



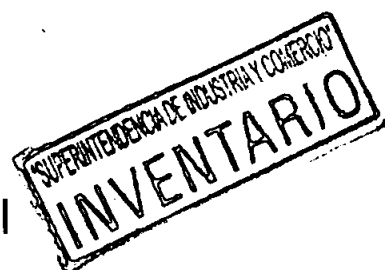
BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

08-106316

54. TÍTULO

COMPUESTO PEPTIDICO DE ACTIVIDAD BIOLOGICA, SU PREPARACION Y SUS
APLICACIONES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SANOFI-AVENTIS SPA

DOMICILIO

MILANO, ITALIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-106316- -00000-0000

Fecha: 2008-10-06 16:08:13 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 41

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

6 Nov. 2008

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SANOFI-AVENTIS SPA**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Italia

Dirección: Viale Luigi Bodio No. 37/B,
I-20158 Milano,
Italia

Domicilio: Milano, Italia

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Philippe BRESSOLIER** ✓
16 rue Camille Jullian,
87000 Limoges,
Francia

3. **Pascale ROBINEAU** ✓
c/o Sanofi-Aventis, Patent Department,
20 avenue Raymond Aron,
92160 Antony,
Francia

5. **Maurice SOFEIR** ✓
c/o Sanofi-Aventis, Patent Department,
20 avenue Raymond Aron,
92160 Antony,
Francia

7. **Bernard VERNEUIL** ✓
8 route de la Cour,
87430 Verneuil Sur Vienne,
Francia
2. **Maria Attilia BRUGO** ✓
c/o Sanofi-Aventis, Patent Department,
20 avenue Raymond Aron,
92160 Antony,
Francia

4. **Jean-Marie SCHMITTER** ✓
17 lieu-dit Beausoleil,
24750 Champcevinel,
Francia

6. **Maria Camino URDACI** ✓
16 rue Camille Saint Saens,
33140 Villenave D'Ornon,
Francia

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/002003

Fecha: 6 de abril de 2007

Publicación Internacional No. WO 2007/113691 A3

Fecha: 11 de octubre de 2007

6

Título (54)

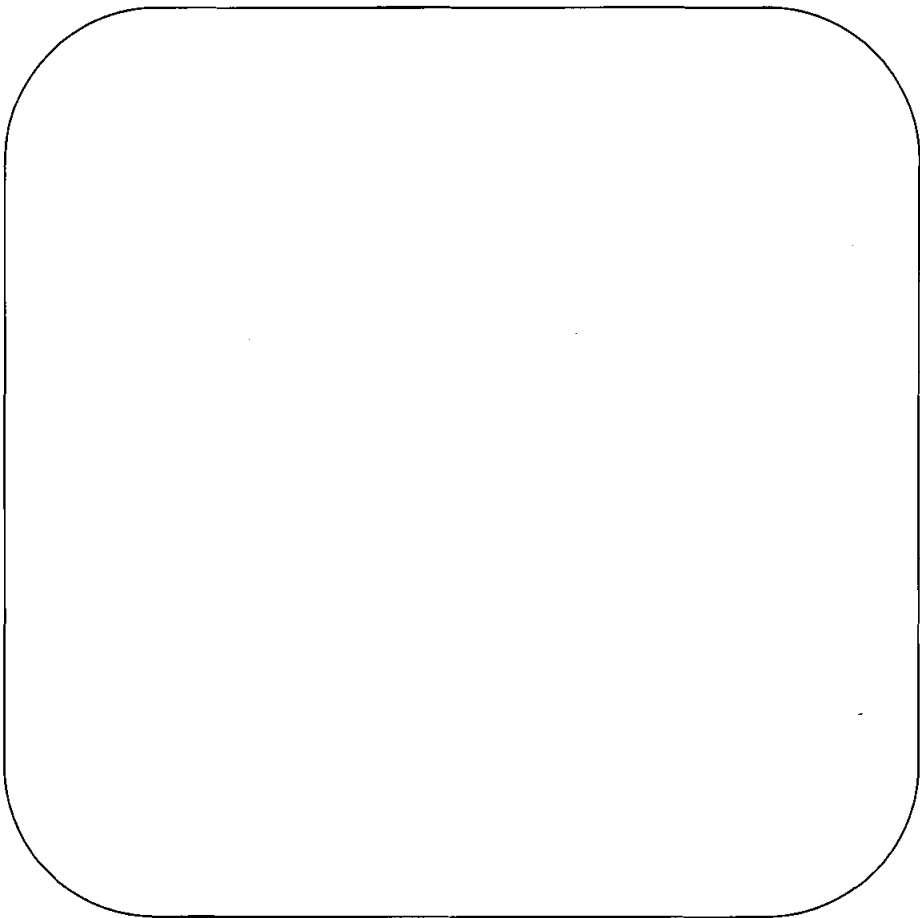
COMPUESTO PEPTÍDICO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SU PREPARACIÓN Y SUS APLICACIONES

2

7 Clasificación Internacional (51) <u>C07K 014/045</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	<u>IT</u>	<u>6 de abril de 2006</u>	<u>MI2006A000678</u>
9 Comprobante de pago No.: <u>08-75,292</u> Fecha: <u>22 de septiembre de 2008</u>			
10 Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. ☐ Poderes, si fuere el caso. ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. ☐ Declaraciones. ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ Traducción del examen preliminar 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 indígenas. ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico. ☐ Arte final 12x12 ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud. ☒ Otros: VER HOJA ANEXA			

11

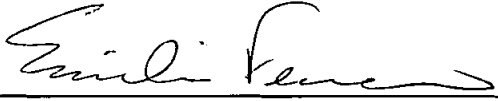
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

966/
JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/113691 A3

Descripción:

Páginas 10 en el idioma original

Páginas 11 en español

Reivindicaciones: Número (s) 12

Figuras: Número (s) _____

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto para la Publicación.

**NO SE EFECTUARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 October 2007 (11.10.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/113691 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 14/45 (2006.01)

(74) Agent: WEBER, Mathieu; Sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/002003

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 6 April 2007 (06.04.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
MI2006A000678 6 April 2006 (06.04.2006) IT

(71) Applicant (for all designated States except US):
SANOFI-AVENTIS SPA [IT/IT]; Viale Luigi Bodio No. 37/B, I-20158 Milano (IT).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BRESSOLIER, Philippe [FR/FR]; 16, rue Camille Jullian, F-87000 Limoges (FR). BRUGO, Maria Attilia [IT/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets Tri E2/300, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). ROBINEAU, Pascale [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets Tri E2/300, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). SCHMITTER, Jean-Marie [FR/FR]; 17 lieu-dit Beausoleil, -24750 Champcevinel (FR). SOFEIR, Maurice [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets Tri E2/300, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). URDACI, Maria Camino [ES/FR]; 16, rue Camille Saint Saens, F-33140 Villenave D'Ornon (FR). VERNEUIL, Bernard [FR/FR]; 8, route de la Cour, F-87430 Verneuil sur Vienne (FR).

Published:

- with international search report
- the filing date of the international application is within two months from the date of expiration of the priority period

(88) Date of publication of the international search report:
27 December 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PEPTIDE COMPOUND WITH BIOLOGICAL ACTIVITY, ITS PREPARATION AND ITS APPLICATION

(57) Abstract: The invention relates to a peptide compound with biological activity, which in particular possesses antimicrobial properties, its preparation and its applications.

WO 2007/113691 A3

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 October 2007 (11.10.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/113691 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/43 (2006.01)

Bernard [FR/FR]; 8, route de la Cour, F-87430 Verneuil
sur Vienne (FR).

