107891 con
disolventes orgÆnicos inmiscibles con agua, seguido de precipitación de los
10 extractos concentrados, posiblemente anadiendo un agente precipitante.
. TamblØn en este caso, el tØrmino "disolvente inmiscible con agua" tal y como se usa en esta solicitud, pretende tener el significado dado actualmente
en la tØcnica a este tØrmino y se refiere a disolventes que, en las condiciones
de uso, son ligeramente miscibles a prÆcticamente inmisciblescon agua en Lin
15 intervalo de concentraciOn razonablemente amplio, adecuado para el uso
pretendido.
Son ejemplos de disolventes orgÆnicos inmisciblescon agua que pueden
usarse en la extracción de los compuestos de la invenciOn a partir del caldo de fermentaciôn: alcanoles de al menos cuatro Ætomos de carbonoque pueden ser
20 lineales, ramificados o ciclicos como por ejemplo n-butanol, 1-pentanol, 2-
pentanol, 3-pentanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 4-metil- 1 -pentanol, 3-metil-1 -pentanol, 2,2-dimetil-3-pentanol, 2,4dimetiI-3-pentanol, 4,4-dimetil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol, 1-heptanol, 2-heptanol, 5-metil-1 -hexanol, 2-etil-1-hexanol, 2-metil-3-hexanol, 1 -octanol, 2-octanol,
25 ciclopentanol, 2-ciclopentiletanol, 3-ciclopentil-1 -propanol, ciclohexa nol,

18

cicloheptanol, ciclooctanol, 2, 3-d imetil-ciclohexanol, 4-etilciclohexanol, cicloctilmetanol, 6-metil-5-hepten2-ol, 1-nonanol, 2-nonanol, 1-decanol, 2-decanol y 3-decanol; cetonas de al menos cinco Ætomosde carbono como por ejemplo metilisopropilcetona, metilisobutilcetona, metil-n-amilcetona,
5 metiljsoamjlcetona y mezclas de los mismos.
Tal y como se conoce en la tØcnica, puede mejorarse la extracción del
producto a partir del caldo de fermentaciOn filtrado ajustando el pH a un valor apropiado, y/o aæadiendo una sal orgânica apropiada formando un par iOnico con el antibiOtico, el cual es soluble en el disolvente de extracciôn.
10 Tal y como se conoce en la tØcnica, puede mejorarse la separación de fases aæadiendosales a la fase acuosa.

Cuando, despuŁsde una extracción, se recupera una fase orgÆnicaque
contiene una cantidad sustancial de agua, puede ser conveniente destilar agua azeotrópicamente a partir de ella. Generalmente, esto requiere anadir un
15 disolvente capaz de formar una cantidad minima de mezclas azeotrópicas con
agua, seguido de Ia adiciôn de un agente precipitante para precipitar el producto deseado si fuera necesario. Son ejemplos representativos de disolverites orgÆnicos capaces de formar una cantidad minima de mezclas azeotrOpicas con agua- n-butanol, benceno, tolueno, butilØter, tetracloruro de
20 carbono, cloroformo, ciclohexano, 2,5-dimetilfurano, hexano y m-xileno, siendo
el n-butanol el disolvente preferido.
Son ejemplos de agentes precipitantes el Oter de petrOleo, alquilØteres
inferiores como por ejemplo etilØter, propilØter y butilØter, y aiquilcetonas inferiores como por ejemplo acetona.
25 SegUn un procedimiento preferido para recuperar el antibiótico 107891,

19

el caldo de fermentaciOn filtrado puede ponerse en contacto con una matriz de adsorción seguido de elución con un disolvente polar, miscible en agua o una de sus mezclas, concentraciôn hasta un residuo oleoso a presión reducida, y precipitaciOn con un agente precipitante del tipo ya mencionado anteriormente.
5 Son ejemplos de matrices de adsorciôn que pueden usarse convenientemente en la recuperaciOn de los compuestos de la invenciOn resinas de poliestireno o de mezcla de poliestireno-divinilbenceno (por ejemplo M112 o S112, Dow Chemical Co.; Amberlitefi XAD2 o XAD4, Rohm & Haas; Diaion HP 20, Mitsubishi), resinas acrilicas (por ejemplo XAD7 o XAD8, Rohm
10 & Haas), poliamidas como por ejemplo policaprolactamas, nylons y
polivinilpirrolidonas entrecruzadas (por ejemplo Poliamida-CC 6, Poliamida-SC
6, PoliamidaCC 6,6, Poliamida-CC 6AC y Poliamida-SC 6AC, Macherey-Nagel
& Co., Alemania; PA400, M. Woelm AG, Alemania); y la resina de polivinilpirrolidona PVP-CL, (Aldrich Chemie GMBH & Co., KG, Alemania) y
15 dextranos entrecruzados de poro controlado (por ejemplo Sephadexfi LH20,
Pharmacia Fine Chemicals, AB). Preferiblemente se emplean resinas de poliestireno, siendo particularmente preferida la resina Dialon HP 20.
En el caso de las resinas de poliestireno, resinas de poliestireno-divinilbenceno, resinas de poliamida o resinas acrilicas, un eluyente preferido
20 es un disolvente miscible con agua o sus mezclas acuosas. Las mezclas
acuosas pueden contener tampones a un valor apropiado de pH.
TambiØn en este caso, el tØrmino "disolvente miscible con agua" tal y
como se usa en esta descripciOn y reivindicaciones, pretende tener el significado dado actualmente en la tØcnica a este tØrmino tal y como se
25 describe anteriormente.

20

Los sucesivos procedimientos para el aislamiento y purificacion del
antibiôtico pueden Ilevarse a cabo sobre los extractos reunidos a partir del
sobrenadante del caldo y del micelio. Por ejemplo, cuando la parte del producto antibiOtico contenida en el caldo de fermentaciOn filtrado o sobrenadante Se

5 recupera por absorciôn sobre una resina de absorción y la parte del producto
antibiótico contenida en el micelio se extrae a partir del mismo con un
disolvente miscible con agua, seguido de adsorciOn sobre una resina de
absorciôn, pueden combinarse las fracciones eluidas de cada uno de los dos
grupos de resinas de absorciOn, opcionalmente despuØs de concentración, y
10 despuØs procesarse adicionalmente como un cultivo unitario. Alternativamente,
. cuando los dos grupos de resinas de absorciOn utilizados para las etapas de
extracciôn por separado son del mismo tipo y tienen las mismas caracteristicas
funcionales, pueden agruparse juntas y la mezcla puede someterse a una
etapa de eluciôn unitaria, por ejemplo, con un disolvente miscible con agua o
15 una de sus mezclas con agua.
En cualquier caso, sea cual sea el procedimiento adoptado para
recuperar el antibiOtico 107981 bruto, la sucesiva etapa de purificaciOn se Ileva
a cabo normalmente sobre la mezcla de los materiales brutos resultante de la combinaciOn de los productos que se originan a partir de las etapas de
20 extracciOn por separado.
La purificaciôn del antibiôtico 107891 bruto puede Ilevarse a cabo por cualquiera de las tØcnicas conocidas per Se, pero se Ileva a cabo preferiblemente por medio de procedimientos cromatogrÆficos. Ejemplos de estos procedimientos cromatogrÆficos son aquellos recogidosen relación a la
25 etapa de recuperación e incluyen tambiØn cromatografla sobre fases

21

estacionarias como por ejemplo gel de sIlice, alumina, silicato de magnesio activado y similares o cromatografia en fase inversa sobre gel de silice silanizado que tiene diversas derivatizaciones funcionales, y eluyendo con disolventes miscibles con agua o una mezcla acuosa de disolventes miscibles
5 con agua del tipo mencionado anteriormente.
Por ejemplo, puede emplearse cromatografia preparativa por HPLC
usando RP-8 o RP-18 como fase estacionaria y una mezcla do tampOn HCOONH4:CH3CN como sistema eluyente.
Las fracciones activas recuperadas a partir de la etapa de purificación se
10 disponen juntas, se concentran a vacio, se precipitan por adiciOn do un agente
precipitante del tipo mencionado anteriormente y so secan o liofilizan en turnos individuales o iterativos. En el caso de que el producto contenga cantidades residuales de formiato de amonlo u otras sales tamponadoras, Østas pueden eliminarse por absorciOn del antibiótico 107891 sobre una columna de
15 extracción en fase sólida, por ejemplo una columna con resina en fase inversa
como por ejemplo SPE Superclean LCP18 Supelco (Bellefonte PA, EE.UU.), seguido de un lavado con agua destilada y eluciôn con una mezcla apropiada
de disolventes acuosos, por ejemplo etanol:agua. El antibiôtico se recupera entonces eliminando los disolventes de eluciOn.
20 SegUn esto, una preparaciOn seca de complejo de antibiOtico 107891 purificado se obtiene en forma de un polvo blanco.
Como es habitual en esta tØcnica, las etapas de producciôn, asi como la
de recuperaciOn y purificación, pueden seguirse por una serie de procedimientos analIticos que incluyen ensayo inhibidor frente a
25 microorganismos susceptibles y control analItico usando la HPLC o HPLC

77

acoplada con espectrometrIa de masas.
Una tØcnica analitica por HPLC preferida se Ileva a cabo en un instrumento Waters (Waters Chromatography, Milford, MA) equipado con una columna Waters Simmetry-shield RP8, 5p (250 x 4,6 mm) que eluye a razón de
5 un caudal de 1 ml/min y a una temperatura de 50°C.
La eluciÆn fue con un programa de varias etapas: tiempo = 0 (30% de
fase B); tiempo = 8 mm (30% de fase B); tiempo = 28 mm (40% de fase B). La fase A era acetonitrilo: tampOn formiato de amonio 100 mM (pH: 5,0) 5:95 (volumen/volumen) y la fase B era acetonitrilo. El detector UV fue a 282 nm.
10 El efluente de la columna Se separO en una proporcion de 5:95 y la mayor parte (aproximadamente 950 p1/mm) fue desviada hacia un detector de conjunto de fotodiodos. Los 50 pl/min restantes se desviaron hacia un interfaz
ESI de un espectrOmetro de masas de trampa iónica Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San JosØ CA).
15 El anÆlisis porespectrometria de masas se llevô a cabo en las siguientes condiciones:
Condiciones de entrada de la muestra:
gas de arrastre (N2) 414 kPa;
gas auxiliar (N2) 34,5 kPa;
20 estufa del capilar 250°C;
ajustes del voltaje a la entrada de la muestra: polaridad positiva y negativa;
voltaje de nebulización iónica +1- 5 kV;
voltaje del capilar +1- 19 kV;
25 condiciones de barrido:

23

tiempo ionico mÆximo 200ms;
tiempo iónico 5 ms;
microbarrido completo 3;
segmento: 30 minutos de duración, casos de barrido positivos (150-2000 mlz) y
5 negativos (150-2000 m/z).
En estas condiciones analiticas de HPLC, los Factores Al y A2 del
antibiótico 107891 mostraron tiempos de retenciOn de 13,2 minutos y 13,9 minutos respectivamente. En el mismo sistema de HPLC se eluyó el factor A2 Ramoplanina (L. Gastaldo, R.Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenring, L. F.
JO Zerilli, G. RomanO, M. Denaro y B. Cavalleri, (1992): "Isolation, structure
determination and biological activity of A-16686 Factors A’l, A’2 y A’3 glycolipodepsipeptide antibiotics", J. Ind. Microbiol. 11: 13-18) con un tiempo de retención de 7,5 minutos.
Los Factores Al y A2 del antibiótico 107891 pueden separarse de una
15 muestra purificada de complejo de antibiOtico 107891 por medio de HPLC
preparativa.
El Factor Al se separo y se purifico en una columna C18 Symmetry
Prep. a partir del complejo de antibiOtico 107891 purificado disuelto en IJMSO:Æcidofôrmico 95:5 (volumen/volumen) usando un gradiente de eluciôn
20 lineal durante 25 minutos desde un 30% hasta un 45% de fase B a un caudal
de 3,5 ml.
La fase B era acetonitrilo. La fase A era tampÆn deformiato de amonio
25 mM a pH 4,5:acetonitrilo 95:5 (volumen/volumen). Las fracciones eluidas que contenlan el Factor Al puro del antibiótico 107891 se juntaron y
25 concentraron a vacio. La solución residual se liofilizO dando el Factor Al puro

24

en forma de un polvo blanco.
El Factor A2 se separô y se purificO por eluciOn isocrÆtica en una
columna C18 Symmetry Prep. a partir de una muestra de complejo de antibiOtico 107891 purificado disuelto en una mezcla de Æcido
5 acØtico:acetonitrilo:tampOn formiato de amonio 100 mM (pH 4) 50:120:80
(volumen/volumen). La eluciôn isocrÆtica se llevô a cabo a un caudal de 7 ml
con una mezcla de tampOn formiato de amonio 100 mM pH 4:acetonitrilo en la proporciÆn82,5:17,5 (volumen/volumen). Las fracciones eluidas que contenian
el Factor A2 puro del antibiótico 107891 se juntaron y concentraron a vaclo. La
10 soluciOn residual se liofilizO dando el Factor A2 puro en forma de un polvo
blanco.

Como el antibiótico 107891 y sus Factores Al y A2, tal y como se
muestra por titulación Æcido/base en 2-metoxietanol (MCS):H20 12:3 (volumen/volumen) contienen una funciOn bÆsica, son capaces deformar sales
con Æcidos adecuados segUn procedimientos convencionales y pueden existir tambiØn en forma de base libre.

