



BT CC

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda

INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

07-34797

21 EXPEDIENTE No

54. TITULO. PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRALES DE
ACTINOMADURA NAMIBIENSIS

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C07K 14/36, C12P 21/02,
A61P 31/12, A61K 38/10

71 SOLICITANTE: SANOFI-AVENTIS

DOMICILIO: 174, Avenue de France, 75013 Paris, FRANCIA

74. APODERADO: DR. LUIS PATIÑO LEYVA

22. BOGOTA, D.C.,

03 ABR. 2009

PETITO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-034797- -00000-0000

Fecha 2009-04-03 15:25 14
Tra 11 PATENTEIYII
Act 411 PRESENTACIONDep. 2020 NUECREACIONE
Eve. 378 FASENACIONALI
Folios 87

dicación

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: SANOFI-AVENTIS

Dirección: 174, avenue de France
75013 Paris
FRANCIA

Nacionalidad o Domicilio: París - FRANCIA

Lugar de Constitución: FRANCIA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: DR. LUIS PATIÑO LEYVA

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

2.930.616

TPA

2.698

④

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO No. 1

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/EP2007/008294

Fecha

25/09/2007

Publicación Internacional No.

WO 2008/040469 A1

Fecha

10/04/2008

⑥

Título (54)

PEPTIDOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRALES DE ACTINOMADURA NAMIBIENSIS

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07K 14/36, C12P 21/02, A61P 31/12, A61K 38/10

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

EP

06/10/2006

06020980,6

⑨

Comprobantes de pago Nos.

09-24,591 y 09-24,592

Fecha

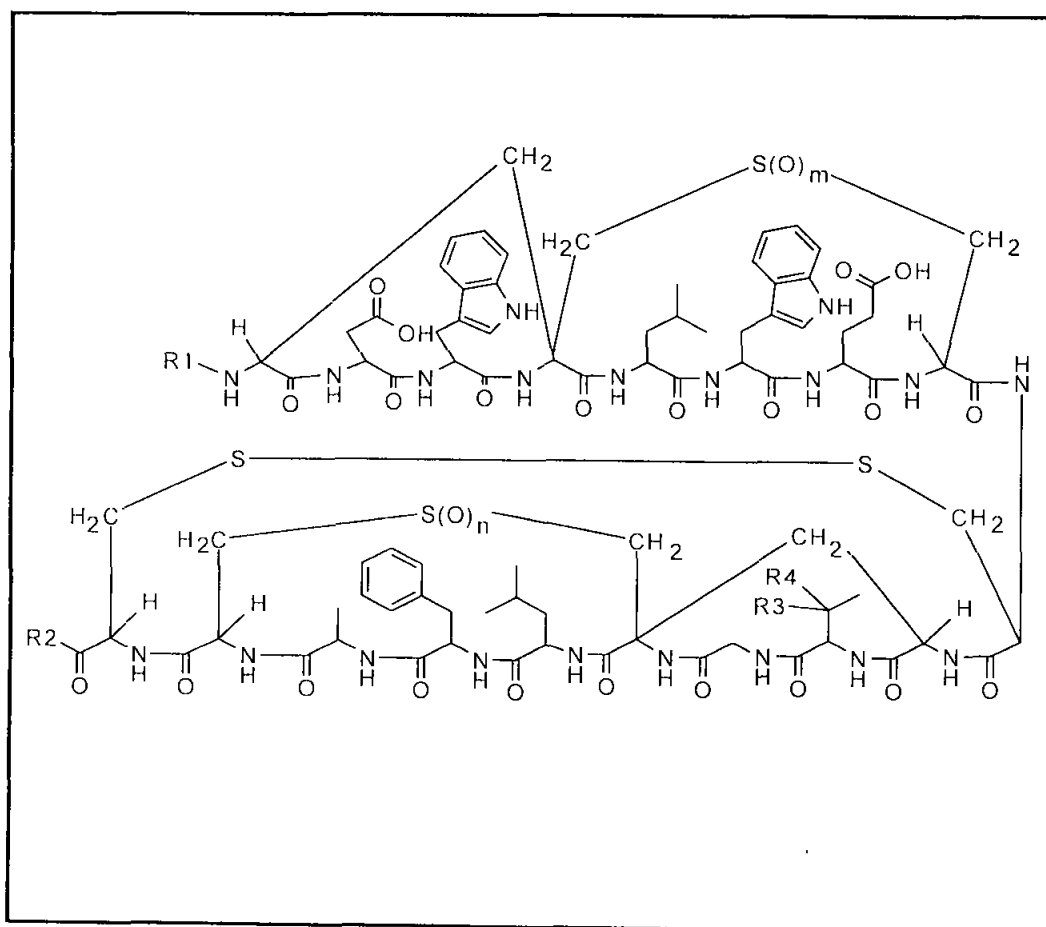
Marzo 30 de 2009

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ 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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción 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 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.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación, Formas PCT/IB/306 (4 NOTIFICACIONES DE CAMBIO), Forma PCT/IB/304

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUIS PATINO LEYVA

FIRMA:

[Handwritten signature]

C.C. No. 2.930.616 Bogotá - TPA 2.698 C.S.J.