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/002003

(74) Agent: **WEBER, Mathieu**; Sanofi-aventis, Département
Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(22) International Filing Date: 6 April 2007 (06.04.2007)

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
M12006A000678 6 April 2006 (06.04.2006) IT

(71) Applicant (*for all designated States except US*):
SANOFI-AVENTIS SPA [IT/IT]; Viale Luigi Bodio
No. 37/B, I-20158 Milano (IT).

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **BRESSOLLIER,**
Philippe [FR/FR]; 16, rue Camille Jullian, F-87000
Limoges (FR). **BRUGO, Maria Attilia** [IT/FR]; c/o
Sanofi-Aventis, Département Brevets Tri E2/300, 20, av-
enue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). **ROBINEAU,**
Pascale [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets
Tri E2/300, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony
(FR). **SCHMITTER, Jean-Marie** [FR/FR]; 17 lieu-dit
Beausoleil, -24750 Champcevinel (FR). **SOFEIR, Mau-**
rice [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets Tri
E2/300, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).
URDACI, Maria Camino [ES/FR]; 16, rue Camille Saint
Saens, F-33140 Villenave D'Ornon (FR). **VERNEUIL,**

Published:

- without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- the filing date of the international application is within two
months from the date of expiration of the priority period

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PEPTIDE COMPOUND WITH BIOLOGICAL ACTIVITY, ITS PREPARATION AND ITS APPLICATION

(57) Abstract: The invention relates to a peptide compound with biological activity, which in particular possesses antimicrobial properties, its preparation and its applications.

WO 2007/113691 A2

Peptide compound with biological activity, its preparation and its applications

The present invention relates to a peptide compound with biological activity, in particular possessing antimicrobial properties, to its preparation and to its applications.

5 It is known that certain microorganisms, when administered live to humans or to animals, are capable of exerting a beneficial effect on the health of the host, in particular by producing antimicrobial substances.

Such organisms are generally called probiotic organisms.

10 Numerous studies have shown the beneficial effects, for humans or for animals, of these probiotic organisms, in particular in the treatment of gastrointestinal disorders, such as diarrhoea, acute diarrhoea, and diarrhoea associated with the use of medicinal drugs.

The probiotic organisms most studied to date are the lactic-acid bacteria, but it has also been reported that other live organisms can have a beneficial effect on health.

These other organisms include for example *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus polyfermentans*.

20 Among these, *Bacillus clausii* has been used for many years in a pharmaceutical composition marketed under the trade name Enterogermina®.

This pharmaceutical composition is intended in particular for combating gastrointestinal disorders and comprises a mixture of four strains of *Bacillus clausii*.

25 The antimicrobial biological activity of these probiotic organisms is generally linked to the natural production of compounds with antimicrobial activity, such as the lantibiotics. Thus, strains of *Bacillus clausii*, *Streptomyces mutans*, *Lactococcus lactis* produce respectively subtilin, mutacins and nisins, respectively.

30 Numerous antibiotics are used nowadays as therapeutic substances for the treatment of infectious diseases, but pathogens are becoming more and more resistant to the pharmaceuticals that are used. Some of them are already known to be "multi-resistant" and it is sometimes extremely difficult to treat the infections that they cause.

New molecules having antibiotic properties are therefore constantly being sought.

The purpose of the invention is to meet this demand, by proposing a compound with antimicrobial activity obtained from *Bacillus clausii*.

5 A first object of the invention relates to a compound with antimicrobial activity.

A second object of the invention relates to a method for the preparation of the compound with antimicrobial activity of the invention.

10 A third object of the invention relates to a pharmaceutical composition containing the compound with antimicrobial activity of the invention.

A fourth object of the invention relates to the uses of the compound with antimicrobial activity of the invention.

According to a first aspect, the invention relates to a compound with antimicrobial activity.

15 Thus, a molecule produced by *Bacillus clausii*, and which displays antimicrobial activity, has been isolated and characterized.

The compound of the invention with antimicrobial activity is of a peptide nature and can be obtained from a culture of *Bacillus clausii* in a suitable medium up until sporulation, collection of the supernatant of the culture after centrifugation and filtration, and extraction of the fraction with antimicrobial activity.

The compound of the invention, which is mainly active against Gram-positive bacteria, can be obtained from *Bacillus clausii*, and has a molecular weight of 2107.5 Da, determined by mass spectrometry by the MALDI TOF and ESI method.

25 According to another characteristic, the compound of the invention is a lantibiotic, and has lanthionine bridges and modified amino acids in its peptide sequence.

According to one of its characteristics, the compound of the invention comprises the following sequence of amino acids and amino acid derivatives:

30 Phe - Dhb - Ala - Val - Dha - Phe - Ala - Abu - Pro - Gly - Ala - Gly - Glu - Dhb - Gly - Ala - Phe - Asn - Ala - Phe - Ala

in which

Dhb represents a didehydroaminobutyrate;

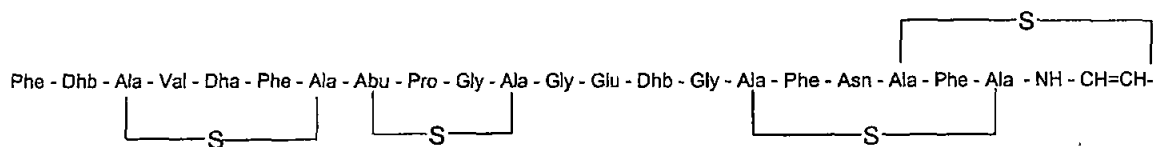
Dha represents a didehydroalanine;

Abu represents an aminobutyrate.

5 The compound of the invention possesses two lanthionine bridges, one between the alanine in position 3 and the alanine in position 7, and the other between the alanine in position 16 and the alanine in position 21.

A methyl-lanthionine bridge is moreover present between the aminobutyrate residue in position 8 and the alanine in position 11. A fourth bridge is present
10 between the C-terminal amino-vinyl-cysteine group and the alanine residue in position 19.

Represented with the existing bridges, the compound of the invention has the following sequence:



15

in which Dha, Dhb and Abu are as defined above.

According to a second aspect, the invention relates to a method for the preparation of the compound of the invention.

According to the invention, the compound of the invention can be extracted
20 from *Bacillus clausii* according to the following method.

The method of preparation of the compound of the invention comprises the stages of:

- culture of strains of *Bacillus clausii* in a suitable medium up until sporulation of the strains;
- 25 - collection of the supernatant from the culture after centrifugation and filtration;
- solid-phase extraction of the fraction obtained and elution.

If necessary, the fraction obtained, which corresponds to the molecule of the invention, can be purified by high-performance liquid chromatography (HPLC).

10

According to another embodiment, the compound of the invention can be prepared by conventional chemical synthesis, according to methods known to a person skilled in the art.

5 The compound of the invention displays antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. In particular it has displayed antimicrobial activity against *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus sp*, *Lactococcus lactis*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* and the Gram-positive bacteria of the oral cavity.

10 Owing to its lantibiotic character, the compound of the invention can display a wider spectrum of biological activity, for example antiviral, antiparasitic or immunomodulating activity.

The compound of the invention can therefore be used for the preparation of medicinal products.

15 Thus, according to another of its aspects, the invention relates to medicinal products that contain the compound of the invention.

These medicinal products find application in therapy, in particular in the treatment and prevention of infectious diseases.

20 These medicinal products also find application in the treatment and/or prevention of intestinal disorders, for example in the treatment and prevention of intestinal dysbiosis and endogenous vitamin disorder, as well as in adjunctive treatment in the recovery of the intestinal microbial flora that has been altered as a result of antibiotic treatment or chemotherapy.