El antibiótico 107891 y sus Factores Al y A2, cuando se obtienen
enforma de base libre, pueden convertirse con Æcidosen las correspond ientes sales, las cuales incluyen sales farmacØuticamente aceptables no tOxicas. Las
20 sales adecuadas incluyen aquellas sales formadas por reacciOn convencional
con Æcidos orgÆnicos e inorgÆnicos tal y como por ejemplo clorhidrico, bromh Idrico, sulfUrico, fosfÆrico, acØtico, trifluoroacØtico, tricloroacØtico, succnico, citrico, ascôrbico, IÆctico, maleico, fumÆrico, palmitico, cOlico, pamoico, mücico, glutÆmico, alcanfOrico, glutârico, glicÆlico, ftÆlico, tartÆrico,
25 lÆurico, esteªrico, salicilico, metanosulfOnico, bencenosulfônico, sôrbico,

25

picrico, benzoico, cinâmico y Æcidos similares. Las sales de adiciOn del antibiôtico 107891 y sus Factores Al y A2 con Æcidos pueden prepararse segUn los procedimientos habituales comünmente empleados. Como ejemplo,
Se disuelve el antibiôtico 107891 o su Factor Al o su Factor A2, en la forma de
5 base libre, en la minima cantidad de un disolvente adecuado, tipicamente un
alcanol inferior o una mezcla de alcanol inferior/agua, se anade de forma gradual a la solución obtenida la cantidad estequiomØtrica de un Æcido adecuado seleccionado y la sal obtenida se precipita por la adición de un no disolvente. La sal de adiciôn que so forma Se recupera entonces por filtraciOn o
10 evaporación de los disolventes.
De forma alternativa, estas sales pueden prepararse en una forma sustancialmente anhidra a travØs de liofilizaciOn; en este caso una sal de antibiOtico 107891 o de su Factor Al o de su Factor A2 con Æcido volàtil se disuelve con una cantidad adecuada do Æcido no volÆtil. La solución se filtra

15 entonces de cualesquier insolublos y se liofiliza en turnos individuales o
iterativos.

Puede obtenerse tambiØn una sal do adición especifica a partir de una
soluciôn de otra forma salina de antibiOtico 107891 o de su Factor Al o de su Factor A2 cuando la sal deseada precipita tras la adiciOn del aniOn apropiado.
20 La transformaciOn del compuesto no salino do la invenciOn en las sales de adiciôn correspondientes, y a la inversa, es decir, la transformación de una
sal de adiciôn de un compuesto de la invención en la forma no sauna, estÆn dentro de la pericia tØcnica ordinaria y son abarcadas por la presente invenciOn.

25 La formaciÆnde sales del antibiótico 107891 y de sus Factores Al y A2

26

puede servir para diferentes propôsitos, incluyendo la separación, purificaciOn de dicho antibiótico 107891 de sus Factores Al A2 su uso como agentes terapØuticos o promotores de crecimiento animal. Habitualmente se emplean las sales farmacØuticamente aceptables con fines terapØuticos.
5 El tØrmino "sales farmacØuticamente aceptables" identifica aquellas sales no tOxicas que pueden utilizarse en la terapia de animales de sangre

caliente.
El complejo de antibiôtico 107981, sus Factores Al A2 una mezcla
de dichos factores en cualquier proporciOn pueden ser administrados como
10 tales o en mezclas con vehIculos farmacØuticamente aceptables tambiØn
pueden ser administrados junto con otros agentes antimicrobianos como por ejemplo penicilinas, cefalosporinas, aminoglicósidos glicopØptidos.
Una terapia conjunta incluye por lo tanto una administración secuencial, simultØnea P01 separado del compuesto activo de un modo que los efectos
15 terapØuticos del que se administra en primer lugar no han desparecido por
completo cuando se administra el siguiente.
Los compuestos de la invención o sus sales de adiciôn farmacØuticamente aceptables pueden formularse en formas adecuadas para administraciôn parenteral, oral o tOpica. Para administración intravenosa en el
20 tratamiento de cualquier infección que implica un microorganismo susceptible al
antibiótico, una formulaciOn parenteral estÆ, por ejemplo, en agua con un agente solubilizante apropiado como por ejemplo polipropilenglicol o dimetilcetamida una agente activo en superficie (por ejemplo polioxetilensorbitÆn mono-oleato o aceite de ricino polietoxilado) o
25 ciclodextrinas o formulaciones a base de ciclodextrinas o fosfolipidos en agua

27

estØril para inyección. Se puede obtener tambiØn una formulación inyectable con una ciclodextrina apropiada.
El complejo de antibiôtico 107891, sus Factores Al y A2 y una mezcla
de dichos factores pueden ser usados tambiØn en una farmacØutica adecuada
5 como por ejemplo una cÆpsula, un comprimido o una suspensiOn acuosa para
administración oral o con cremas o gelatinas convencionales para aplicaciones tOpicas. AdemÆs de uso como medicamentosen terapia humana y animal, los compuestos de la invención pueden usarse tambiØn como promotores de crecimiento animal. Para este propOsito, se administra por via oral un
10 compuesto de la presente invención en un alimento adecuado. La concentraciOn exacta empleada es aquella que se requiere para proporcionar el agente activo en una cantidad eficaz de promotor de crecimiento cuando se consumen cantidades normales de alimento.
La adiciôn del compuesto activo de la invenciôn al alimento del animal se
15 lleva a cabo preferiblemente preparando una premezcla apropiada del alimento
que contenga el compuesto activo en una cantidad eficaz e incorporando la premezcla en la raciôn completa. De forma alternativa, puede mezclarse en el alimento un concentrado intermedio o suplemento de alimento que contenga el ingrediente activo, El modo en el que pueden prepararse y administrarse tales
20 premezclas del alimento y raciones completas se describe en libros de
referencia (como por ejemplo "Applied Animal Nutrition", W. H. Freedman and CO., San Francisco, EE.UU., 1969, o "Livestock Feeds and Feeding" libros 0 y
B, Corvallis,Ore., EE.UU., 1977).

25 CARACTER1STICAS FISICOQUIMICAS DEL ANTIBIOTICO 107891

28

A) EspectrometrIa de masas:
En experimentos de EM en un instrurnento Thermofinnigan LCQ deca equipado con una fuente de electronebulización, usando una mezcla de
5 calibrado Thermofinnigan, el antibiótico 107891 da dos iones doblemente
protonados a m/z = 1124 y a mlz = 1116 correspond ientes a la composiciôn isotópica mÆs baja de los Factores Al y A2 del complejo respectivamente. Las condiciones de electronebulización fueron: voltaje de nebulizaciOn: 4,7 kV; temperatura capilar: 220°C; voltaje del capHar: 3 V; modo de infusiOn: 10
10 pI/minuto. Se registraron espectros a partir de una solución de 0,2 mg/ml en
metanol/agua 80/20 (volumen/volumen) con Æcido trifluoroacØtico al 0,1% y se recogen en la Figura 1A (espectro de baja resoluciOn de barrido completo) y 1 (espectro de alta resoluciOn de barrido aumentado).
B) El espectro en el infrarrojo del antibiótico 107891 registrado en KBr con un
15 espectrofotOmetro Bruker FT-IR modelo IFS 48, muestra maxima absorciOn a
(cm-1): 3263; 2929; 1661; 1633; 1402; 1114; 1026. El espectro en el infrarrojo
se recoge en la Figura 2. Las bandas de absorciOn a 1631, 1596 y 1346 se atribuyen a cantidades residuales de formiato de amonlo.
C) El espectro en el UV del antibiOtico 107891, llevado a cabo en metanol/1-120
20 (en una proporciOn 80:20) con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 16
muestra dos hombros a 226 y 267 nm. El espectro en el UV se recoge en la Figura 3.
D) El espectro de RMN1H se registrO en la mezcla metano! d4:1-120 (pH 4,3 HCI) 40:10 (volumen/volumen) a 40°C en un espectrómetro Bruker AMX 600
25 aplicando una secuencia de supresión de agua. Como patrOn interno, se

29 .

considerô la seæal residual de metanol-d4 a 3,31 pmm.
El espectro de RMN-1H del antibiÆtico 107891 se recoge en la Figura 4.
El espectro de RMN-1H del antibiôtico 107891 disuelto en metanol d4:H20 (HCI 0,01N) 40:10 (volumen/volumen) muestra los siguientes grupos de seæales (en
5 ppm) a 600 MHz usando MeOH-d4 como patron interno (3,31 ppm), [6 = ppm,
multiplicidad; (atribuciOn)]: 0,93 d (CH3), 0,98 d (CH3), 1,07 t (CH3 solapados),
1,18 t (CH3 solapados), 1,26 s (CH3), 1,30 t (CH3 solapados), 1,62-1,74 m (CH2), 1,78 d (CH3), 1,80 d (CH3), 2,03 m (CH2), 2,24 m (CH), 2,36 m (CH2), 2,72-3,8 m (CH alfa peptIdicos), 3,8-5,2 m (CH alfa peptIdicos), 5,53-6,08 s
10 (CH2), 5,62 d (OH en el doble enlace), 6,42 m (CH), 6,92 d (CH en el doble
enlace), 7,07,55 m (CH aromÆticos), 7,62-10,4 d y m (NH aromÆticos y peptid icos).
E) El espectro de RMN-13C Se registrO en la mezcla metanol d4.-H20 (pH 4,3 HCl) 40:10 (volumen/volumen) a 40°C en un espectrómetro Bruker AMX 600
15 usando como patron interno la seæal residual de metanol d4 a 49,15 ppm. El
espectro de RMN-13C bb desacoplado del antibiOtico 107891 se recoge en la Figura 5.
El espectro de RMN-13C del antibiótico 107891 disuelto en metanol
d4:H20 (HCl 0,01 N) 40:10 (volumen/volumen) muestra los siguientes grupos de
20 seæales (en ppm) a 600 MHz usando MeOHd4 como patrOn interno (49,15
ppm), [6 = ppm; (atribucion)]: 13,6-23,2 (CH3 alifÆticos), 26,16-73 (CH2 alifÆticosy CH alfa peptidicos), 105-136 (CH en el doble enlace y aromÆticoy carbonos cuaternarios), 164,3-176,3 (carbinoles petidicos)
F) El complejo del antibiótico 107891 se disolviO en 2-metoxietanol (MCS):H20
25 12:3 (volumen/volumen) conteniendo un exceso molar de Æcido clorhidrico 0,01

30

M. La solución se valorO por retroceso con una solución de hidrOxido de potasio 0101 N. La curva de valoración resultante mostrô una funciOn ionizable bÆsica.

COMPOSICION EN AMINOACIDOS DEL ANTIBIOTICO 107891 Y DE SUS
5 FACTORESA1YA2

A) Determinación de aminoÆcidos "resistentes a Æcido" en el complejo del antibiOtico 107891.
Se sometiô al antibiótico 107891 a una hidrOlisis Æcida completa (HCI
10 6N, 105°C, 24 h) y se identificaron los componentes aminoacidicos del
antibiÆtico resistentesa tratamiento con Æcido. Los aminoàcidos lÆbilesfrente a Æcido no son detectables con este procedimiento. El hidrolizado se estudió mediante anÆlisis par HPLC-EM y CG-EM, despuØs de una derivatizaciOn adecuada, en comparaciôn con una mezcla de aminoªcidos convencionales
15 derivatizada de forma similar. Para anÆlisis parHPLC, la muestra hidrolizada se
tratô con carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (kit reactivo de Nor de AccQ-TagTM) para anÆlisis par CG con una mezcla de HCI 3 N en metanol anhidro y anhidrido trifluoroacØtico.
El anÆlisis cualitativo por HPLC se llevó a cabo en un sistema de
20 cromatografia Uquida con detecciôn simultnea de DAD y EM. El procedimiento
de HPLC tenla las siguientes condiciones:
Columna: AccQ-TagTM (Waters C18 NovoPak 4 pm 3,9 x 150 mm).
Temperatura de la columna: 37°C.
Caudal: 1 mI/minuto.

25 Fase A: acetato de amonio 140 mM pH 5 (âcido acØtico).

31

Ease B: agua: acetonitrilo 60:40 (volumen/volumen). Programa de eluciôn:
Tiempo
(minutos)

0 5 30 35 40 41

80 95 95 5

DetecciOn por UV: 254 nm.
5 Las condiciones de EM fueron las siguientes:
Espectrómetro: Finnigan LCQ deca equipado con una fuente de electronebulización convencional.
Temperatura capilar: 250°C.
Voltaje de la fuente: 4,70 kV.
10 TensiOn de la fuente: 80 pA.
Voltaje del capilar: -15 V.
El anÆlisis cualitativo por CG se IlevO a cabo en un cromatógrafo de gases equipado con un detector do EM-JE.
El procedimiento de CG ten ía las siguienfes condiciones:
Columna: J & W Scientific DB-5, 30 m x 0,254 mm de D.I. x 0,25 pm E.P.
Gas vehiculo: helio.
Modo de inyección: conjunta.
Temperatura del inyector: 200°C.
Temperatura en la lInea de transferencia: 300°C.
20 Programa de temperaturas: do 50°C a 100°C a razOn de 2,5°C/minuto (10
minutos), de 100°C a 250°C a razón de 10°C/minuto (15 minutos), 15 minutos a 250°C.

32

Volumen de inyecciôn: 1 p1.
Las condiciones de EM fueron las siguientes: EspectrOmetro: Finnigan TS0700
Modo de ionizaciOn: impacto electrOnaco.
5 Ajustes de voltaje:
Corriente del filamento: 400 mA.
Multiplicador electrônico: 1400 V
Energia electrónica: 70 eV
Modo de ion positivo:
10 Condiciones de barrido:
. Intervalo de barrido: 40-650 amu.
Tiempo de barrido: 1 segundo.
En los cromatogramas de CL/EM y de CG/EM obtenidos sobre el hidrolizado de antibiOtico 107891, se identificaron los siguientes aminoàcidos
15 junta con otros picas no identificados: lantionina, metillantionina, glicina, prolina,
valina, Æcido aspartico (estudios de RMN indican que es un producto de transformación de la asparagina, la cual genera Æcido aspÆrtico porhidrOlisis), fenilalanina y leucina.
El antibiôtico 107891 y sus Factores Al y A2 fueron sometidos a una
20 hidrólisis Æcida completa en las mismas condiciones (derivatizaciôn y HPLC-
EM) referidas para el complejo. El anÆlisis porCG-EM se IlevO a cabo en un instrumento Thermo Finnigan Trace GC-MS equipado con un inyector PTV.
El procedimiento de CG tenia las siguientes condiciones:
Columna: Restek RTX-5MS, 15 m x 0,25 mm de D.I. x 0,25 pm de E.P.
25 Gas vehiculo: helio.

I

33

Temperatura del interfaz: 250°C.
Programa de temperaturas: 1,5 minutos a 50°C, de 50°C a 100°C a razOn de 200C/minuto, 1 minuto a 100°C, de 100°C a 135°C a razôn de 20°C/minuto, 1 minuto a 135°C, de 135°C a 250°C a razón de 200C/minuto, 1 minuto a 250°C.
5 Volumen de inyecdón: 1 p1.
lnyector: modo conjunto, temperatura base de 50°C, temperatura de transferencia de 280°C, tasa de transferencia de 14,51C/minuto.
Las condiciones de EM fueron las siguientes:
Modo de ionización: impacto electrónico.
10 Ajustes de voltaje:
Tension del filamento: 149 pA.
Multiplicador electrônico: 200 V
Energia electrónica: 70 eV
Modo de iOn positivo:
15 Condicones de barndo:
Intervalo de barrido: 33-500 amu.
Tiempo de barrido: 0,6 segundos.
En el hidrolizado de Factor Al del anttbiótico 107891, los cromatogramas
de HPLC/EM y de CG/EM mostraron la presencia de los siguientes
20 aminoÆcidos con otros picosno identfticados: lantionina, metillantionina, glicina,
prolina, valina, ÆcidoaspÆrtico (estudios de RMN indicanque es un producto de transformaciôn de la asparagina, la cual genera Æcido aspartico porhidrólisis), fenhlalanina y leucina.
El procedimiento anterior Ilevado a cabo sobre el Factor A2 reveló la
25 presencia de los siguientes aminoâcidos con otros picos no identificados:

34

lantionina, metillantionina, glicina, prolina, valina, Æcido aspÆrtico (estudios de RMN indican que es un producto de transformaciOn de Ia asparagina, la cual genera ªcido aspàrtico por hidrólisis), fenilalanina y leucina.
B) DeterminaciOn de 5-clorotript6fano en el complejo de antibiótico 107891 yen
5 su Factor Al y Factor A2.
La hidrOlisis completa del complejo de antibiôtico 107891 purificado y
sus ünicos factores Al y A2 se llevO a cabo segün el procedimiento descrito por Simpson R. J., Neuberger M. R., Liu T. Y., "Complete Aminoacid Analysis of Proteins from a Single Hydrolysate". JournalBiol. Chem. (EE.UU.), 10 de abril
10 de 1976, 251 (7), 1936-40.
Este procedimiento de hidrôlisis previene la degradaciôn de aminoÆcidos normalmente inestables durante la digestiOn con Æcidos minerales y de esta forma permite la determinaciôn de estos aminoÆcidos, incluyendo triptOfano, a partir de un hidrolizado de un pØptido. Se adquiriô una muestra patrOn de 5-
15 cloro-DL--triptOfano de Biosynt AG, Staad, Suiza, y se confirmó su estructura
por anâlisis de RMN; el DL-triptOfano se adquirió en Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.

El factor Al (1,5 mg) se suspendiô en 0,6 ml de Æcido metanosulfónico
4N conteniendo como catalizador 3-(2-aminoetil)indol al 0,2% (peso/volumen)
20 para la hidrOlisis. La hidrOlisis se llevO a cabo a 115°C durante 16 horas. El
hidrolizado se neutralizó entonces con NaOH 5N y se diluyO con una cantidad igual de agua destijada. So analizaron 100 p1 de esta solución por CL -EM. La separaciOn se IJevO a cabo en una columna Simmetry C18 (5pm) 4,6 x 250 mm (Waters Co., Milford, MA, EE.UU.) equipada con una precolumna Simmetry C18
25 (5pm) 3,9 x 20 mm. La eluciOn se llevô a cabo con un flujo de 1 mI/minuto con

35

un gradiente lineal durante 25 minutos desde un 0% hasta un 50% de fase B. La fase A era tampon HCOONH4 25 mM a pH 4,5:CH3CN 95:5 (volumen/volumen) y la fase B era CH3CN. La detección UV fue a 280 nm. El equipo de HPLC se acoplô a un espectrómetro de masas de trampa iónica
5 Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San JosØ, CA, EE.UU.). Los
efluentes de la columna se desviaron a razôn de 50 pl/minuto hacia el interfaz
de ionizaciOn por electronebulizaciOn (ESI, electrospray ionization) del espectrómetro de masas LCQ. El anØlisis de EM se llevó a cabo en las siguientes condiciones: entrada de la muestraa: gas de arrastre (N2) 414 kPa;
10 estufa capilar 210°C; polaridad del voltaje a la entrada de Ia muestra: positiva y
negativa; voltaje de nebulizaciOn iOnica +1- 4,5 kV; voltaje del capilar +1- 21 V; condiciones de barrido: tiempo iOnico mÆximo50 ms; microbarrido completo 3.
Los patrones de triptOfano y de 5-clorotript6fano eluyeron a tiempos de
retenciªn de 8,1 minutos y 11,5 minutos correspondientes a un M+H a mlz 205
15 y 239 respectivamente. En el hidrolizado del Factor Al del antibiôtico 107891,
la presencia de un pico a 11,5 minutos con mlz a 238,97 indicaba la presencia
de 5-clorotript6fano.
El patron de triptOfano resultó detectable con el sistema cromatogrØfico
usado con un limite de detecciôn de 0,3 iJgIml. Este valor es inferior al valor
20 que habria sido indicativo de la presencia de dicho aminoàcido en la muestra
de antibiôtico analizada. No se detectO triptófano dentro del Ilmite anteriormente mencionado en el cromatograma del hidrolizado del Factor Al
del antibiótico 107891. Se obtuvieron resultados idØnticos a partir de los anÆlisispor CL-EM de un hidrolizado del Factor A2 y de un hidrolizado de una
25 muestra purificada del complejo de antibiOtico 107891.

36

ESPECTROMETRIA DE MASAS DEL FACTOR Al Y DEL FACTOR A2 DEL ANTIBIOTICO 107891

El Factor Al del antibiôtico 107891 proporciona un ion doblemente
5 protonado a m/z = 1124 y el Factor A2 a m/z = 1116 correspondientes a la
composiciOn mÆs baja de isOtopos en los experimentos de EM en un instrumento Thermofinnigan LCQ deca equipado con una fuente de electronebulizaciOn, usando una mezcla de calibrado Thermofinnigan. Las condiciones de electronebulización eran: voltaje de nebulizaciôn: 4,7 V;
10 temperatura del capilar: 250°C; voltaje del capilar: 8 V; modo de infusiOn: 10
pi/minuto. Los espectros Se registraron a partir de una soluciÆnde 0,1 mg/ml en acetonitrilo:agua 50:50 (volumen/volumen) con Æcido acØtico al 0,5% y se recogen en las Figuras GA (espectro de baja resoluciOn de barrido completo) y
6B (espectro de alta resolución de barrido aumentado) y en las Figuras 7A
15 (espectro de baja resoluciOn de barrido completo) y 7B (espectro de alta
resolución de barrido aumentado).
La masa exacta del Factor Al y Factor A2 del antibiótico 107891 se ha
determinado usando un espectrómetro Bruker Daltonics APEX II, de 4,7 Teslas
equipado con una fuente de electronebulizaciOn. En base a estos datos, al
20 Factor Al Se le asigna un peso molecular de 2246,71 – 0,06, masa

S monoisotópica calculada a partir de [M+2H]2 a m/z 1124,36124 (30 ppm
exactas), determinado por IEN-EMTF de alta resoluciÆn. Al FactorA2 se le
asigna un peso molecular de 2230,71 – 0,06, masa monoisotópica calculada a
partir de [M+2H]2 a m/z 1116,36260 (30 ppm exactas), determinado por lEN-
25 EMTF de alta resolución.

37

COMPARACION DEL FACTOR Al Y FACTOR A2 DEL ANTIBIOTICO 107891 CON LOS ANTIBIOTICOS MF-BA-1768a1 y MF-BA-1768131

5 A) Se adquirio Microbispora coral/ma NNRL 30420 (MF-BA-1768), descrita en
el documento US 6.551.591 BI de la colecciOn de la NNRL. En un experimento exploratorio, la cepa de M. coral/ma NNRL 30420 (MFBA-1768) se ha fermentado en un matraz erlenmeyer en las condiciones descritas en & documento US 6.551.591 81, El caldo recuperado se extrajo por diluciOn con
10 metanol. DespuØs de la centrifugaciOn del micello, se cargo el sobrenadante en
una resina de absorciOn poliestirØnica HP20, se eluyO con una mezcla 70:30 de metanol:agua, que se redujo a un pequeæovolumen y entonces se Iioftlizô.
En el cromatograma dos picos mostraron senates a 1091 y a 1108
[M’i-2H]24, con’espondientes a [M+2H]24 recogida en el documento US
15 6.551.591 BI para MF-BA-176831 y MF-BA--1768a1 respectivamente. Se puso
entonces en contacto el extracto anterior con los Factores Al y A2 del antibiótico 107891 y la mezcla se analizó por CL -EM. Se encontrO que los picos
de los antibiôticos MF-BA-1768131 y MF-BA-1768a1 y de los Factores Al y A2
del antibiOtico 107891 tenian tiempos de retenciôn distintos y distintos
20 fragmentos [M+2H]2 de EM.
B) Se Ilevª a cabo un experimento adicional en un tanque de fermentaciôn de
30 I de la cepa Microbispora sp. NRRL 30420 (MF-BA-1768) y el caldo recuperado se procesO siguiendo la descripción del documento US 6.551.581
Bi. DespuOs de la etapas de purificaciôn secuencialmente en una resina
25 poliestirØnica HP20 y en una resina de poliamida CC 6 de 0,10,3 mm

38

(Macherey-Nagel), se obtuvieron dos sustancias individuales en forma pura par HPLC preparativa sobre una columna C18 Phenomenex (Torrance CA, EE.IJU.) Luna (250 x 12,2 mm) de 10 p de tamaæo departIcula y se eiuyO a un caudal de 27 mi/minuto con el siguiente programa de varias etapas: tiempo = 0
5 minutos (32% de fase B); tiempo = 8 minutos (32% de fase B); tiempo = 20 minutos (36% de fase B); tiempo = 32 minutos (90% de fase B). La fase A era
un 0,05% de ªcido fórmico (volumen/volumen) en agua y la fase B era CH3CN. Estas sustancias mostraron actividad antibacteriana frente a

estafilococos y enterococos tal y como se muestra en la Tabla IV. En los experimentos de CL-EM las dos sustancias mostraron seæales de jones

15

doblemente protonados del tipo [M+2H] correspond ientes a MF-BA-1768a1 y MF-BA-17681 antibiôticos, tal y coma se describe en la patente de los EE.UU. 6.551.591 Hi.

labia IV
MIC

(pg/mi)
CEPA MFBA- MF- 107891 107891 Complejo
1768a1 BA- Al a2 de 107891

1768a1

Aisiado cllnico 1400 0,13 0,5 0,13 0,13 0,13
Staphylococcus aureus
Met r
Aisiado clinico 568 4 16 1 2 2
Enterococcus faecium.

39

Aislado clinico 569 4 8 1 2 2
Enterococcus faecium.
Van
Aislado clInico 559 4 8 1 2 2
Enterococcus faecalls.
Aislado cUnico 559 4 8 0,5 1 0,5
Enterococcus faecalis.
Van

Las condiciones experimentales de los ensayos antimicrobianos fueron
las mismas que aquellas utflizadas para los ensayos resenados en la Tabla VI mÆs adelante.

S Los anÆlisisde CL-EM de los antibiÆticos aisladosBA-i 768a1 y MF-BA-17683 se Ilevaron a cabo en una columna Simmetry C18 (5 pm) de 4,6 x 250 mm (Waters; Milford MA, EE.UU.) equipado con una precolumna Simmetry C18 (5pm) de 3,9 x 20 mm (mantenidas ambas en una estufa a una temperatura de 500C). La eluciôn se Ilevó a cabo con un caudal de 1 mI/minuto con el siguiente
10 programa de eluciOn en varias etapas: tiempo = 0 minutos (30% de fase 8),-); tiempo = 8 minutos (30% de fase B); tiempo = 20 minutos (45% de fase B); tiempo = 24 minutos (90% de fase B); tiempo = 28 minutos (90% de fase B). La fase A era tampon HCOONH4 25 mM a pH 4,5:CH3CN 95:5 (volumen/volumen)
y la fase B era CH3CN. El equipamiento de HPLC se acopló a un
15 espectrOmetro de masas de trampa iónica Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San JosØ CA, EE.UU.). Se desviaron efluentes de la columna a razôn de 100 pl/minuto hacia el interfaz ESI del espectrómetro de masas LCQ.

E

IN

El anÆlisis de EM Se llevó a cabo en las siguientes condiciones: entrada de muestra: flujo de gas de arrastre (N2) 172,5 kPa; flujo de gas auxiliar 34,5 kPa; estufa del capilar: 210°C; polaridad del voltaje de entrada de muestra positiva y negativa; voltaje de la nebulizaciOn iónica: – 4,75 kV; voltaje del capilar: – 12 V;
5 condiciones de barrido: tiempo iônico mÆximo 50 ms; microbarrido completo 3.

10

Los factores individuales BA1768a1 y MF-BA-1768131 del antibiótico y los
Factores Al y A2 del antibiôtico 107891 se analizaron individualmente y en mezcla. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla V.

TABLAV

Tiempo de retenciOn (minutos) [M+2HJ
MF-BA-1768131 12,86 1091
Al del antbi6tic107891 16,3 1124
A2de1antibi6tico 107891 16,81 1116
BA-1768u1 18,1 1108

En el mismo sistema cromatogrfico se eluyÆ el factor A2 de ramoplanina (L. Gastaldo, R.Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenring, L. F. Zerilli, G. Romanô, M. Denaro y B. Cavalleri, (1992): "Isolation, structure
15 determination and biological activity of A-16686 Factors Al, A’2 y A’3 glycolipodepsipeptide antibiotics", J. Ind. Microbiol, 11: 13-18) con un tiempo de retenciôn de 11 minutos.