25 They also find application in the prevention and treatment of diarrhoea, in particular acute diarrhoea and diarrhoea associated with the use of medicinal products.

According to another of its aspects, the invention relates to pharmaceutical compositions comprising, as active principle, the compound according to the invention, for the treatment and/or prevention of the pathologies described above. These pharmaceutical compositions contain an effective dose of the compound according to the invention, as well as at least one pharmaceutically effective excipient.

30

Said excipients are selected, according to the pharmaceutical form and the desired route of administration, from the usual excipients that are known to a person skilled in the art.

In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, topical, local, intratracheal, nasal, transdermal or rectal administration, the compound can be administered in dosage units, mixed with conventional pharmaceutical excipients, to animals and to humans for the prevention or for the treatment of the disorders or diseases mentioned above.

Appropriate dosage units comprise forms for the oral route such as tablets, soft or hard capsules, powders, granules and oral solutions or suspensions; sublingual, buccal, intratracheal, intraocular, nasal, and inhalation forms of administration; topical, transdermal, subcutaneous, intramuscular or intravenous forms of administration; rectal forms of administration, and implants. For topical application, compounds according to the invention can be used in creams, gels, ointments or lotions.

The composition of the invention can be administered by the most suitable route and at a dose that depends in particular on the nature of the infection, on the type of host in question, on the host's age, weight and general condition, on concomitant treatments being received, as well as on the host's response to the treatment and to the therapeutic rationale.

In general, for administration to humans, the composition is administered by the oral route in the form of a pharmaceutical composition of spores. For example, the dose can be of about 10×10^9 spores daily, for example from 1 to 8×10^9 spores daily, in particular 2, 4 or 6×10^9 spores daily, in a single dose or in several doses.

There may be special cases in which higher or lower doses are appropriate; such doses are still within the scope of the invention.

According to another of its aspects, the invention relates to the use of the compound of the invention for the preparation of a medicinal product intended for the prevention and/or treatment of the pathologies described above.

According to another of its aspects, the invention also relates to a method of

treatment of the pathologies stated above that comprises the administration, to a patient, of an effective dose of the compound of the invention.

According to another of its aspects, the compound of the invention can also be used as an additive in cosmetic or foodstuff compositions.

5 According to this use, the compound of the invention is added in an amount sufficient to inhibit increase in bacterial growth in cosmetic or foodstuff compositions and thus permit their preservation.

The examples given below illustrate the invention though without limiting it.

1. Production of the molecule

10 Production of the supernatant.

An O/C strain of *Bacillus clausii* (obtained from the pharmaceutical composition marketed with the trade name Enterogermina®) is cultured for three days on Mueller Hinton medium at 37°C and 180 rev/min until sporulation of the strain occurs.

15 The culture is then centrifuged and the supernatant is filtered with a membrane with pore size of 0.45 µm to remove any residual cells.

Extraction

The compound with antimicrobial activity is extracted in the solid phase on a Sep Pak plus C₁₈ cartridge (Waters). For this, 150 ml of supernatant obtained in
20 the preceding stage is deposited on a cartridge and elution is performed with 100% methanol, after three successive washings with NH₄HCO₃ 25 mM, pH 8; NH₄HCO₃ 25 mM, pH 8 + 10% methanol and NH₄HCO₃ 25 mM, pH 8 + 50% methanol.

All of the active fractions eluted with 100% methanol are combined and concentrated by vacuum evaporation until a volume reduction factor of 10 is
25 obtained.

The concentrate is stored at -20°C. No loss of activity was observed after 6 months of storage in these conditions.

Purification

Purification as far as homogenization of the substance extracted in the solid
30 phase is performed by HPLC.

A first semi-preparative stage is carried out on a column C₄ Synchronpack

100 x 8 mm. The fractions of eluate that display antimicrobial activity are collected and combined. The purity of the compound obtained at the end of this stage is greater than 80% and the yield in extraction – purification is about 6 mg·l⁻¹ of supernatant.

- 5 A second analytical stage is performed on a column C₁ Bischoff 150 x 4.6 mm. The fractions of eluate that display antimicrobial activity are collected and combined. The purity of the compound obtained at the end of this stage is greater than 90%.

2. Structural Investigation

10 Determination of molecular weight

The purified compound obtained in Example 1 above has a molecular weight of 2107.5 Da determined by mass spectrometry using the MALD TOF method and confirmed by mass spectrometry using the ESI method.

UV/visible absorption spectrum

- 15 The compound of the invention absorbs in the ultraviolet and has in particular a peak at 265 nm compatible with the presence of aromatic amino acids in its structure.

Composition of the amino acids

- 20 After total hydrolysis with HCl 5.7 N, under vacuum, for 16 hours at 115°C the presence of various amino acids is detected in the structure of the purified compound.

Investigation of the various enantiomeric forms of the amino acids

- 25 The enantiomeric forms L and D of the amino acids that make up the sequence of the compound with antimicrobial activity were investigated after total acid hydrolysis, by derivatization with N α -(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-L-alanine amide (Marfey's reagent) according to the method described by Szokan (J. Chromato., 1988, 444, pp. 115-122). The results indicate that all the residues of the amino acids that make up the antibiotic molecule are enantiomers of the L form.

Effects of enzymatic or chemical treatments on structure

- 30 The complete loss of activity following enzymatic treatment with Pronase confirms the peptide character of the new antibiotic compound.

Disulphide bridges are ruled out since a cistern-specific assay proved negative. In contrast, the presence of lanthionine bridges, sensitive to reducing treatment in an alkaline medium (Meyer, Anal. Biochem, 223, pp 185-190, 1994) can explain the loss of activity observed in the presence of β mercaptoethanol following structural modification, detected by reverse-phase HPLC. The drop, only partial, in activity measured at the end of less drastic treatment such as incubation at neutral pH in the presence of DTT 25 mM may be the result of specific reduction of the didehydro-amino acids present in the structure. These observations make it possible to formulate the hypothesis according to which the antimicrobial molecule produced by *Bacillus clausii* is a lantibiotic. This family of antibiotics is normally characterized by the presence of lanthionine bridges and modified amino acids in their structure.

Sequencing of the native molecule

Sequencing is performed using a Procise 492 A automatic sequencer (Applied Biosystem) by Edman recurrent degradation starting from the N-terminal end. The PTH amino acids formed are analysed by reverse-phase HPLC on a microbore C18 column. The sequencing of the antibiotic molecule, in the native state, is blocked at the end of the first step of Edman chemical degradation. The only residue identified corresponds to a phenylalanine which occupies the N-terminal position.

Sequencing of the molecule after chemical modification

The information relating to the potential sequence of the novel antimicrobial substance produced by *Bacillus clausii*, deduced from the sequence of the encoding gene, combined with the information obtained from analysis of the amino acid composition and from the behaviour in the reducing medium reveal the presence of post-translational modifications characteristic of the lantibiotics.

The presence of didehydro-amino acids and of lanthionine bridges in the structure is at the origin of the blocking of sequencing of the molecule in the native state. The dehydro-amino acids such as Dha (didehydroalanine) and Dhb (didehydroaminobutyrate) are deaminated during Edman chemical degradation and thus block the progress of the sequencing. These same residues Dha and Dhb are

not detectable by analysis of the amino acid composition after total acid hydrolysis for the same reasons, and their deamination renders ineffective the reaction of derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate or with AQC (Waters), specific of the primary amine functions.