ESPECTROSCOPIA DE RMN DEL FACTOR Al Y FACTOR A2 DEL
20 ANTIBIOTICO 107891

41

Los espectros de RMN-1H del Factor Al y Factor A2 del antibiótico
107891 se registraron en la mezcla CD3CN-D20 (1:1) a 298 K en un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresiôn de
5 agua. Se considerO como patron interno la seæal residual deacetonitrilo-d3 a
1,94 ppm.
A) El espectro de RMN-1H del Factor Al del antibiOtico 107891 se recoge en la Figura 8.
El espectro de RMN-1H del Factor Al del antibiOtico 107891, disuelto en
10 CD3CN-D20 (1:1), muestra los siguientes grupos de seæales (en ppm) a 600
MHz usando CD3CN como patron interno (194 ppm), [6 ppm, multiplicidad; (atribuciOn)]: 0,84 d (CH3), 0,89 d (CH3), 0,94 t (CH3 solapados), 1,1 d (CH3), 1,13 d (CH3), 1,15 t (CH3 solapados), 1,49 m (CH2), 1,69 d (CH3), 1,75 m (CH2), 2,11 rn (CH), 2,26 m (CH), 2,5 m (CH2), 2,68 - 3,8 m (CHp peptidicos), 3,8 - 5,0
15 m (CH,, peptIdicos), 5,45 - 6,17 s (CH2), 5,58 d (CH en el doble enlace), 6,36 m
(CH), 6,86 d (CH en el doble enlace), 7,0 - 7,45 m (CH aromÆticos). Laseæalde
sulfóxido de dimetilo estÆ presente a 2,58 ppm y la seæal de formiato està
presente tambiØn a 8,33 ppm en forma de impurezas.
B) El espectro de RMN-1H bb desacoplado del Factor A2 del antibiôtico 107891
20 se recoge en la Figura 9.

40 El espectro de RMN-1H del Factor A2 del antibiÆtico 107891, disuelto en

CD3CN:D20 (1:1), muestra los siguientes grupos de senales (en ppm) a 600
MHz usando CD3CN como patrOn interno (1,94 ppm), [6 = ppm, multiplicidad;
(atribuciOn)]: 0,84 d (CH3), 0,88 d (CH3), 0,94 d (CH3), 1,06 d (CH3), 1,14 d
25 (CH3), 1,48 m (CH2), 1,65 - 1,75 m (CH2), 1,67 d (CH3), 2,15 m (CH), 2,25 m

42

(CH), 2,5 m (CH2), 2,77 - 3,8 m (CHp peptidicos), 3,8 - 4,9 m (CH,, peptidicos), 5,45 - 6,14 s (CH2), 5,59 d (CH en el doble enlace), 6,34 m (CH), 6,84 d (CH en
el doble enlace), 7,0 - 7,42 m (CH aromÆticos). La senal de sulfÆxido de dimetilo estÆ presente a 2,58ppm y la seæalde formiato est6 presente tambiØn
5 a 8,32 ppm en forma de impurezas.
Los espectros de RMN-13C del Factor Al y del Factor A2 del antibiótico
107891 Se registraron en la mezcla CD3CN:D20 (1:1) a 298 K en un espectrOmetro Bruker AMX 600 usando como patron inferno la senal residual
de acetonitrilo-d3 a 1,39 ppm.
10 C) El espectro de RMN-13C del Factor Al del antibiOtico 107891 se muestra en
la Fiçjura 10.
El espectro de RMN-13C del Factor Al del antibiOtico 107891, disuelto en CD3CN:D20 (1:1), muestra los siguientes grupos de senales (en ppm) a 600 MHz usando CD3CN como patron interno (1,39 ppm), [6 = ppm; (atribuciOn)]:
15 13,6 - 23,03 (CH3 alifªticos), 25,69 77,9 (CH2 alifÆticosy CH peptidicos), 105
- 137,3 (CH aromÆticosy en dobles enlaces y carbonos cuatenarios), 165,6 - 176,6 (carbinoles peptidicos).
D) El espectro de RMN-13C del Factor A2 bb desacoplado del antibiOtico 107891 se muestra en la Figura 11.
20 El espectro de RMN-13C del Factor A2 del antibiÆtico 107891,disuelto en CD3CN:D20 (1:1), muestra los siguientes 9IUPOS de senales (en ppm) a 600 MHz usando CED3CN como patron interno (1,39 ppm), [6 = ppm; (atribucion)]: 13,6 - 22,9 (CH3 alifÆticos), 25,65 - 73 (CH2 alifÆticosy CH0 peptidicos), 105 - 137,3 (CH aromÆticos y en dobles enlaces y carbonos cuatenarioS), 165,7 -
25 176,1 (carbinoles peptidicos).

43

ESPECTROS DE UV E JR DEL FACTOR Al Y FACTOR A2 DEL ANTIBIOTICO 107891

5 A) El espectro en el infrarrojo del Factor Al del antibiOtico 107891 registrado en
KBr con un espectrofotOmetro Bruker JR-IF modelo IFS 48 muestra una absorciôn maxima a (cm-1): 3294; 3059; 2926; 1661; 1529; 1433; 1407; 1287; 1114; 1021. El espectro en el infrarrojo se recoge en la Figura 12.
B) El espectro en el UV del Factor Al del antibiôtico 107891 registrado en
10 metanol:1-120 80:20 (volumen/volumen) con un espectrofotOmetro Perkin Elmer
Lambda 16 muestra dos hombros a 226 y a 267 nm. El espectro en el UV se recoge en la Figura 13.
C) El espectro en el infrarrojo del Factor A2 del antibiOtico 107891 registrado en KBr con un espectrofotOmetro Bruker de IR-TF modelo IFS 48 muestra una
15 absorciôn maxima a (cm-1), 3296; 3060; 2928; 1661; 1529; 1433; 1407; 1288;
1116. El espectro en el infrarrojo se recoge en la Figura 14.
D) El espectro en el UV del Factor A2 del antibiôtico 107891 registrado en metanol:1-120 80:20 (volumen/volumen) con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 16 muestra dos hombros a 226 y a 267 nm. El espectro en el UV se
20 recoge en Ia Figura 15.
En base a los datos fisicoquImicos recogidos anteriormente, puede asignarse la siguiente formula estructural al antibiótico 107891:

44

en la que X es H 0 Un halogeno (F, Cl, Br, I), Y,, Y2, Y3, Y4 e Y5 pueden ser inciependientemente S, S-0, S=O, 0-S0 y O=S=O, y en la que R1, R2, R3,
R4, R5, R6, R7 y R8 pueden ser independientemente H, OH, aiquilo (ramificado o
5 no ramificado, sustituido o no sustituido), 0 arilo (sustituido o no sustituido).
En una realización alternativa, R1, R2, R3 y R4 pueden ser H o OH. Por lo
tanto, las combinaciones posibles de R1, R2, R3 y R4 incluyen las siguientes.

R1 R2 R3 R4

H
OH

H
H

H
H

H
H
H OH H H H
H H H OH OH OH H H OH H OH H OH H H OH

45

De forma similar, R5, R6, R7 y R8 pueden ser H a OR Par lo tanto, las combinaciones posibles de R5, R5, R7 y R3 incluyen las siguientes.

OH OH OH H
OH OH H OH
OH H OH OH
H OH OH OH
OH OH OH OH

AdemÆs, en base a los datos fisicoquimicos recogidos anteriormente,
puede asignarse la siguiente fOrmula estructural al Factor Al del antibiOtico
5 107891, en la que X es Cl; Yi, Y2, Y3, Y4 e Y5 son S; R1 es H, R2 es OH, R3 es H y R4, R5, R6, R7 y R8 son H, la cual es una realizaciOn preferida de la invención junto con las sales farmacØuticamente aceptables del mismo:

AdemÆs, en base a los datos fisicoqulmicos recogidos anteriormente,
10 puede asignarse la siguiente fOrmula estructural a! Factor A2 del antibiOtico 107891, en la que X es Cl; Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5 son S-, R1 es OH; R2 es OH; R3 es
H; y R4, R5, R6, R7 y R8 son H, lo cual es una realizaciOn preferida de la

47

invención junto con las sales farmacØuticamente aceptables del mismo:

ACTIVIDAD BIOLOGICA IN VITRO DEL ANTIBIOTICO 107891
5 Se determinó la actividad antimicrobiana del antibiótico 107891 mediante el procedimiento de microdiluciOn del caldo segUn las recomendaciones del ComitØ Nacional para Patrones de Laboratorios Clinicos (NCCLS, Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards, documento M7-A5).
Las cepas usadas eran aislados do origen clinico o cepas procedentes
10 de ColeccIôn Americana de CultIvos Tipo (ATCC, American Type Culture Collection). El resultado de los ensayos se recogiO en la Tabla VI y en la Tabla

VII.

El antibiótico 107891 se disolviô en DMSO para obtener una solución
madre de 1000 pg/mI y so diluyó posteriormente en agua para obtener la
15 solución de trabajo. Los medios usados fueron caldo con ajuste de nivel catiónico Mueller Hinton (CAMBH, cation-adjusted Mueller Hinton broth) para Staphylococci, M. catarrhalis, Enterococci y L. monocytogenes; caldo de Todd Hewitt (THB, Todd Hewitt broth) para Streptococci; medio GC + Isovitalex al 1%

48

+ hemina al 1% para Neisseria spp; infusion de cerebro-corazón + suplemento de C al 1% para H. influenzae; caldo de Lactobacillus para Lactobacilli; Middlebrook 71-19 con enriquecimiento de Middlebrook OADC para M. smegmatis; medlo RPMI 1640 para C. alb/cans; caldo de Wilkins Chaigren +
5 oxirasa (1:25 volumen/volumen) para Clostridia; caldo de Bruceila que contiene cisteIna (0,5 g/l) para Propionibacteria.
Los inOculos para bacterias fueron de 105 UFC/ml. El inóculo de C.

albicans fue de 1 x 104 UFC/ml. Todos los ensayos se Ilevaron a cabo en presencia do un 0,02% de albOmina de suero bovino (BSA). Los cultivos se
10 incubaron a 35°C en contacto con el aire excepto las cepas de Clostridia y Propioniobacteria que necesitaban atmOsfera anaerobia. DespuØs de 18-24 horas se Ilevaron a cabo lecturas visuales y se determinaron [as MIC. La MIC

15

se definió como la concentración màs baja de antibiOtico a la que no hay
crecimiento visible.

TABLAVI: actividad antimicrobiana del antibiOtico 107891 MIC (pg/mi)
Micoorganismo 107891
819 Staph. aureus Smith ATCC19G36 0,13
4061 Staph. aureus LIM1 0,13
3798 Staph. aureus aislado clmnico VISA 2
1400 Staph. aureus aislado clInico Met-R :5 0,13
613 Staph. aureus aislado clInico Met-R:5 0,13
3797 Staph. aureus aislado clInico VISA Me 2
4064 Staph. aureus LIM2 GISA Met-R 0,5

1729 Staph. haemo/yticus Met-R 8
1730 Met-S 2
-f47 Si5h epidermis ATCC 12228 0,13
1139 4

44 Strept. Pneumoniae Pen-S :50,1-3
2868 Pend :50,13
49 Strept. pyogenes 0,13
559 Ent. faecalis Van-S 1
560 Ent. faecalis Van-A 0,5
A533 Ent. faecalis Van-A 1
568 Ent. faecium Van-S 2
569 Ent. faecium Van-A 1
B518 Ent. faecium Van-A 2
A6345 Ent. faecium VanA Lnz-R 4

3754 Mycobacterium smegmat/s 32
884 Listeriagarviae <0,13
148 Listeria delbrueckii A TCC 4797 4
- 1-46-0--Listen’am’ onocytogenes 0,125

833 Haemophilusinfluenzae 32
910 Haemophilus influenzae ATCC 19418 32
3924 Moraxella catharralis 1
76 Moraxella catharralis ATCC 8176 0,25
1613 Neisseria meningitidis ATCC 13090 --0,5-
977 Neisseria gonorrhaee 0,25

, 5977

50

47 schenchia co/i 128

145 indida albicans 128

TABLA VII: actividad antimicrobiana del antibiôtico 107891 frente a bacterias anaerobias
MIC (pg/rn!)
Microorganism 107891
ATCC 27520 Propionibacterium limphophilum
ATCC 25564 Propionibacterium granulasium
ATCC 14157 Propionibacterium proptonicus
P9 Propionibacterium acnes
1329 Propionibacterium acnes
ATCC 25746 Propionibacterium acnes ATCC 6919 Propionibacterium acnes ATCC 6922 Propionibacterium acnes ATCC 1348 Propionibacterium acnes

0,015
0,03
4
0,125
0,5
0,015
0,125
0,0039
0,25

4018 Clostridium difficile
4025 Clostridium difficile
4022 Clostridium difficile
4032 Clostridium perfringens 4043 Clostridium butyricum
4009 Clostridium beqerinckii

0,125
0,125
0,125
01125
0,125

51

4052 Clostridium septicum
60601 Peptostreptococcus anaerobius

El antibiOtico 107891 muestra una buena actividad antibacteriana frente
a bacterias Gram-positivas.
El intervalo de MIC frente a Staphylococcus spp,, incluyendo cepas
5 resistentes a Meticilina (MRSA) y resistentes a intermedio do tipo glicopOptido (GISA), estÆ entre 0,13 y 4 pg/mI y frente a aislados clinicos de reciente descubrimiento de Enterococcus spp., incluyendo cepas resistentes a Vancomicina (VRE), estÆ entre 0,5 y 4 pg/mI. Frente a Streptococcus spp.las MIC son:? 0,13 pg/mI.
10 El antibiOtico 107891 es tambiØn activo frente a cepas anaeróbicas
Gram-positivas; las MIC son:5 0,13 pg/mI frente a Clostridia y!? 0,004 -4 pg/mI frente a Propionibacteria. Se mostraron actividades antimicrobianas frente a cepas L. monocytogenes (MIC de 0,125 pg/mI) y Lactobacilli (intervalo de MIC 0,13-4 pg/mI).
15 Algunas bacterias Gram-negativas son susceptibles a antibiOtico
107891; las MIC son 1 - 0,25 pg/mI frente a M. catharralis, 0,5 - 0,25 pg/mI frente a Neisseria spp. y 32 pg/mI frente a H. influenzae.
El antibiOtico 107891 no es activo frente a las cepas E. co/i y C. alb/cans anaflzadas.
20 En los experimentos tiempo-muerte el antibiôtico 107891 muestra
actividad bactericida frente a la cepa GISA de S. aureus y a la cepa Van A de
E. faecalis; a las 24 horas la concentración bactericida es el valor de MIC en el caldo de Mueller Hinton.

52

S. aureus puede provocar infecciones mortales y MRSA es de relevancia
clinica particular porque es resistente a todas las penicilinas y cefalosporinas y tambiOn a otros multiples antibióticos; ademÆs se extiende fÆcilmente de paciente a paciente provocando brotes de infección con importantes
5 implicaciones para las instalaciones sanitarias (W. Witte, (1999): "Antibiotic
resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects", Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44: 1-9). El sistema nacional para la vigilancia de infección nosocômica (NNIS, Nacional Nosocomial Infection Surveillance System) de los Centros para el Control de Enfermedades (CCE) informaron
10 que la resistencia a meticilina eritre S. aurous en los hospitales de EE.UU.
aumentO de un 2,4% en 1975 a un 29% en 1991, con un grado mÆs elevado de resistencia en unidades de cuidado intensivo (L. Archibald, L. Philips, D. Monnet, J. E. Mc Gowan Jr, F. Tenover, R. Gaynes, (1997): "Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States:
15 increasing importance of the intensive care unit", Clinic, Infect. Dis. 24: 2115).
Las infecciones por estafilococos nosocômicas estÆn asociadas a una morbididad y mortalidad considerables, prolongando la duraciªn de la estancia
y aumentando los costes de hospitalización. La mayoria de las cepas de MRSA son resistentes a varios de los agentes antimicrobianos mÆs comUnmente
20 usados, incluyendo macrôlidos, aminoglicOsidos y los antibiôticos de tipo 3-
lactama en uso en la actualidad, incluyendo la ültima generaciOn de cefalosporinas.
Los patógenos adquiridos en hospitales resistentes vancomicina responsables de infecciones (como por ejemplo endocarditis, meningitis y
25 septicemia) estÆn planteandoun desaflo terapØutico creciente (Y. Cetinkaya, P.

53

Falk y C. G. Mayhall, (2000): "Vancomycin-resistant enterococci", Clin. MicrobioL Rev, 13: 686-707; L. B. Rice, (2001): "Emergence of vancomycin-resistant enterococci", Emerg. Infec. Dis. 7: 183-7).
S. Pneumoniae y M. catarrhalis son reconocidos como importantes patógenos
5 de seres humanos. Son una causa comOn de infecciones del tracto respiratorio,
particularmente otitis media en niæose infecciones del tracto respiratorio inferior
en los ancianos. Se han aceptado recientemente M. catarrhalis y S. Pneumoniae como los patôgenos mÆs comunes del tracto respiratorio (M. C. Enright y H. Mckenzy, (1997): "Moraxella (Branhamella) catarrhalis. Clinical and
10 molecular aspect of a rediscovered pathogen", J. Med. Microbiol. 46: 360-71).
Clostridia es responsable de diferentes enfermedades: gangrena
gaseosa e infecciones ulcerosas relacionadas, tØtanos, botulismo, diarrea asociada a antibióticos (CDAD) y colitis pseudomembranosa. La mayoria de estos microorganismos producen exotoxinas que desempeæan un papel
15 importante en la patogØnesis de las enfermedades. C. difficile es el agente
causante responsable del 25% de casos de CDAD y de pràcticamente todos
los casos de colitis pseudomembranosa. Durante los Ultimos aæos, se ha producido la infección conjunta por C. diffidile en pacientes con infecciôn o colonizaciôn por enterococos resistentes a vancomicina (J. G. Bartlett, (1992):
20 "Antibiotic associated diarrhea", Clinic. Infect. Dis. 15: 573-581).

ACTIVIDAD BIOLOGICA IN VITRO DE LOS FACTORES Al Y A2 DEL ANTIBIOTICO 107891

La Tabla VIII recoge las actividades antimicrobianas de los Factores Al
25 y A2 del antibiOtico 107891 por separado. Se determinaron las MIC por el

54

procedimiento de microdiluciOn del caldo tal y como se describe anteriormente.

TABLA VIII: actividad antimicrobiana de los Factores Al y A2 del antibiótico 107891

Microorganism Factor Al Factor A2
819 Staph. aureus Met-S 0,03 :5 0,03
1524 Staph. aureus Met-R 0,03 0,03
2235 Staph. aureus Met-R 0,06 0,06
3894 Staph. epidermidis Met-R 0,03 0,06--
3881 Staph. epidermidis Met-R 0,06 0,03
602 Staph. haemolyticus Met-R 0,25 0,25
3919 Strep. Pneumoniae Pen-R:5 0,0015 0,0015
3915 Strep. Pneumoniae Pen-S 0,0015 0,0015
4323 Ent.faecalisVanA 0,03 0,03
JI Ent. faecalis Van A 1 1
4341 Ent.faecalisVanB 0,5 0,5’’--
4397 Ent. faecalis Van B 1 1
4341 Ent. faecalis Van B 2 2
6349 Ent. faecium Van A LNZ-R 2 2-----
4 Ent. faecium Van A 1 1
3 Ent. faecium Van A 0,5 0,5
D561 Ent. faecium Van A 2 2
A8 Ent. faecium Van A 0,5 0,5

55

4339 Ent. faeciuVah D 0,25 0,25
4174
997

Ent. gallinarum
Neisseriagonorrhaee

1
0,5

1
0,25
1613 Neisseria meningitidis 0,25 0,25
1016 Propionibacterium acnes 0,03 0,06

ACTIVIDAD BIOLOGICA IN VIVO DEL ANTIBIOTICO 107891

Se usaron hembras de ratOn ICR (Harlan Italia SpA - S. Pietro al
Natisone, Italia) que pesaban 23-25 g en experimentos de infecciOn mortal
5 aguda en ratones inmunocompetentes o neutropØnicos. La neutropenia se
indujo mediante dos administraciones intraperitoneales de ciclofosfamida, 200 y 100 mg/kg, cuatro dias y un dia, respectivamente, antes de que los ratones fueran infectados.
La infección se indujo inoculando intraperitonealmente en ratones
10 inmunocompetentes (8 animales/dosis/ grupo de tratamiento) una suspension
bacteriana de un aislado clinico de estafilococo resistente a metilcilina (Staph. aureus SA3817) o una cepa convencional susceptible a metilcilina (Staph. aureus Smith ATCC19636), o inoculando en ratones neutropØnicos un aislado cilnico de enterococo resistente a glicopØptidos (Ent. faecalis A533). Los
15 desafios bacterianos (aproximadamente 106 cØlulas/ratOn) se dieron suspendidos en 0,5 ml de mucina bacteriologica al 5% (Difco). Los animales no tratados murieron a las 24-72 horas despuØs de la infecciOn. El tratamiento con antibióticos comenzO 10-15 minutos despuØs del desaflo. Se administrO antibiOtico 107891 una vez por via intravenosa o subcutÆnea en diferentes
20 formulaciones acuosas. Se calcularon la dosis de un 50% de eficacia (DE50) y

56

el limite de confianza de un 95% mediante el procedimiento de Spearman-Kärber (D. J. Finney, (1952): "The Spearman- Karber method", en: Statistical methods in biological assay, pÆginas 524-530, Charles Griffin % Co, Ltd, Londres) a partir del porcentaje de animales que sobrevivieron al sØptimo dia.
5 Los resultados se recogen en la siguiente Tabla IX.
El antibiótico 107891 no es tôxico a la dosis maxima probada de 200 mg/kg.

TABLA IX: DE50 del antibiOtico 107891 en infecciones mortales agudas en
10 ratones.

Förniiiiäción Cepa Ruta DE50 mg/kg limites de confianza de[95Y
A MSA iv 2,1 1,7-2,7
sc 2,1 1,7-2,7
A Van iv 3,2 2,7-3,9
sc 11,1 9,2-13,5
B MRSA sc 4,2 3,5-5,1
C Van ic 3,7 2,8-4,9
sc 12,7 10,7-15,0

Form u laciones:

40 A: 10% (volumen/volumen) de DM50, 10% (peso/volumen) de beta
hidroxipropilciclodextrina (Sigma), 80% (volumen/volumen) de glucosa al 5%
15 (peso/volumen) en agua.
B: 10% (volumen/volumen) de DMSO, 40% (volumen/volumen) de PEG 400 en
CH3COOH acuoso 0,1M.

57

C: 50% (volumen/volumen) de PEG 400 en H20.
Cepas:
I. MSSA: Staph. aureus Smith 819 ATCC19636.
II. MRSA: aislado cilnico de Staph. aureus 3817.
5 III. Van A: aislado clinico de Ent. faecalis A533 en ratones neutropØnicos.

BREVE DESCRIPCIONi DE LAS FIGURAS

La Figura IA (espectro de barrido completo de baja resolución) y lB
(espectro de barrido aumentado de alta resolución) representa los espectros de
10 masas del antibiôtico 107891, mostrando un iOn doblemente protonado a m/z
1124yam/z 1116.
La Figura 2 representa el espectro de absorción en el IR del antibiótico
107891 dispersoen KBr.
La Figura 3 representa el espectro UV del antibiOtico 107891 disuelto en
15 metanol:H20.

La Figura 4 representa el espectro de RMN-1H registrado en la mezcla metanol-d4:H20 (HCl pH 4,3) 40:10 (volumen:volumen) a 40°C en un espectrômetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresiôn de agua.
20 La Figura 5 representa el espectro de RMN-13C registrado en Is mezcla metanol-d4:H20 (HCl pH 4,3) 40:10 (volumen:volumen) a 40°C en un espectrómetro Bruker AMX 600.
La Figura 6A (espectro de barrido completo de baja resolución) y 6B
(espectro de barrido aumentado de alta resoluciÆn) represents los espectros de
25 masas del Factor Al del antibiOtico 107891, mostrando jones doblemente

58

protonados [M+2H]2 a m/z 1124.
La Figura 7A (espectro de barrido completo de baja resoluciOn) y 7B (espectro de barrido aumentado de alta resolución) representa los espectros de masas del Factor A2 del antibiOtico 107891, mostrando jones doblemente
5 protonados [M+2H]2 a mlz 1116.
La Figura 8 representa el espectro de RMN-1H del Factor Al del
antibiôtico 107891 registrado en la mezcla CD3CN:D20 (1:1) a 298 K en un espectrômetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua.

10 La Figura 9 representa el espectro de RMN-1H del Factor A2 del antibiôtico 107891 registrado en la mezcla CD3CN:D20 (1:1) a 298 K en un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresiOn de agua.
La Figura 10 representa el espectro de RMN-13C del Factor Al del
15 antibiOtico 107891 registrado en la mezcla CD3CN:D20 (1:1) a 298 K en un
espectrOmetro Bruker AMX 600.
La Figura 11 representa el espectro de RMN-13C del Factor A2 del
antibiótico 107891 registrado en la mezcla CD3CN:D20 (1:1) a 298 K en un espectrÆmetro Bruker AMX 600.
20 La Figura 12 representa el espectro de absorción en el lR del Factor Al del antibiOtico 107891 disperso en KBr.
La Figura 13 representa el espectro UV del Factor Al del del antibiôtico
107891 disuelto en metanol:H20.
La Figura 14 representa el espectro de absorciôn en el IR del Factor A2
25 del antibiótico 107891 disperso en KBr.

59

La Figura 15 representa el espectro UV del Factor A2 del del antibiôtico 107891 disuelto en metanol:H20.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: procedimiento do fermentación de Microbispora sp.

ATCC PTA-5024

Se mantuvo la cepa de Microbispora sp. ATCC PTA-5024 sobre medios
inclinados de harina de avena y agar durante 2-3 semanas a 28°C. El
10 contenido microbiano de un media inclinado se raspó con 5 ml de agua estØril y
se inoculó en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenIan 100 ml de medlo
de siembra (AF/MS) que estÆ compuesto por (gIl): 20 de dextrosa, 2 de extracto de levadura, 8 de harina de semilla de soja, 1 de NaCl y 4 de carbonato de calcio. El media se preparó en agua destilada y el pH se ajustó a
15 7,3 antes de la esterilizaciôn a 121°C durante 20 minutos. Los matraces
inoculados se cultivaron a 28°C en un agitador rotatorio que operaba a 200 rpm. DespuØs de 4-6 dIas, el 5% de este cultivo Se inoculó en una segunda serie de matraces que contenian el mismo medio de feumentación. DespuØs de
72 horas de incubaciOn, se transfirieron 200 ml a un biorreactor de 4 I que
20 conteffla 3 I del mismo media vegetativo.
La fermentaciOn se llevô a cabo a 30°C con agitaciOn de 700 rpm y
aireaciOn de 0,5 vvm. DespuØs de 72 horas, el cultivo (1,5 I) se transfiriO a un biorreactor de 20 I que contenia 15 I del mismo media vegetativo. La fermentaciOn se IlevO a cabo a 30°C durante 48 horas con agitación de 500 rpm
25 y aireación de 0,5 vvm y despuØs se transfiriO al tanque de producción. La

60

producción del antibiOtico 107891 se llevó a cabo en un fermentador de 300 I que contenia 200 I del medio de producciôn M8 compuesto por (gIl): 20 de almidôn, 10 de glucosa, 2 de extracto de levadura, 4 de caseina hidrolizada, 2 de extracto de carne y 3 de carbonato de calcio. El medio se preparó en agua
5 desionizada y el pH se ajustô a 7,2 antes de esterilización a 121°C durante 25
minutos. DespuØs de enfriar, se inoculó el fermentador con aproximadamente
14 1(7%) de precultivo. Se puso en marcha el fermentador a 29°C con agitación
de 180 rpm y aireación de 0,6 vvm con una presión en la parte superior de 36 kPa. Se recuperó el contenido del fermentador despuØs de 98 horas de
10 fermentaciÆn.

15

La producciôn del antibiótico 107891 se siguiO por HPLC tal y como se describe previamente, despuØs de la extracciôn de la totalidad del caldo de cultivo con el mismo volumen de metanol. La extracción se Ilevô a cabo a teniperatura ambiente despuØs de agitar durante 1 hora.