5 With the aim of overcoming the problems connected with the presence of modified amino acids and lanthionine bridges, a double chemical reaction was applied to the peptide antibiotic prior to its sequencing. The method employed was adapted from the work of Smith, Eur. J. Biochem. 2000, 267, p. 6810-6816. For this purpose, 50 nmol of the purified peptide is taken up in 10 µl of H₂O + 4 mg of
10 NaBH₄. 190 µl of a denaturing and antioxidant solution (570 mg of guanidine chloride + 0.1 ml of N-ethylmorpholine, adjusted to pH 8.5 and to a final volume of 1 ml with H₂O) is added, then the reaction mixture is incubated in a stream of N₂ for 72 hours at 37°C.

This treatment specifically reduces the didehydro-amino acids without
15 affecting the lanthionine bridges.

The peptide thus reduced is recovered on a Prosorb column (Perkin Elmer) equipped with a PVDF membrane. After washing the membrane with 200 µl of 0.1% TFA, the peptide absorbed on this support is submitted to a second reduction in the presence of ethanethiol (addition of 20 µl of a solution comprising 280 µl of
20 methanol + 200 µl of H₂O + 65 ml of NaOH + 60 µl of ethanethiol) for one hour at 50°C.

Covalent structure of the antibiotic molecule produced with *Bacillus clausii*

The covalent structure is in agreement with all of the data obtained. The molecular weight calculated on the basis of the masses of the mono-isotopic
25 residues is 2107.5 Da. The antimicrobial molecule secreted by *Bacillus clausii* is a lantibiotic possessing 4 lanthionine bridges and methyllanthionine as well as 3 didehydro-amino acid residues in its structure. The structure is in agreement with the mass found, 2107.5 Da, with the results obtained after performing chemical modifications on the molecule, and with the amino acid sequence deduced on the
30 basis of the gene that codes for its production, found in *B. clausii*. The structure was confirmed by NMR analysis.

The other three strains (N/R, SIN, T) of *Bacillus clausii* present in the pharmaceutical composition Enterogermina® displayed the same profile of antimicrobial activity as the O/C strain.

CLAIMS

1. Peptide compound that displays antimicrobial activity and can be obtained from a culture of *Bacillus clausii* in a suitable medium up until sporulation, collection of the supernatant from the culture after centrifugation and
5 filtration, and extraction of the fraction with antimicrobial activity.
2. Compound according to Claim 1, characterized in that it has a molecular weight of 2107.5 Da.
3. Compound according to Claims 1 or 2, characterized in that it is a lantibiotic and has lanthionine bridges and modified amino acids.
- 10 4. Compound according to any one of Claims 1 to 3, characterized in that it comprises the following amino acid sequence:
Phe - Dhb - Ala - Val - Dha - Phe - Ala - Abu - Pro - Gly - Ala - Gly - Glu - Dhb -
Gly - Ala - Phe - Asn - Ala - Phe - Ala
in which
- 15 Dhb represents a didehydroaminobutyrate;
Dha represents a didehydroalanine;
Abu represents an aminobutyrate.
5. Compound according to Claim 4, characterized in that it has two lanthionine bridges, one between the alanine in position 3 and the alanine in
20 position 7, and the other between the alanine in position 16 and the alanine in position 21; a methyl-lanthionine bridge between the aminobutyrate residue in position 8 and the alanine in position 11 and a fourth bridge between the C-terminal amino-vinyl-cysteine group and the residue of the alanine in position 19.
6. Compound according to any one of Claims 1 to 5, characterized in
25 that the amino acid residues are enantiomers of the L form.
7. Method for the preparation of a compound according to any one of Claims 1 to 6, which comprises the stages of
- culture of the strains of *Bacillus clausii* in a suitable medium up until sporulation of the strains;
 - 30 - collection of the supernatant from the culture after centrifugation and filtration;

- solid-phase extraction of the fraction obtained and elution;
- if necessary, purification of the fraction obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC).

8. Medicinal product characterized in that it comprises a compound
5 according to any one of Claims 1 to 6.

9. Pharmaceutical composition, characterized in that it comprises a compound according to any one of Claims 1 to 6, and at least one pharmaceutically acceptable excipient.

10. Use of a compound according to any one of Claims 1 to 6 for the preparation of a medicinal product intended for the treatment and/or prevention of intestinal disorders or of infectious diseases.

11. Use of a compound according to Claim 10 for the treatment and/or prevention of intestinal dysbiosis and endogenous vitamin disorder, for the recovery of the intestinal microbial flora altered as a result of antibiotic treatment or chemotherapy, for the treatment and prevention of diarrhoea, in particular acute diarrhoea or diarrhoea associated with the use of medicinal products.
15

12. Use of a compound according to any one of Claims 1 to 6 as an additive in cosmetic or foodstuff compositions.

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de publicación internacional
11 Octubre 2007 (11.10.2007)

PCT

(10) Número de publicación internacional

WO 2007/113691 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/45 (2006.01)

(74) Agente: WEBER, Mathieu; Sanofi-aventis, Département
Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(21) Número de solicitud internacional:
PCT/IB2007/002003

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para
todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de presentación internacional:
6 Abril 2007 (06.04.2007)

(25) Idioma de la presentación:
Inglés

(26) Idioma de la publicación:
Inglés

(30) Datos de prioridad:
MI2006A000678 6 Abril 2006 (06.04.2006) IT

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,
FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante(para todos los Estados designados excepto
EE.UU.): SANOFI-AVENTIS SPA [IT/IT]; Viale Luigi Bodio
No. 37/B, I-20158 Milano (IT)

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (solamente para EE.UU.):
BRESSOLLIER, Philippe [FR/FR]; 16, rue Camille Jullian, F-
87000 Limoges (FR). BRUGO, Maria Attilia [IT/FR]; c/o
Sanofi-Aventis, Département Brevets Tri E2/300, 20, avenue
Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). ROBINEAU, Pascale
[FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis Département Brevets Tri E3/300,
20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).
SCHMITTER, Jean-Marie [FR/FR]; 17 lieu-dit Beausoleil, -
24750 Champcevinel (FR). SOFEIR, Maurice [FR/FR]; c/o
Sanofi-Aventis Département Brevets Tri E2/300, 20, avenue
Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). URDACI, Maria
Camino [ES/FR]; 16, rue Camille Saint Saens, F-33140
Villenave D'Ornon (FR). VERNEUIL, Bernard [FR/FR]; 8,
route de la Cour, F-87430 Verneuil sur Vienne (FR).

Publicada:

--- Con informe de búsqueda internacional.
--- Antes de expirar el plazo previsto para la modificación de
las reivindicaciones, se volverá a publicar si se reciben
las modificaciones.

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda
internacional:

27 Diciembre 2007

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, se hace referencia a
"Notas de Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al
comienzo de cada índice regular del Boletín PCT.

(54) Título: COMPUESTO PEPTÍDICO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SU PREPARACIÓN Y SUS APLICACIONES.

(57) Resumen: La invención se refiere a un compuesto peptídico de actividad biológica, que posee en particular propiedades
antimicrobianas, a su preparación y a sus aplicaciones.

WO 2007/113691 A3

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de publicación internacional
11 Octubre 2007 (11.10.2007)

PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2007/113691 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/43 (2006.01)

Bernard [FR/FR]; 8, route de la Cour, F-87430 Verneuil sur
Vienne (FR).

(21) Número de solicitud internacional:
PCT/IB2007/002003

(74) Agente: WEBER, Mathieu; Sanofi-aventis, Département
Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(22) Fecha de presentación internacional:
6 Abril 2007 (06.04.2007)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para
todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de la presentación:
Inglés

(26) Idioma de la publicación:
Inglés

(30) Datos de prioridad:
MI2006A000678 6 Abril 2006 (06.04.2006) IT

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,
FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante(para todos los Estados designados excepto
EE.UU.): SANOFI-AVENTIS SPA [IT/IT]; Viale Luigi Bodio
No. 37/B, I-20158 Milano (IT)

Publicada:
--- sin informe de búsqueda internacional, se volverá a publicar
después de la recepción de este informe.
--- la fecha de presentación de la solicitud internacional está
dentro de dos meses desde la fecha de vencimiento del
período de prioridad.

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes (solamente para EE.UU.):
BRESSOLLIER, Philippe [FR/FR]; 16, rue Camille Jullian, F-
87000 Limoges (FR). BRUGO, Maria Attilia [IT/FR]; c/o
Sanofi-Aventis, Département Brevets Tri E3/300, 20, avenue
Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). ROBINEAU, Pascale
[FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis Département Brevets Tri E2/300,
20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). SCHMITTER,
Jean-Marie [FR/FR]; 17 lieu-dit Beausoleil, -
24750 Champcevinel (FR). SOFEIR, Maurice [FR/FR]; c/o
Sanofi-Aventis Département Brevets Tri E2/300, 20, avenue
Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). URDACI, Maria
Camino [ES/FR]; 16, rue Camille Saint Saens, F-33140
Villenave D'Ornon (FR). VERNEUIL,

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, se hace referencia a
"Notas de Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al
comienzo de cada índice regular del Boletín PCT.

WO 2007/113691 A2

(54) Título: COMPUESTO PEPTÍDICO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SU PREPARACIÓN Y SUS APLICACIONES.

(57) Resumen: La invención se refiere a un compuesto peptídico de actividad biológica, que posee en particular propiedades antimicrobianas, a su preparación y a sus aplicaciones.

Compuesto peptídico de actividad biológica, su preparación y sus aplicaciones

La presente invención se refiere a un compuesto peptídico de actividad biológica, que presenta en particular propiedades antimicrobianas, a su preparación y a sus aplicaciones.

Se sabe que determinados microorganismos pueden, cuando se suministran vivos al ser humano o al animal, inducir un efecto beneficioso sobre la salud del huésped, en particular mediante la producción de sustancias antimicrobianas.

Los organismos de este tipo se denominan generalmente organismos probióticos.

Numerosos estudios han mostrado que los efectos beneficiosos para el ser humano o el animal de estos organismos probióticos, en particular en el tratamiento de los trastornos gastrointestinales, tales como la diarrea, la diarrea aguda, la diarrea asociada a la ingestión de medicamentos.

Los organismos probióticos más estudiados hasta hoy en día son las bacterias lácticas, pero además se ha informado de que otros organismos vivos pueden presentar una actividad beneficiosa sobre la salud.

Otros organismos de este tipo comprenden por ejemplo *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus polyfermentans*.

Entre éstos, el *Bacillus clausii* se usa desde hace muchos años en una composición farmacéutica comercializada con la marca Enterogermina®.

Esta composición farmacéutica está destinada en particular a combatir los trastornos gastrointestinales y comprende una mezcla de cuatro cepas de *Bacillus clausii*.

La actividad biológica antimicrobiana de estos organismos probióticos está unida generalmente a la producción natural de compuestos de actividad antimicrobiana, tales como los lantibióticos. De este modo cepas de *Bacillus clausii*, *Streptomyces mutans*, *Lactococcus lactis* producen respectivamente la sublitina, mutacinas y nisinas.

Hoy en día se usan numerosos antibióticos como sustancias terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas pero los agentes patógenos se hacen cada vez más resistentes a las sustancias farmacéuticas utilizadas. Ya se conocen
5 determinados modos por ser "multirresistentes" y el tratamiento de las infecciones de las que son responsables es a veces extremadamente difícil.

Por tanto siempre se buscan nuevas moléculas que tengan propiedades antibióticas.

10 El objetivo de esta invención es responder a esta demanda, proponiendo un compuesto de actividad antimicrobiana obtenido a partir de *Bacillus clausii*.

Un primer objeto de la invención se refiere a un compuesto de actividad antimicrobiana.

15 Un segundo objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación del compuesto de actividad antimicrobiana de la invención.

Un tercer objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene el compuesto de actividad
20 antimicrobiana de la invención.

Un cuarto objeto de la invención se refiere a los usos del compuesto de actividad antimicrobiana de la invención.

Según un primero aspecto, la invención se refiere a un compuesto de actividad antimicrobiana.

25 De hecho se ha aislado y caracterizado una molécula producida por el *Bacillus clausii*, y que presenta una actividad antimicrobiana.

El compuesto de la invención de actividad antimicrobiana es de naturaleza peptídica y es susceptible de obtenerse a partir
30 de un cultivo de *Bacillus clausii* en un medio apropiado hasta la esporulación, recogida del sobrenadante del cultivo tras la centrifugación y filtración, y extracción de la fracción de actividad antimicrobiana.

El compuesto de la invención, activo principalmente contra
35 las bacterias Gram positivas que es susceptible de obtenerse a partir de *Bacillus clausii*, presenta una masa molecular de

2107,5 Da, determinada por espectrometría de masas con el método MALDI TOF y ESI.

Según otra característica, el compuesto de la invención es un lantibiótico que presenta en su secuencia peptídica puentes de lantionina y aminoácidos modificados.

Según una de sus características, el compuesto de la invención comprende la siguiente secuencia de aminoácidos y derivados de aminoácidos:

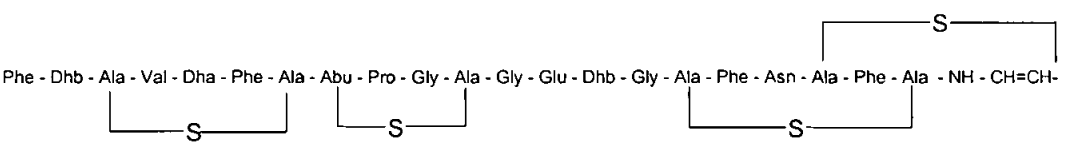
Phe - Dhb - Ala - Val - Dha - Phe - Ala - Abu - Pro - Gly -
Ala - Gly - Glu - Dhb - Gly - Ala - Phe - Asn - Ala - Phe - Ala

En la que
Dhb representa un dideshidroaminobutirato;
Dha representa una dideshidroalanina;
Abu representa un aminobutirato.

El compuesto de la invención presenta dos puentes de lantionina, uno entre la alanina en la posición 3 y la alanina en la posición 7, y el otro entre la alanina en la posición 16 y la alanina en la posición 21.

Además está presente un puente de metil-lantionina entre el residuo aminobutirato en la posición 8 y la alanina en la posición 11. Existe un cuarto puente entre el grupo amino-vinil-cisteínico del extremo C terminal y el residuo de la alanina en la posición 19.

Representado con los puentes existentes, el compuesto de la invención presenta la siguiente secuencia:



En la que Dha, Dhb y Abu son tal como se describió anteriormente.

Según un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación del compuesto de la invención.

Según la invención, el compuesto de la invención puede extraerse de *Bacillus clausii* según el procedimiento que sigue.

El procedimiento de preparación del compuesto de la invención comprende las fases de:

- cultivo de las cepas de *Bacillus clausii* en un medio apropiado hasta la esporulación de las cepas;
- 5 - recogida del sobrenadante del cultivo tras la centrifugación y filtración;
- extracción en fase sólida de la fracción obtenida y elución.