Ejemplo 2: procedimiento alternativo de fermentaciOn de Microbispora sp. ATCC PTA-5024
Se inoculO Microbispora sp. ATCC PTA-5024 en matraces Erlenmeyer
de 500 ml que contenian 100 ml de medio de crecimiento (Gi) compuesto por
20 gIl: 10 de glucosa, 10 de maltosa, 10 de aceite de semilla de soja, 8 de harina
de semilla de soja, 2 de extracto de levadura y 4 de carbonato de calcio. El medio se preparó en aqua desionizada y se esterilizO a 120°C durante 20 minutos sin ajuste de pH. Los matraces inoculados se incubaron durante 120-
168 horas a 28°C con agitación de 200 rpm hasta que se observÆ un buen
25 crecimiento. Los matraces se usaron entonces Para inocular (3%) un

61

biorreactor de 4 I que contenIa 3 I de medio de siembra AF/MS, el cual estÆ compuesto tal y como se describe en el Ejemplo 1. DespuØs de 120 horas de fermentación a 30°C, agitaciOn de 700 rpm y aireaciôn de 0,5 vvm, se transfirieron 1,5 I del cultivo a un biorreactor de 20 I que contenia 15 I del
5 mismo medio vegetativo. La fermentaciOn se Ilevô a cabo durante 96 horas a
30°C con agitaciôn de 600 rpm y aireación de 0,5 vvm, y despuØs se transfiriO
at tanque de produccion.
La producciOn del antibiótico 107891 se Ilevô a cabo en un fermentador
de 300 I que contenia 200 I del medio productivo (V6) compuesto por (gIl): 20
10 de dextrosa, 5 de extracto de levadura, 5 de extracto de came, 3 de caseina
. hidrolizada, 5 de peptona y 1,5 de NaCI. El medio se preparO en agua y se
ajustó a un pH de 7,5 con NaOH, y se esterilizO a 121°C durante 20 minutos.
El fermentador se inoculO con 14 I de cultivo de siembra (7%) y la
fermentaciôn se llevô a cabo a 29°C, se agitO a 180 rpm, se aireó con 100 I de
15 aire convencional por minuto (0,5 vvm). La producciôn del antibiOtico 107891 se
siguiO P01 HPLC tal y como se describe previamente. La fermentación se
recuperó despuØs de aproximadamente 160 horas.

Ejemplo 3: recuperación del antibiótico 107891
20 El caldo de fermentaciôn descrito en el Ejemplo 1 se filtró mediante un sistema de filtración tangencial (membrana con un tamano de poro de 0,1 pm, Koch Carbo-Cor, Koch Wilmington, EE.UtJ.) para obtener 170 I de sobrenadante y 30 I de micelio concentrado. El complejo de antibiOtico 107891
se encontró en el filtrado (A) y en el micelio (B).
25 (A) el caldo filtrado se agito una noche a temperatura ambiente en presencia de

62

resina poliestirØnica Diaion HP-20 (4 I). Se recuperO entonces la resina, se IavO con 10 I de metanol:agua 4:6 (volumen/volumen) y se eluyO por lotes inicialmente con 10 I de metanol:agua 9:1 (volumen/volumen) y despuØs con 10
I de metanol:butanol:agua 9:1:1 (volumen/volumen). Las fracciones eluidas
5 agrupadas que contenian el antibiôtico 107891 se concentraron hasta un
pequeæo volumen en un evaporador rotatorio y despuØs se secaron por congelación dando 32 g de material bruto. Este material bruto se disolvió en n-butanol (1 I) y despuØs se extrajo tres veces de forma secuencial con 800 ml de agua. La fase orgànica se concentró a presión reducida hasta un residuo
10 oleoso, el cual se disolviO en metanol. Tras adiciôn de Øter de petrOleo se
obtuvieron 5 g de preparación bruta de antibiôtico por precipitación.
(B) DespuØs de adiciOn de 25 I de metanol, la porciOn retenida que contenia el micello se agitó durarite 1 hora y se filtró para obtener 45 I de extracto de micello. Esta soluciôn se diluyó entonces con aqua (20 I) y se agitó una noche
15 a temperatura ambiente con resina poliestirØnica Diaion HP-20 (1 I). Se
recuperó entonces la resina, se lavO con 2 I de metanol:agua 40:60 (volumen/volumen) se eluyó por lotes secuencialmente con 3 I de metanol:agua 85:15 (volumen/volumen) despuØs con 2 I de metanol:agua 90:10 (volumen/volumen). Las fracciones eluidas se siguieron paradetectar la
20 presencia de antibiOtico 107891 por ensayo de difusiÆn en agar en
Staphylococcus aureus y por procedimiento analitico por HPLC tal y como se recoge previamente.
Las fracciones eluidas que contenian el antibiótico 107891 fueron
agrupadas, concentradas a presión reducida y secadas por congelaciôn, dando
25 8,1 g de antibiótico 107891 bruto.

63

Ejemplo 4: recuperación alternativa del antibiótico 107891
El caldo recuperado del tanque de fermentaciôn de 200 I descrito en el
Ejemplo 2 se llevO hasta pH 6,8 y el caldo se filtró por filtración tangencial
5 (membrana con un tamaæode poro de 0,1 pm, Koch Carbo-Cor). El permeado
(180 I) se agitO por lotes durante una noche a temperatura ambiente con 2 I de resina Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical) y entonces se recuperÆ laresina.
Se aæadió metanol (25 I) a la porciôn retenida en el equipo de filtraciôn
tangencial (aproximadamente 20 I) que contenha el micelio concentrado. Esta
10 suspensiOn Se agitO durante 1 hora y despuØs Se filtrO con el sistema de
microfiltraciôn hasta un volumen de parte retenida residual de aproximadamente 20 I. Se aæadiô entonces mÆs metanol (25 I) y se repitió el procedimiento anterior de forma secuencial durante un total de cinco ciclos. Los extractos agrupados de metanol (aproximadamente 125 I) se diluyeron con 160
15 litros de agua desmineralizada y se agitaron por lotes durante una noche a
temperatura ambiente con 3 I de resina Diaion HP-20. Entonces se recuperó la resina y se agrupO con la resina Diaion HP-20 usada para extraer el caldo permeado segÆn el procedimiento anteriormente descrito. La resina agrupada
se IavO en una columna cromatogrªfica con 20 I de agua:metanol 6:4
20 (volumen/volumen). El antibiôtico 107891 se eluyO con 23 I de metanol:tampOn
formiato de amonio 50 mM a pH 3,5:n-butanol 9:1:1 (volumen/volumen). Este eluato se concentró entonces a vaclo hasta un volumen final de 3 I. La soluciôn concentrada se cargO entonces a pH 4,5 sobre una columna de 2,5 I de poliamida CC 6 de 0,1-0,3 mm (Macherey-Nagel) acondicionada con
25 agua:metanol 7:3 (volumen/volumen). La columna se lava con agua:metanol

N\?

7:3 (volumen/volumen) y despuOs con tampon formiato de amonio 25 mM a pH 3,5:metanol 7:3 (volumen/volumen). El antibiôtico Se eluyó con agua:metanol 3:7 (volumen/volumen) y despuØs con una mezcla agua:metanol 1:9 (volumen/volumen). La eluciOn se completó con tampon formiato de amonio 25
5 mM a pH 2,8:metanol en la relaciôn 1:9 (volumen/volumen), Los eluatos que
contenlan el antibiOtico 107891 se agruparon y se concentraron a vaclo hasta
un volumen final de 1 I. El pH de la solución concentrada se llevó de 4 a 5,7 con hidrOxido de amonio 7 M y despuØs la mezcla se centrifugó para recuperar
el precipitado. Este sólido Se suspendió en agua y se secO por congelacian
10 dando 6,96 g de preparación del antibiótico 107891.

Ejemplo 5: purificación del antibiótico 107891
El antibiótico 107891 bruto (3,6 g), preparado y como se ha descilto en
el Ejemplo 3, se purificó por cromatografia a presiOn media sobre 100 g de C8
15 de fase inversa (EC) con tamaæo departicula de 40-70 pm y tamano de poro
60A, 1ST (tecnologia internacional de sorbentes (International Sorbent Technology, Mid-Glamorgan, Reino Unido) usando un sistema de cromatografla de presión media Büchi B-680 (BUchi laboratoriums-technik AG, Flawil, Suiza) equipado con un formador de gradiente B-687, un colector de
20 fracciones B-684 y una columna de vidrio B-685 de 70 x 460 mm. La resina fue
acondicionada previamente con una mezcla de fase A:fase B 8:2 (volumen/volumen) y se eluyô entonces a razOn de 25 mI/minuto con un gradiente lineal de 60 minutos desde un 20% hasta un 60% de fase B en 60 minutos.
25 La fase A era acetonitrilo:tampOn formiato de amonio 20 mM (pH 6,6)

65

10:90 (volumen/volumen); y la fase B era acetonitrilo:tampOn formiato de amonio 20 mM (pH 6,6) 90:10 (volumen/volumen).
Las fracciones que contenian el antibiôtico 107891 fueron agrupadas, concentradas a vaclo y liofilizadas dos veces a partir de agua dando 430 mg de
5 antibiOtico 107891 purificado.

Ejemplo 6: purificación del antibiótico 107891 por HPLC preparativa
El antibiótico 107891 se purificó adicionalmente por HPLC preparativa
sobre una columna Hibar pre-empaquetada lichrosorb RP8 (tamaæo de
10 particula 7 pm) RT de 250-25 mm, Merck, usando una elución por gradiente
lineal durante 25 minutos desde un 30% hasta un 45% de fase B a razón de un
flujo de 30 mI/minuto, La fase A era tampon formiato de amonio 25 mM a pH 4,5:acetonitrilo 95:5 (volumen/volumen) y la fase B era acetonitrilo.
Se disolviO una muestra de antibiótico 107891 del Ejemplo 5 (300 mg) en
15 1,5 ml 350 p1 de DMSO:Æcido fórmico 95:5 (volumen/volumen) y se procesaron
300 p1 por ciclo cromatogràfico. El antibiOtico 107891 se eluyO tIpicamente en 15-16 minutos. Se agruparon las fracciones eluidas de 5 ciclos cromatogrÆficos que contenian el antibiótico 107891 y se concentraron a vaclo. La soluciOn residual se liofilizO tres veces a partir de agua de forma secuencial, dando 31
20 mg de antibiOtico 107891 en forma de un polvo blanco.

Ejemplo 7: separación y purificación por separado de los Factores
Al y A2 del antibiótico 107891
Los Factores Al y A2 se separaron y purificaron del complejo de
25 antibiOtico 107891 del Ejemplo 5 por HPLC preparativa sobre una columna C18

66

Symmetry Prep. (tamaæo departIcula 7 pm) de 7,8 x 300 mm Waters (Mildfold, EE.UU.) usando dos programas de elución diferentes.
(A) El Factor Al Se purificó mediante una eluciOn en grad iente lineal durante 25 minutos desde un 30% hasta un 45% de fase B con un flujo de 3,5 ml. La fase
5 A era tampon formiato de amonio 25 mM a pH 4,5:acetonitrilo 95:5
(volumen/volumen) y la fase B era acetonitrilo. El complejo de antibiOtico 107891 purificado (15 mg) se disolviO en 350 p1 de DMSO:Æcido fôrmico 95:5 (volumen/volumen) y se procesO por ciclo cromatogrÆfico. Los Factores Al y
A2 se eluyeron tIpicamente en un marco de tiempo de 11-13 minutos. Las
10 fracciones eluidas se analizaron entonces por HPLC en las condiciones
analiticas descritas anteriormente. Las fracciones de 14 ciclos cromatogrÆficos que contenIan Factor Al del antibiótico 107891 puro fueron agrupadas y concentradas a vacIo. La soluciOn residual se liofilizO tres veces a partir de agua de forma secuencial dando 15 mg de Factor Al puro en forma de un
15 polvoblanco.
(B) El Factor A2 se purificO por eluciOn isocrÆtica a razOn de un flujo de 7 ml
con tampOn formiato de amonio 100 mM a pH 4:acetonitrilo 82,5:17,5 (volumen/volumen). El complejo purificado de antibiOtico 107891 (5 mg) se disolviO en 250 p1 de una mezcla de ÆcidoacØtico:acetonitrilo:tampón formiato
20 de amonio 100 mM a pH 4 50:120:80 (volumen/volumen) y se procesO por ciclo
cromatogrÆfico. Los Factores Al y A2 se eluyeron tipicamente en un marco de tiempo de 9-10 minutos. Las fracciones eluidas se analizaron entonces por HPLC en las condiciones analiticas descritas anteriormente. Las fracciones de
20 ciclos cromatogrÆficos quecontenlan Factor A2 del antibiOtico 107891 puro
25 fueron agrupadas y concentradas a vaclo. La soluciôn residual se liofilizO dos

5

Habiendo descrito la invenciOn corno antecede, se declara corno propiedad to contenido en las siguientes

:1 IYA I I’)[stS1 [I] L, I*

1. Un compuesto de fOrmula

1 _CH

0 C4 CI4
Nil

en la que X se selecciona del grupo constituido por H, F, Cl, Br y I;
en la que Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5 se seleccionan independientemente del
10 grupo constituido por S, S-0, S=O, 0 -S=O y O=S=O; y
en la que R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, OH, alquilo y arilo.

2. El compuesto de la reivindicaciOn 1, en el que X es Cl, Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5
15 son S, R2 es OH y R1, R3, R4, R5, R6, R7 yR8 son H.

3. El compuesto de la reivindicaciOn 1, en el que X es Cl, Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5
son S, R1 es OH, R2 es OH y R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son H.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R4, R5, R6, R7 y R8 son H.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R1 es H, R2 es H y R3 es

5 H.

6. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R1 es H, R2 es H y R3 es

OH.

10 7. El compuesto de la Reivindicación 4, en el que R1 es H, R2 es OH y R3

es OH.

15

8. El compuesto de la reivindicaciôn 4, en el que R1 es OH, R2 es OH y R3

es OR

9. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R1 es OH, R2 es H y R3 es

H.