En todo caso, la fracción obtenida, que corresponde a la molécula de la invención, puede purificarse por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Según otra modalidad de ejecución, el compuesto de la invención puede prepararse mediante síntesis química clásica, según métodos conocidos por el experto en la técnica.

15 El compuesto de la invención presenta actividad microbiana frente a bacterias Gram positivas. En particular ha mostrado una actividad microbiana frente a *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Mocrococcus sp*, *Lactococcus lactis*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y las bacterias Gram positivas de la cavidad oral.

Por su naturaleza lantibiótica, el compuesto de la invención puede presentar un espectro de actividad biológica más amplio, por ejemplo antiviral, antiparasitaria o inmunomoduladora.

25 El compuesto de la invención puede por tanto utilizarse para la preparación de medicamentos.

De este modo, según otro de sus aspectos, la invención tiene por objeto medicamentos que comprenden el compuesto de la invención.

30 Estos medicamentos encuentran su aplicación en terapia, en particular en el tratamiento y en la prevención de las enfermedades infecciosas.

Estos medicamentos encuentran también aplicación en el tratamiento y/o en la prevención de los trastornos intestinales, por ejemplo en el tratamiento y en la prevención del dismicrobismo intestinal y la disvitaminosis endógena, tal como

también en el tratamiento coadyuvante en la recuperación de la flora microbiana intestinal alterada a consecuencia de una terapia antibiótica o de una quimioterapia.

5 Estos encuentran también aplicación en la prevención y en el tratamiento de la diarrea, en particular en las diarreas agudas y en las diarreas asociadas a la ingestión de medicamentos.

10 Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, el compuesto según la invención, para el tratamiento y/o para la prevención de las patologías descritas anteriormente. Estas composiciones farmacéuticas contienen una dosis eficaz del compuesto según la invención, tal como también al menos un excipiente farmacéuticamente eficaz.

15 Los excipientes mencionados se eligen, según la forma farmacéutica y la vía de administración deseada, de los excipientes habituales que se conocen por el experto en la técnica.

20 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, endovenosa, tópica, local, intratraqueal, endonasal, transdérmica o rectal, el compuesto puede administrarse en unidades de dosificación, en mezcla con excipientes farmacéuticos clásicos, a los animales y a los seres humanos, para la prevención o para el tratamiento de las molestias o enfermedades anteriores.

25 Las unidades de dosificación apropiadas comprenden las formas por vía oral tales como los comprimidos, cápsulas blandas o duras, los polvos, los granulados y las soluciones o suspensiones orales, las formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraocular, endonasal, por inhalación, las formas de administración tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o endovenosa, las formas de administración rectal y los implantes. Para la aplicación tópica, pueden utilizarse 30 los compuestos según la invención en crema, gel, pomada o loción.

La composición de la invención puede administrarse según la vía más apropiada y a una dosis que depende en particular de la naturaleza de la infección, del tipo de huésped en cuestión, de su edad, del peso, del estado general, de los tratamientos concomitantes que recibe, así como también de su respuesta al tratamiento y al régimen terapéutico.

En general, para una administración al ser humano, la composición se administra por vía oral en forma de una composición farmacéutica de las esporas. Por ejemplo, la dosis puede ser de aproximadamente 10×10^9 esporas al día, por ejemplo de 1 a 8×10^9 esporas al día, en particular 2, 4 ó 6×10^9 esporas al día, en una sola administración o en más administraciones.

Puede haber casos en los que sean apropiadas dosificaciones más elevadas o más bajas; tales dosificaciones no se salen del alcance de la invención.

Según otro de sus aspectos, la invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la preparación de un medicamento destinado a prevenir y/o a tratar las patologías descritas anteriormente.

La invención según otro de sus aspectos se refiere también a un método de tratamiento de las patologías indicadas anteriormente que comprende la administración, a un paciente, de una dosis eficaz del compuesto de la invención.

Según otro de sus aspectos, el compuesto de la invención puede utilizarse también como producto de adición en las composiciones cosméticas o alimenticias.

Según esta utilización, el compuesto de la invención se añade en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano en las composiciones cosméticas o alimenticias y permitir de este modo la conservación.

Los ejemplos que siguen ilustran la invención, no obstante sin limitarla.

1. Producción de la molécula

Producción del sobrenadante.

Se realiza un cultivo de una cepa O/C de *Bacillus clausii* (que proviene de la composición farmacéutica comercializada con la marca Enterogermina®) durante 3 días sobre un medio de Mueller Hinton a 37°C y 180 revoluciones por minuto hasta obtener la esporulación de la cepa.

Por tanto, se centrifuga el cultivo, luego se filtra el sobrenadante con una membrana de 0,45 µm para eliminar todo el residuo de células.

Extracción

Se efectúa la extracción del compuesto de actividad antimicrobiana en fase sólida sobre cartucho Sep Pak plus C₁₈ (Waters). Para hacerlo, se depositan 150 ml de sobrenadante obtenido en la fase anterior sobre un cartucho y se realiza la elución con metanol al 100%, tras tres lavados sucesivos con NH₄HCO₃ 25 mM, pH 8; NH₄HCO₃ 25 mM, pH 8 + metanol al 10% y NH₄HCO₃ 25 mM, pH 8 + metanol al 50%.

Se reúne el conjunto de las fracciones activas eluidas en metanol al 100% y concentra por evaporación a vacío hasta obtener un factor de reducción volumétrico de 10.

Se almacena el concentrado a -20°C. No se ha observado ninguna pérdida de actividad tras 6 meses de conservación en tales condiciones.

Purificación

Se realiza la purificación mediante HPLC hasta la homogeneización de la sustancia extraída en fase sólida.

Se realiza una primera fase semipreparativa sobre columna C₄ Synchropack 100 x 8 mm. Se recogen y reúnen las fracciones de eluato que presentan la actividad antimicrobiana. La pureza del compuesto obtenida al final de esta fase es superior al 80% y el rendimiento de la extracción - purificación es de aproximadamente 6 mg·l⁻¹ de sobrenadante.

Se realiza una segunda fase analítica sobre columna C₁ Bischoff 150 x 4,6 mm. Se recogen y reúnen las fracciones de eluato que presentan una actividad antimicrobiana. La pureza del compuesto alcanzada al final de esta fase es superior al 90%.

5

2. Estudio estructural

Determinación de la masa molecular

El compuesto purificado obtenido en el ejemplo 1 anterior presenta una masa molecular de 2107,5 Da determinada mediante espectrometría de masas con el método MALD TOF y confirmada mediante espectrometría de masas con el método ESI.

10

Espectro de absorción UV/visible

El compuesto de la invención absorbe en el ultravioleta y presenta en particular un pico a 265 nm compatible con la presencia de aminoácidos aromáticos en su estructura.

15

Composiciones de los aminoácidos

Tras la hidrólisis total con HCl 5,7 N, a vacío, durante 16 horas a 115°C se demuestra la presencia de diversos aminoácidos en las estructura del compuesto purificado.

20

Investigación de las diferentes formas enantioméricas de los aminoácidos

Se investigaron las formas enantioméricas L y D de los aminoácidos que componen la secuencia del compuesto de actividad antimicrobiana tras la hidrólisis ácida total, para determinar la ramificación con N α -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alaninamida (reactivo de Marfey) según el método descrito por Szokan (J. Chromato., 1988, 444, páginas 115-122). Los resultados indican que todos los residuos de los aminoácidos que constituyen la molécula antibiótica son enantiómeros en forma L.

25

30

35

Efectos de los tratamientos enzimático o químico sobre la estructura

La pérdida total de actividad posterior a un tratamiento enzimático con pronasas confirma la naturaleza peptídica del nuevo compuesto antibiótico.

Se excluyen los puentes disulfuro, ya que se ha revelado negativa una dosificación específica de la cisterna. Al contrario, la presencia de los puentes de lantionina, sensibles al tratamiento reductor en medio alcalino (Meyer, Anal. Biochem, 223, páginas 185-190, 1994) puede justificar la pérdida de actividad observada en presencia del β -mercaptoetanol posterior a un cambio estructural demostrado con la HPLC de fase inversa. La disminución, solamente parcial, de la actividad medida a la salida del tratamiento menos drástico, tal como una incubación a pH neutro en presencia de DTT 25 mM puede ser la consecuencia de la reducción específica de los dideshidroaminoácidos presentes en la estructura. Estas observaciones permiten formular la hipótesis según la que la molécula antimicrobiana producida por el *Bacillus clausii* es un lantibiótico. Esta familia de antibióticos se caracteriza normalmente por la presencia en su estructura de puentes de lantionina y de aminoácidos modificados.

Secuenciación de la molécula nativa

Se realiza la secuenciación con la ayuda de un secuenciador automático Procise 492 A (Applied Biosystem) por degradación recurrente de Edman a partir del extremo N terminal. Se analizan mediante HPLC de fase inversa sobre columna microbore C18 los aminoácidos de PTH formados. Se bloquea la secuenciación de la molécula antibiótica, en el estado nativo, a la salida del primer paso de degradación química de Edman. El único residuo identificado corresponde a una fenilalanina que ocupa la posición de extremo N terminal.

35

Secuenciación de la molécula tras el cambio químico

Las informaciones correspondientes a la secuencia potencial de la nueva sustancia antimicrobiana producida por el *Bacillus clausii*, deducidas de la secuencia del gen codificante, combinadas con las resultantes de los análisis de la composición de aminoácidos y del comportamiento en el medio reductor revelan la presencia de modificaciones postraduccionales características de los antibióticos.

La presencia de dideshidroaminoácidos y de los puentes de lantionina en la estructura está en el origen del bloqueo de la secuenciación de la molécula en el estado nativo. Los deshidroaminoácidos tales como los Dha (dideshidroalanina) y Dhb (dideshidroaminobutirato) se desaminan durante la degradación química de Edman y bloquean de este modo el avance de la secuenciación. Estos mismos residuos Dha y Dhb no son detectables con el análisis de la composición en aminoácidos tras la hidrólisis ácida total y por las mismas razones su desaminación hace ineficaz la reacción de ramificación con el carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo o con AQC (Waters), específica de las funciones de aminas primarias.

Con el fin de superar los problemas unidos a la presencia de aminoácidos modificantes y de los puentes de lantionina, se aplicó una doble reacción química al péptido antibiótico antes de su secuenciación. Se adapta el método puesto en práctica de los trabajos de Smith, Eur. J. Biochem. 2000, 267, páginas 6810-6816. Con este objetivo se recuperan 50 mmol del péptido purificado con 10 µl de H₂O + 4 mg de NaBH₄. Se añaden 190 µl de una disolución desnaturalizante y antioxidante (570 mg de cloruro de guanidina + 0,1 ml de N-etilmorfolina, regulada a pH 8,5 y a un volumen final de 1 ml con H₂O) luego se incuba el medio de reacción bajo corriente de N₂ durante 72 horas a 37°C.

Este tratamiento reduce de modo específico los dideshidroaminoácidos sin afectar a los puentes de lantionina.

Se recupera el péptido reducido de este modo sobre una columna Prosorb (Perkin Elmer) equipada con una membrana PVDF. Tras el lavado de la membrana con 200 µl de TFA al 0,1%, el

péptido absorbido sobre este soporte sufre una segunda reducción en presencia de etanotiol (adición de 20 µl de una disolución constituida por 280 µl de metanol + 200 µl de H₂O + 65 ml de NaOH + 60 µl de etanotiol) durante una hora a 50°C.

5

Estructura covalente de la molécula antibiótica producida con *Bacillus clausii*

La estructura covalente está de acuerdo con el conjunto de los datos obtenidos. La masa molecular calculada sobre la base de las masas de los residuos monoisotópicos es de 2107,5 Da. La molécula antimicrobiana secretada por el *Bacillus clausii* es un lantibiótico que presenta en su estructura 4 puentes de lantionina y metil-lantionina tal como también 3 residuos dideshidroaminoácidos. La estructura está de acuerdo con la masa hallada, 2107,5 Da, con los resultados obtenidos tras las modificaciones química efectuadas sobre la molécula, y con la secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen que codifica para su producción encontrado en el *B. clausii*. Se confirmó la estructura con análisis de RMN.

20

Las otras tres cepas (N/R, SIN, T) de *Bacillus clausii* presentes en la composición farmacéutica Enterogermina® han presentado el mismo perfil de actividad antimicrobiana de la cepa O/C.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto peptídico que presenta actividad microbiana, susceptible de obtenerse de un cultivo de *Bacillus clausii* en un medio apropiado hasta la esporulación, recogida del sobrenadante del cultivo tras la centrifugación y filtración, y extracción de la fracción de actividad antimicrobiana.
2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque presenta una masa molecular de 2107,5 Da.
3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque es un lantibiótico y presenta puentes de lantionina y aminoácidos modificantes.
4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:
Phe - Dhb - Ala - Val - Dha - Phe - Ala - Abu - Pro - Gly - Ala - Gly - Glu - Dhb - Gly - Ala - Phe - Asn - Ala - Phe - Ala
en la que
Dhb representa un dideshidroaminobutirato;
Dha representa una dideshidroalanina;
Abu representa un aminobutirato.
5. Compuesto según la reivindicación 4, caracterizado porque presenta dos puentes de lantionina, uno entre la alanina en la posición 3 y la alanina en la posición 7, y otro entre la alanina en la posición 16 y la alanina en la posición 21; un puente de metil-lantionina entre el residuo aminobutirato en la posición 8 y la alanina en la posición 11 y un cuarto puente entre el grupo amino-vinil-cisteínico del extremo C terminal y el residuo de la alanina en la posición 19.
6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los residuos de los aminoácidos son enantiómeros en forma L.
7. Procedimiento para la preparación de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las fases de

- cultivo de las cepas de *Bacillus clausii* en un medio apropiado hasta la esporulación de las cepas;
 - recogida del sobrenadante del cultivo tras la centrifugación y filtración;
 - 5 - extracción en fase sólida del cultivo tras centrifugación y filtración;
 - si es necesario, purificación de la fracción obtenida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
8. Medicamento caracterizado porque comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 10 9. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 10. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de los trastornos intestinales, de las enfermedades infecciosas.
- 20 11. Uso de un compuesto según la reivindicación 10 para el tratamiento y/o la prevención del dismicrobismo intestinal y la disvitaminosis endógena, para la recuperación de la flora microbiana intestinal alterada a consecuencia de una terapia antibiótica o de una quimioterapia, para el tratamiento y la prevención de las diarreas, en particular la diarrea aguda o la diarrea asociada a la ingesta de medicamentos.
- 25 12. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como producto de adición en composiciones cosméticas o alimenticias.