10. El compuesto de Ia reivindicación 4, en el que k1 es OH, R2 es H y R3 es

20 OR

11. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y1 se selecciona del grupo
constituido por S-O, S=O, 0 -S=O y O=SO, e Y2, Y3, Y4 e Y5 son S.

25 12. El compuesto de la reivindicaciôn 1, en el que Y2 se selecciona del grupo

70

constituido por S-0, S=O, 0 -S=O y O=S=O, e Y1, Y3, Y4 e Y5 son S.

13. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y3 se selecciona del grupo
constituido por S-0, 5=0, 0 -S=O y 0=5=0, e Y1, Y2, Y4 e Y5 son S.

14. El compuesto de la reivindicaciôn 1, en el que Y4 se selecciona del grupo
constituido por S-0, S=0, 0-S=0 y 0=S=0, e Y1, Y2, Y3 e Y5 son S.

15. El compuesto de la reivindicaciôn 1, en el que Y5 se selecciona del grupo
10 constituido por S-0, S=0, 0-S=0 y 0=S=0, e Y1, Y2, Y3 e Y4 son S.

16. Un compuesto de formula

CH CH3
yN
0

15 17. Un compuesto defórmula

71

0

18. El complejo del antibiótico 107891 que comprende el Factor Al y el Factor A2, siendo un polvo blanco que tiene las siguientes caracteristicas:
5 (A) espectro de masas registrado a partir de una solución de
0,2 mg/ml en metanol/agua 80/20 (volumen/volumen) con Æcido
trifluoroacØtico al 0,1% en un instrumento Thermofinniçjan LCQ deca
equipado con una fuente de electronebulizaciôn, usando una mezcla de
calibrado en las siguientes condiciones de electronebulizaciOn: voltaje de
10 nebulización: 4,7 kV; temperatura capilar: 220°C; voltaje del capilar: 3 V; modo de infusion: 10 pI/minuto, mostrando dos iones doblemente protonados a m/z = 1124 y a m/z = 1116 correspond ientes a la composiciOn isotOpica mÆs baja de los Factores Al y A2 respectivamente;
15 (B) espectro en el infrarrojo registrado en K13r con un
espectrofotómetro Bruker de IR-TF modelo IFS 48, mostrando maxima
absorción a (cm-’)- 3263; 2929; 1661; 1533; 1402; 1114; 1026;
(C) espectro en el UV Ilevado a cabo en metanol/H20 80:20

72

(volumen/volumen) con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 16, mostrando dos hombros a 226 y 267 nm;
(D) espectro de RMN-1H registrado a 600 MHz en la mezcla
metanol d4-H20 (pH 4,3 HCI) 40:10 (volumen/volumen) a 40°C en un
5 espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión
de agua usando como patron interno la senal residual de metanol-d4 a
3,31 ppm, mostrando las siguientes seæales: [6 = ppm, multiplicidad; (atribuciOn)]: 0,93 d (CH3), 0,98 d (CH3), 1,07 t (CH3 solapados), 1,18 t
(CF-I3 solapados), 1,26 s (CH3), 1,30 t (CH3 solapados), 1,62-1,74 m
10 (CH2), 1,78 d (CH3), 1,80 d (CH3), 2,03 m (CH2), 2,24 m (CH), 2,36 m
(CH2), 2,72-3,8 m (CH alfa peptidicos), 3,8-5,2 m (CH alfa peptidicos),
5,53-6,08 s (CH2), 5,62 d (CH en el doble), 6,42 m (CH), 6,92 d (CH en
el doble enlace), 7,0-7,55 m (CH aromÆticos), 7,62-10,4 d y m (NH aromÆticosy peptidicos);
15 (E) espectro de RMN-13C registrado en la mezcla metanol
d4:H20 (pH 4,3 HCI) 40:10 (volumen/volumen) a 40°C en un espectrómetro Bruker AMX 600 usando como patrOn interno la seæal
residual de metanol d4 a 49,15 ppm, mostrando las siguientes seæales:
[6 = ppm; (atribuciOn)]: 13,6-23,2 (CH3 alifÆticos), 26,16-73 (CH2
20 alifÆticos y CH alfa peptidicos), 105-136 (CH aromàticos y de dobles
enlaces y carbonos cuaternarios), 164,3-176,3 (carbinoles petidicos);
(F) el hidrolizado de Æcido en àcido metanosulfOnico 6 N
(105°C, 24 horas) mostrando la presencia de los siguientes aminoÆcidos,
junto con otros picos no identificados, despuØs de la derivatización con
25 carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo: lantionina,

73

metillantionina, glicina, prolina, valina, Æcido aspÆrtico (producto de hidrólisis de la asparagina), fenilalanina y leucina;
(G) el hidrolizado de Æcido en Æcido metanosulfOnico 4 N que
contiene3-(2-aminoetil)-indol al 0,2% (peso/volumen) como catalizador
5 (115°C, 16 horas) mostrando la presencia de 5-clorotript6fano; y
(H) una funciÆn ionizable basica detectadapor valoración
Æcido/base Ilevada a cabo con hidrOxido de potasio 0,01 N en 2-metoxietanol (MCS):H20 12:3 (volumen/volumen) que contiene un exceso molar de Æcido clorhidrico 0,01 N.
10

19. El Factor Al del antibiOtico 107891, siendo un polvo blanco que tiene las
siguientes caracterIsticas:
(A) un iOn doblemente protonado a m/z = 1124 correspondiente
a la composición mÆs baja de isOtopos en el espectro de masas
15 registrado a partir de una soluciOn de 0,1 mg/ml en acetonitrilo:agua
50:50 (volumen/volumen) con Æcido acØtico al 0,5% un instrumento Thermofinnigan LCQ deca equipado con una fuente de electronebulizaciôn, usando una mezcla de calibrado Thermofinnigan
con las siguientes condiciones de electronebulización: voltaje de
20 nebulización: 4,7 kV; temperatura capilar: 250°C; voltaje del capilar: 8 V;
modo de infusiOn: 10 pI/minuto;
(B) la masa exacta de antibiOtico determinada usando un
espectrómetro Bruker Daltonics APEX II, de 4,7 Teslas equipado con
una fuente de electronebulización, al que corresponde un peso
25 molecular de 2246,71 – 0,06, masa monoisotôpica calculada a partir de

O1IT
74

[M+2H]2 a mlz 1124,36124 (30 ppm exactas);
(C) cuando se disuelve en CD3CN:D20 (1:1), el espectro de
RMN-1H muestra los siguientes grupos de seæales (en ppm)a 600 MHz
usando CD3CN como patron interno (1,94 ppm), [6 = ppm, multiplicidad;
5 (atribuciôn)]: 0,84 d (CH3), 0,89 d (CH3), 0,94 t (CH3 solapados), 1,1 d
(CH3), 1,13 d (CH3), 1,15 t (CH3 solapados), 1,49 m (CH2), 1,69 d (OH3),
1,75 m (CH2), 2,11 m (CH), 2,26 m (CH), 2,5 m (CH2), 2,68 - 3,8 m (CH peptidicos), 3,8 - 5,0 m (CH, peptidicos), 5,45 - 6,17 s (CH2), 5,58 d (CH
en el doble enlace), 6,36 m (CH), 6,86 d (CH en el doble enlace), 7,0 -
10 7,45 m (CH aromÆticos);
(D) cuando se disuelve en CD3CN-D20 (1:1), el espectro de
RMN-1H muestra los siguientes grupos de seæales (en ppm) a 600 MHz
usando CD3CN como patrOn interno (1,39 ppm), [6 = ppm; (atribuciOn)]r
13,6 - 23,03 (CH3 alifâticos), 25,69 - 77,9 (CH2 alifÆticos y CH
15 peptidicos), 105 - 137,3 (OH aromÆticos yen dobles enlacesy carbonos
cuatenarios), 165,6 176,6 (carbinoles peptidicos);
(E) el espectro en el infrarrojo registrado en KBr con un
espectrofotOmetro Bruker FT-lR modelo IFS 48 muestra una absorciÆn
maxima a (cm-’)- 3294; 3059; 2926; 1661; 1529; 1433; 1407; 1287;
20 1114;1021-1
(F) El espectro en el UV registrado en metanol:H20 en
proporción 80:20 con un espectrofotOmetro Perkin Elmer Lambda 16
muestra dos hombros a 226 y a 267 nm;
(G) el hidrolizado de Æcido en HOl 6 N (105°C, 24 horas),
25 mostrando la presencia de los siguientes aminoàcidos, junto con otros

75

picos no identificados, despuØs de la derivatización con carbamato de 6-aminoquinolll-N-hidroxisuccinimid ilo: lantionina, metillantionina, glicina,
prolina, valina, Æcido aspÆrtico(producto de hidrólisis de la asparagina), fenilalanina y leucina; y
5 (H) el hidrolizado de Æcido en Æcido metanosulfônico 4 N
conteniendo como catalizador 3-(2-aminoetil)indol al 0,2% (peso/volumen) (115°C, 16 horas), mostrando la presencia de 5-clorotript6fano,

10 20. El Factor A2 del antibiótico 107891, siendo un polvo blanco que tiene las
siguientes caracterIsticas:
(A) un ion doblemente protonado a mlz = 1116 correspondiente
a la composición ms baja de isOtopos en el espectro de masas registrado a partir de una soluciÆn de 0,1 mg/ml en acetonitrilo:agua
15 50:50 (volumen/volumen) con àcido acØtico al 0,5% en un instrumento
Thermofinnigan LCQ deca equipado con una fuente de electronebulizaciôn, usando una mezcla de calibrado Thermofinnigan
con las siguientes condiciones de electronebulizaciOn: voltaje de nebulización: 4,7 kV; temperatura capilar: 250°C; voltaje del capilar: 8 V;
20 modo de infusiOn: 10 pl/minuto;
(B) la masa exacta de antibiótico determinada usando un
espectrómetro Bruker Daltonics APEX II, de 4,7 Teslas equipado con una fuente de electronebulizaciOn, al que corresponde un peso molecular de 2230,71 – 0,06, masa monoisotOpica calculada a partir de
25 [M+2H]2 a m/z 1116,36260 (30 ppm exactas);

76

(C) cuando se disuelve en CD3CN:D20 (1:1), el espectro de
RMN-11-1 muestra las siguientes seæales (en ppm) a 600 MHz usando
CD3CN como patron interno (1,94 ppm), [6 = ppm, multiplicidad; (atribucion)]: 0,84 d (CH3), 0,88 d (CH3), 0,94 d (CH3 solapados), 1,06 d
5 (CH3), 114 d (CH3), 1,48 m (CH2), 1,65-1,75 m (CH2), 1,67 d (CH3), 2,15
m (CH), 2,25 m (CH), 2,5 m (CH2), 2,77 - 3,8 m (CHp peptidicos), 3,8 -
4,9 m (CHQ peptidicos), 5,45 - 6,14 s (CH2), 5,59 d (CH en el doble
enlace), 6,34 m (CH), 6,84 d (CH en el doble enlace), 7,0 - 7,42 m (CH aromàticos);
10 (D) cuando se disuelve en CD3CN:D20 (1:1), el espectro de
RMN-1H muestra los siguientes grupos de senales (en ppm) a 600 MHz
usando CD3CN como patron interno (1,39 ppm), [6 = ppm; (atribución)]:
13,6 - 22,9 (CH3 alifÆticos), 25,65 - 73 (CH2 alifÆticosy CH,, peptidicos),
105 - 137,3 (CH aromÆticos y en dobles enlaces y carbonos
15 cuatenarios), 165,7 - 176,1 (carbinoles peptidicos);
(E) el espectro en el infrarrojo registrado en KBr con un
espectrofotOmetro Bruker de IR-TF modelo IFS 48 muestra una
absorción maxima a (cm-): 3296; 3060; 2928; 1661; 1529; 1433; 1407;
1288; 1116;
20 (F) El espectro en el UV registrado en metanol:H20 80:20
(volumen/volumen) con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 16
muestra dos hombros a 226 y a 267 nm;
(G) el hidrolizado de Æcido en HCI 6 N (105°C, 24 horas),
mostrando la presencia de los siguientes aminoÆcidos, junto con otros
25 picos no identificados, despuOs de la derivatizaciôn con carbamato de 6-

77

aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo: lantionina, metillantionina, glicina,
prolina, valina, âcido aspÆrtico (estudios de RMN indican que es un
producto de transformaciôn de la asparagina, la cual genera Æcido
aspÆrtico por hidrólisis), fenilalanina y leucina; y
5 (H) el hidrolizado de âcido en Æcido metanosulfónico 4 N conteniendo como catalizador 3-(2-aminoetil)indol al 0,2% (peso/volumen) (115°C, 16 horas), mostrando la presencia de 5-clorotript6fano.

10 21. Un procedimiento para producir antibiôtico 107891 y sus Factores Al y
A2 y las sales de los mismos con Æcidos que comprendelas etapas de:
cultivar Microbispora sp. ATCC PTA-5024 o una de sus variantes
o mutantes, manteniendo la capacidad de producir dicho antibiOtico, en condiciones aerôbicas, en un medio acuoso nutriente que contiene una
15 fuente asimilable de carbono, nitrôgeno y sales inorgÆnicas;
aislar el antibiótico resultante del micelio y/o del caldo de
fermentación filtrado; y
purificar el antibiôtico 107891 aislado.

20 22. El procedimiento segün la reivindicación 21, en el que se cultivan
previamente la cepa Microbispora sp. ATCC PTA-5024 o el antibiótico 107891
que produce una de sus variantes o mutantes.

23. El procedimiento segOn la reivindicación 21, en el que el aislamiento del
25 antibiótico 107891 se Ileva a cabo filtrando el caldo de fermentaciôn y se

78

recupera ci antibiOtico del caldo de fermentaciôn filtrado segOn una tOcnica seleccionada del grupo constituido por extracción con un disolvente inmiscible en agua, precipitaciôn aæadiendo un no disolvente o cambiando el pH de la solucion, cromatografla de absorciôn, cromatografia de reparto, cromatografia
5 de reparto en fase inversa, cromatografia de intercambio iOnico, cromatografia
de exclusion molecular, y una combinación de dos o mÆsde dichas tØcnicas.