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/002003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/45		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/56411 A (UNIV FLORIDA [US]) 17 December 1998 (1998-12-17) the whole document	1,3,8,9
X	WO 2004/026334 A (CANADIAN INOVATECH INC [CA]; SMITH STEPHEN R [CA]; RITCHIE STEWART J []) 1 April 2004 (2004-04-01) paragraph [0007] - paragraph [0032]	1,3,8-12
X	SAHL H-G ET AL: "LANTIBIOTICS: BIOSYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF UNIQUELY MODIFIED PEPTIDES FROM GRAM-POSITIVE BACTERIA" ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 52, 1998, pages 41-79, XP001098220 ISSN: 0066-4227 the whole document	1,3
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 September 2007		Date of mailing of the international search report 12/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoff, Céline

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/002003

35

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 405 641 A (PROGE FARM S R L [IT]) 7 April 2004 (2004-04-07) the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2007/002003

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9856411	A	17-12-1998	AU 748871 B2	13-06-2002
			AU 8064498 A	30-12-1998
			CA 2295986 A1	17-12-1998
			EP 1019084 A1	19-07-2000
			JP 2002504825 T	12-02-2002
			NZ 501658 A	31-08-2001
			US 6391285 B1	21-05-2002
			US 5932469 A	03-08-1999
WO 2004026334	A	01-04-2004	AU 2003266058 A1	08-04-2004
			BR 0314118 A	12-07-2005
			CA 2404356 A1	18-03-2004
			EP 1539224 A1	15-06-2005
			JP 2005539070 T	22-12-2005
			US 2005266050 A1	01-12-2005
EP 1405641	A	07-04-2004	NONE	

Nº de solicitud internacional
PCT/IB2007/002003

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD												
INV. C07K214/45												
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP												
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA												
Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de la clasificación)												
C07K												
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda												
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)												
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data												
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES												
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones No.										
X	WO 98/56411 A (UNIV FLORIDA [US]) 17 Diciembre 1998 (17-12-1998) el documento completo	1, 3, 8, 9										
X	WO 2004/026334 A (CANADIAN INOVATECH INC [CA]; SMITH STEPHEN R [CA]; RITCHIE STEWART J []) 1 Abril 2004 (01-04-2004) párrafo [0007] - párrafo [0032]	1, 3, 8-12										
X	SAHL H-G ET AL: "LANTIBIOTICS: BIOSYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF UNIQUELY MODIFIED PEPTIDES FROM GRAM-POSSITIVE BACTIA" ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 52, 1998, páginas 41-79, XP001098220 ISSN: 0066-4227 el documento completo	1, 3										
----- -/-												
- En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos. - Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo.												
* Categorías especiales de los documentos citados: <table><tr><td>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante</td><td>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención</td></tr><tr><td>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior</td><td>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado</td></tr><tr><td>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)</td><td>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</td></tr><tr><td>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio</td><td>"Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes</td></tr><tr><td>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada</td><td></td></tr></table>			"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención	"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado	"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.	"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio	"Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes	"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada	
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención											
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado											
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.											
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio	"Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes											
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada												
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional										
20 Septiembre 2007		12/10/2007										
Nombre y dirección postal de la ISA Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HL Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Hoff, Céline										

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Nº de solicitud internacional
PCT/IB2007/002003

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	EP 1 405 641 A (PROGE FARM S R L [IT]) 7 Abril 2004 (07-04-2004) el documento completo _____	1-12

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familia de patentes

Nº de solicitud internacional

PCT/IB2007/002003

Documento de patente citado en el informe de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9856411	A	17-12-1998	AU 748871 B2	13-06-2002
			AU 8064498 A	30-12-1998
			CA 2295986 A1	17-12-1998
			EP 1019084 A1	19-07-2000
			JP 2002504825 T	12-02-2002
			NZ 501658 A	31-08-2001
			US 6391285 B1	21-05-2002
			US 5932469 A	03-08-1999
WO 2004026334	A	01-04-2004	AU 2003266058 A1	08-04-2004
			BR 0314118 A	12-07-2005
			CA 2404356 A1	18-03-2004
			EP 1539224 A1	15-06-2005
			JP 2005539070 T	22-12-2005
			US 2005266050 A1	01-12-2005
EP 1405641	A	07-04-2004	NINGUNO	

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País MI2006A000678 06/04/2006 IT		(51) Int Cl: C07K 014/045 (71) Solicitante(s) SANOFI-AVENTIS SPA (72) Inventor(es) PHILIPPE BRESSOLLIER Y OTROS (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 06/04/2007 No. de solicitud PCT/IB2007/002003		(87) Publicación internacional Fecha: 11/10/2007 N° publicación: WO 2007/113691 A3	
(54) Titulo: COMPUESTO PEPTÍDICO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SU PREPARACIÓN Y SUS APLICACIONES			

Reivindicación(es):

1. Compuesto peptídico que presenta actividad microbiana, susceptible de obtenerse de un cultivo de *Bacillus clausii* en un medio apropiado hasta la esporulación, recogida del sobrenadante del cultivo tras la centrifugación y filtración, y extracción de la fracción de actividad antimicrobiana.
2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque presenta una masa molecular de 2107,5 Da.
3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque es un lantibiótico y presenta puentes de lantionina y aminoácidos modificantes.
4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:
Phe – Dhb – Ala – Val – Dha – Phe – Ala – Abu – Pro – Gly – Ala – Gly – Glu – Dhb – Gly – Ala – Phe – Asn – Ala – Phe – Ala
en la que
Dhb representa un dideshidroaminobutirato;
Dha representa una dideshidroalanina;
Abu representa un aminobutirato.
5. Compuesto según la reivindicación 4, caracterizado porque presenta dos puentes de lantionina, uno entre la alanina en la posición 3 y la alanina en la posición 7, y otro entre la alanina en la posición 16 y la alanina en la posición 21; un puente de metil-lantionina entre el residuo aminobutirato en la posición 8 y la alanina en la posición 11 y un cuarto puente entre el grupo amino-vinil-cisteínico del extremo C terminal y el residuo de la alanina en la posición 19.
6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los residuos de los aminoácidos son enantiómeros en forma L.
7. Procedimiento para la preparación de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las fases de
- cultivo de las cepas de *Bacillus clausii* en un medio apropiado hasta la esporulación de las cepas;

- recogida del sobrenadante del cultivo tras la centrifugación y filtración;
 - extracción en fase sólida del cultivo tras centrifugación y filtración;
 - si es necesario, purificación de la fracción obtenida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
8. Medicamento caracterizado porque comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de los trastornos intestinales, de las enfermedades infecciosas.
11. Uso de un compuesto según la reivindicación 10 para el tratamiento y/o la prevención del dismicrobismo intestinal y la disvitaminosis endógena, para la recuperación de la flora microbiana intestinal alterada a consecuencia de una terapia antibiótica o de una quimioterapia, para el tratamiento y la prevención de las diarreas, en particular la diarrea aguda o la diarrea asociada a la ingesta de medicamentos.
12. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como producto de adición en composiciones cosméticas o alimenticias.

41

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 75,292
FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-106316- -00000-0000

Fecha: 2008-10-06 16:08:13 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 41

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80756185	22/09/2008	33,230,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

06 16745-841001-3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-106316- -00000-0000

Fecha: 2008-10-06 16:08:13 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 41



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Caudia M Newac
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	8 106316
	Solicitud internacional	PCT/IB2007/002003
	Fecha inicio fase nacional	06/11/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 1 4 0 8 6

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

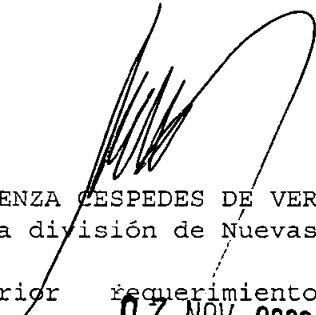
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 106316



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 07 NOV. 2008
jfernand

64