24. El procedimiento segUn la reivindicación 21, en Ci que el aislamiento del
antibiótico 107891 se Ileva a cabo separando el micelio del sobrenadante del
10 caldo de fermentaciOn y ci micelio Se extrae con un disolvente miscible en
agua, por lo cual, despuØs de la retirada del micelio gastado, se obtiene una solución miscible en agua que contiene el antibiótico bruto, el cual se puede procesar P01 separado o juntÆndolocon el caldo de fermentaciOn filtrado Para recuperar el antibiótico 107891 por medio de una tØcnica seleccionada del
15 grupo constituido por extracciOn con un disolvente, precipitaciOn aæadiendo un

20

no disolvente o cambiando el pH de la soluciOn, cromatografia de absorción, cromatografia de reparto, cromatografia de reparto en fase inversa, cromatografla de intercambio iónico, cromatografla de exclusion molecular, y una combinaciOn de dos o mÆsde dichas tØcnicas.

25. El procedimiento segün la reivindicación 24, en el que la concentraciOn
del disolvente miscible en agua en el extracto de micelio se reduce antes de ser procesado Para recuperar ci antibiótico a partir del mismo.

25 26. El procedimiento segUn la reivindicaciOn 23, en el que el caldo de

79

fermentaciôn fHtrado se pone en contacto con una resina de absorción, y dicha resina Se eluye con un disolvente polar miscible en aqua o una mezcla del mismo con agua, por Jo cual Se obtiene una soluciOn que contiene el antibiôtico 107891 bruto.
5

27. El procedimiento segUn la reivindicación 26, en el que la resina de
absorciôn se selecciona del grupo constituido por una resina de poliestireno, de una mezcla de poliestireno y divinilbenceno y de poliamida.

10 28. El procedimiento segün la reivindicaciOn 24, en el que el micelio se

15

extrae con un alcanol C -C3, y el extracto miceliar se pone en contacto con una resina de absorciOn y se eluye de la misma con un disolvente polar miscible en agua o una mezcla del mismo con aqua, por lo cual se obtiene una soluciOn que contiene el antibiôtico 107891 bruto,

29. El procedimiento segUn la reivindicaciOn 23, en el que las soluciones que
contienen el antibiOtico 107891 bruto se agrupan y procesan para purificación adicional de dicho antibiótico 107891.

20 30. El procedimiento segUn la reivindicación 26, en el que la soluciOn que
contiene el antibiOtico 107981 bruto se concentra y despuØs se seca par congelacion para dar el antibiOtico 107891 bruto en forma de un producto

25 31. El procedimiento segOn la reivindicación 26, en el que se agrupan las

80

resinas de absorciOn que contienen el antibiôtico absorbido, y su mezcla se &uye con un disolvente polar miscible en agua o con una mezcla del mismo con agua.

5 32. El procedimiento segUn la reivindicación 21, en el que el antibiótico
107981 se purifica por medio de un procedimiento cromatogràfico, preferiblemente por HPLC preparativa o cromatografia de presión media.

33. El procedimiento seg(in la reivindicación 21, en el que el Factor Al y el
10 Factor A2 se separan por HPLC preparativa a partir del antibiôtico 107891
purificado.

34. Una composiciôn farmacØutica que comprende un antibiótico seleccionado del antibiôtico 107891, Factor Al del antibiótico 107891, Factor
15 A2 del antibiôtico 107891 y una mezcla de dichos Factores en cualquier
proporciOn o una sal farmacØuticamente aceptable de los mismos con un âcido.

20

35. La composición farmacØutica segOn la reivindicación 28, comprendiendo
ademÆs un vehIculo farmacØuticamente aceptable.

36. El antibiótico 107891, su Factor Al, su Factor A2 o una mezcla de
dichos Factores en cualquier proporción o una sal farmacØuticamente aceptable de los mismos con un Æcido para uso como medicamento.

25 37. Uso del antibiótico 107891, de su Factor Al, de su Factor A2 0 de una

5

81

mezcla de dichos Factores en cualquier proporción o una sal farmacØuticamente aceptable de los mismos con un Æcido para la fabricación
de un medicamento para el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas.

38. Uso del antibiótico 107891, de su Factor Al, de su Factor A2 o de una mezcla de dichos Factores en cualquier proporción y una sal no tóxica de los mismos con un Æcido como promotor de crecimiento en animales.

10 39. Un cultivo biologicamente puro de la cepa Microbispora sp. ATCC PTA-5024 o una de sus variantes o mutantes, que mantiene la capacidad de producir antibiOtico 107891 cuando se cultivan sumergidas en condiciones aerÆbicas en presencia de fuentes asimilables de carbono, nitrôgeno y sales inorgÆnicas.
15

[I

82

I:1Mill

La invenciôn se refiere a una sustancia antibiótica de origen microbiano denominada arbitrariamente antibiôtico 107891, la cual se produce por fermentación de Microbispora sp. ATCC PTA-5024, sales y composiciones
5 farmacØuticamente aceptables de la misma y su uso como agente antibacteriano teniendo actividad inhibidora frente a microbios susceptibles. El antibiOtico 107891, el cual es un complejo que comprende dos Factores denominados Factores Al y A2, tiene una estructura peptidica que contiene lantionina y metillantionina como constituyentes que son caracterIsticas tipicas
10 de los antibióticos del grupo Iantibióticos. El antibiótico 107891 y sus Factores Al y A2 muestran una buena actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-IIW

positivas, incluyendo cepas resistentes a metilcilina y a vancomicina, y tambiØn son activos frente a algunas bacterias Gram-negativas como por ejemplo M. catharralis, la especie Neisseria y H. influenzae y Micobacteria.

PATENT COOPERATION TREATY

Ll

From the
UN! r,.tcjNp,j IUINAL t’KuLUViItNAKY tAAMININU AU i tiL)tU i Y To:
GROVER F. FULLER JR .’
CIO JACKIE LAWRENCE
PFIZER., INC.
MS8260-1615, EASTERN POINT ROAD
GROTON, CI 06340

Applicant’s or agent’s file reference

PC 19463A

International application No.

PCT/US05/02733

Applicant

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

- (Chapter II ofthe Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 71.1)
[Date
(day/month/year)

ofmailing
tj

INIORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year) J Priority date (day/month/year)

27 January 2005 (27,0 1,

VICURON PHARMACEUTICALS, INC.

26 January 2004 (26.0

I. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the
international preliminary report on patentability and its annexes, if any, estab!shed on the irteinational
application.

2. A copy ofthe report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to
all the elected Offices.

3. Where required by any ofthe elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation ofthe
report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing

translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/[B/30 1).
Where a translation ofthe international application must be furnished to an elected Office, that translation must

contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant’s responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.
For further details on the applicable time limits and requirements ofthe elected Offices, see Volume II ofthe PCT
Applicant Guide.

40 The applicant’s attention is drawn to Article 33(5) which provides that the criteria ofnovelty, inventive step and
industrial applicability described in Article 3 3(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary

examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria
may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and
support for the claims.
Name and mailing address ofthe [PEA/ US
Mail Stop PC Attn: IPEA/LJS
Commissioner for Patents Andrew. Kosar
P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450 Telephone No. (571) 272.1600 [jsimile No. (571) 273-3201
Form PCTIIPEAJ416 (January 2004)

EI

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II ofthe Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant’s or agent’s file reference
FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEAI4I6
PC 19463A

International application No. International filing date (day/monthijiear) Priority date (day/month/year)
PCT/US05/02733 27 January 2005 (27.01.2005) 26 January 2004 (26.01.2004)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC
IPC: C07K 1114(2006,01),14/195(2006.01);Cl2P 1/04(2006.01);A6IK 38/16(2006.01)
USPC: 530/300,317,324,326;514/2,9,13
Applicant
VICURON PHARMACEUTICALS, INC.

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary
Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.

2, This REPORT consists of a total ofAsheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising

a. LI (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of J4 sheets, as follows:
[]sheets ofthe description, claims and/or drawings which have been amended and are the b’sis of
this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (See Rule 70.16
and Section 607 ofthe Administrative Instructions).
sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment
that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of
Box No. I and the Supplemental Box.

b. [II] (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s))

containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the

Administrative Instructions).
4. This report contains indications relating to the following items:
Box No. I Basis ofthe report
Box No. U Priority

Box No. III Non-establishment ofopinion with regard to novelty, inventive step and industrial
applicability
LIBox No. IV Lack ofunity ofinvention

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or
industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
LIBox No, VI Certain documents cited

LIBox No. VU Certain defects in the international application
LIBox No. VIII Certain observations on the international application
Date ofsubmission ofthe demand Date of completion ofthis report

26 February 2006 (26.02.2006) 11 October 2006 (11,10,2006)
Name and mailing address ofthe lpEAiUs

Mail Stop PCT, Attn: IPEA/TJS Zw4DKosar Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No, (571) 273-3201 relephona No. (571) 272.1600
rorm ru 1/1IV01 (cover stleet)(Apnl UU)

International application No.
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
PCT/US05/02733

Box No. I Basis of the report -A4
1. With regard to the language, this report is based on:

D the international application in the language in which it was filed.

Da translation ofthe international application into , which is the language of a translation furnished for the
purposes of

C] international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
[] publication ofthe international application (under Rule 12.4(a))

EJ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2, With regard to the elements ofthe international application, this report is based on (replacement sheets which have beenfurnished to the receiving Office in response to an tnvitation underArtick 14 are referred to in this report as "originallyfiled" and are not annexed to this repoti):

the international application as originally tiled/furnished
the description:
pages 1-52 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on
pages* NONE received by this Authority on
Z the claims:
pages 3 as originally filed/furnished
pages* NONE as amended (together with any statement) under Article 19
pages* NQiE received by this Authority on
pages* NONE received by this Authority on
the drawings:
pages 1-18 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on
pages* NONE received by this Authority on

C] a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. LM4 The amendments have resulted in the cancellation of

the description, pages NONF.
Lnj the claims, Nos. NONE
the drawings, sheets/figs NONE_
the sequence listing (specify): NONE
Zanytable(s) related to the sequence listing (specify): NONF

4. [1] This report has been established as if(some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made,
since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

I the description, pages

the claims, Nos.______
the drawings, sheets/figs
the sequence listing (spec/5i):
any table(s) related to the sequence listing (specij5’):

L* ff1/em 4 applies, some or all ofthose sheets may be marked
Form PCT/IPEA/409 (Box No. 1) (April 2005)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCTJS05I02733

Box No. 111 Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

[I] the entire international application
claims Nos, 37-39

because:

Zthe said international application, or the said claim Nos. j. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (spec&):

Claims 37 and 38 lack any positive steps on how one would practice the process. Claim 39 is a product ofnature. (FT Rule 67.1).

the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos are so unclear
that no meaningful opinion could be formed (specify):

[I] the claims, or said claims Nos, are so inadequately supported by the description that no meaningful
opinion could be formed (specify):

{J no international search report has been established for said claims Nos.

Fla meaningful opinion could not be formed without the sequence listing-, the applicant did not, within the prescribed time limit:

Ufurnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it,
furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C ofthe Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary

Examining Authority in a form and manner acceptable to it. U] pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation

under Rules 13ter, 1(a) or (b) and 13ter.2.

a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did
not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

11111 the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not
comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis ofthe Administrative Instructions.

[II] See Supplemental Box for further details
Form PCT/IPEA/409 (Box No. 111) (April

q

. fi
Industha y Cornercio
SUP ERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENT DE1NVENCION MODELO DE UTILIDAD { I

4, lndicaciÆndo quo so solicita Is concesiön de una patente .
+ Dates do identificaciOn del soli.citante.o do la persona quo presenta Is solicitud
+ Descripción de la invenciÆn

Dibujps do ser estos pertinentØs fri
Comprobante do pago do las tasas establecidas

COMPLETA HINCOMPLETA

DISEID INDUSTRIAL { 3

lndicación do. quo. se solicitael. registro do Diseæo Industrial [I
+ Qatos de identificación del socitante o de la persona que presenta la solicitud {
ReprsentaciOn grfica y fotogrfica del Diseria industrial a muestra del material que in corpora el diseæo
+ Comprobante do pago do laq tasas establecidas

COMPLETA INCOMPLTA [

ESQUEMA DE TRAZADO [3

+ l.ndicaciÆn.d.sque se soilcita elregistro do un Esquema do Trazado [.J
+ Datosde identificaciOn del solicitante a do la persona quo presenta La solidtud
+ RepresentaciOn grfica del esquerna trazado
Oomprobante. pago do las.tasss establecidas C I

COMPLETA

Firma

2 Ii
Fecha

INCOMPLETA { 3

Carrera 13No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Corirnutador: 3 82 08 40
Fax: 350 5220
E-mail: irifosk.gov.co
www.sio.goV.00
SogotÆ, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA 2
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogota,
2020

Doctor (a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO

Apoderado(a) y/o Representante de
VICIJRON PHARMACEUTICALS INC.

REFERENCIA Radicaciôn No. 7 76577
Solicitud internacional PCT/US2005/002733
Fecha inicio fase nacional 26/08/2007
TrÆmite 11
Evento 379
Actuacidn 430

Qficio No. 1103r

Coma resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el articulo 38 de
la Decision 486 de la ComisiOn de la Comunidad Andina, articulo 27 del Tratado de
CooperaciOn en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular
Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

. 1.

La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesiOn del
derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k)
DecisiOn 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben
legalizarse de cant ormidad con lo dispuesto par los articulos 259 y 260 del COdigo
de Procedimiento Civil.

En cumplimiento de lo dispuesto par el articulo 39 de la DecisiOn 486, se le
requiere para que dentro del tØrmino de dos meses siguientes a la fecha de
notificaciOn del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados.
En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se
considerarÆ abandonada y perderÆ su prelaciOn.

Notifiquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5,2, literal
e), del capitulo quinto dlt.tulo primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA S EDES DE VERGEL
. . Jefe de la div/siOn de Nuevas Creaciones

El anterior requerirniento tue notificado par fijaciOn en lista de
fecha ,:CT. T
adpall