CASTELLANOS & CO LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

**ANEXO # 1
INVENTORES**

1. **Prof. Dr. GERHARD SEIBERT** ✓
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
2. **Dr. LÁSZLÓ VÉRTESY** ✓
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
3. **Dr. JOACHIM WINK** ✓
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
4. **Dr. IRVIN WINKLER** ✓
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
5. **Dr. MARK BROENSTRUP** ✓
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
6. **Dr. HOLGER HOFFMANN** ✓
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
7. **Dr. HANS GUEHRING** ✓
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
8. **Dr. LUIGI TOTI** ✓
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
9. **Prof. Dr. RODERICH SÜSSMUTH** ✓
Sybelstrasse 69
10629 Berlin-Charlottenburg
ALEMANIA
10. **Prof. Dr. GEORGE M. SHELDRIK** ✓
Am Klausberge 14
37075 Göttingen
ALEMANIA
11. **Dr. KATHRIN MEINDL** ✓
Thiestr. 6a
37077 Göttingen
ALEMANIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 24,591
FECHA : MARZO 30 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-034797- -00000-0000

Fecha 2009-04-03 15 25 14 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 87

***** CONSIGNACION *****

DE	TANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS		CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	91384112	30/03/2009	9,896,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTILLO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

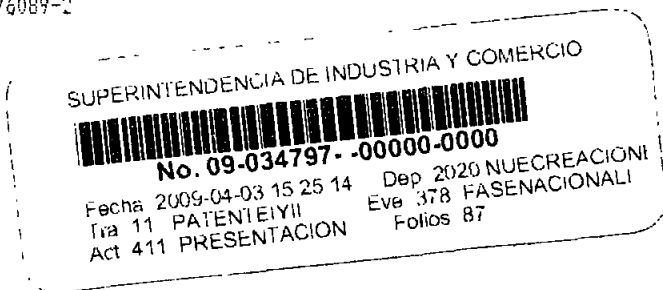
RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 24,592
FECHA : MARZO 30 DE 2009



***** CONSIGNACION *****

DE	TANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387		Y1384112	30/03/2009	9,896,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD 1	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA LANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

**G.HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA**

The undersigned SANOFI AVENTIS... , acting on behalf of and representing of ... , domiciled in 174 Avenue de France, 75013 PARIS, FRANCE, hereby

appoint(s) **LUIS PATIÑO LEYVA** and/or **GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO**, domiciled in Bogotá D.C., Republic of Colombia , as our true and legal attorney with the necessary powers:

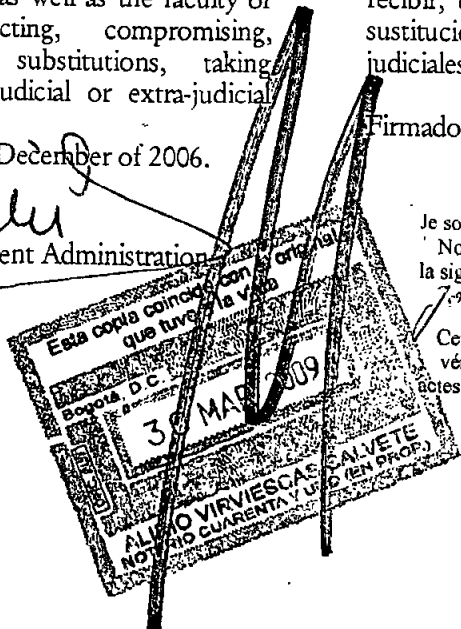
- 1) To apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, ~~utility models, industrial designs and models, commercial ensigns and names, trademarks, slogans, health licenses, copyrights and domain names~~ as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name;
- 2) To prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind;
- 3) To intervene as plaintiff or defendant, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: action dealing with trademark ensigns and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to intellectual property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize him to file applications, make descriptions, protests, amendments, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by Law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect my (our) interests, with all other necessary legal faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications, and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed in Paris on this 14 day of December of 2006.

MERLIER Josiane, Director Patent Administration



**G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA**

Yo (nosotros) , obrando en nombre propio y representación de, con domicilio en , nombro(amos) a **LUIS PATIÑO LEYVA** y/o **GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO** , con domicilio en Bogotá D.C., República de Colombia, apoderado verdadero y legal, con poder especial, amplio y suficiente:

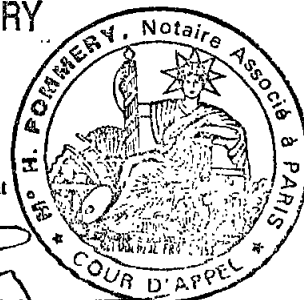
- 1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, dibujos y modelos industriales, registro de marcas, registro de lemas comerciales, depósito de nombres y enseñas comerciales, registros sanitarios, derechos de autor y nombres de dominio así como sus traspasos, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre;
- 2) Elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases;
- 3) Intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas de nombre o enseña comerciales; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal, demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos, u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad intelectual; al ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad intelectual.

A este efecto, lo facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la Ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando al descargo respectivo, y en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar, o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en Paris el de de

Je soussigné Me **Hervé POMMERY**
Notaire à Paris, certifie matériellement la signature de Madame **Josiane MERLIER** apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune vérification de l'exactitude des faits et actes mentionnés dans le présent document



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par Maitre POMREY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de son étude

Attesté

5. à PARIS

6. le 20/12/06

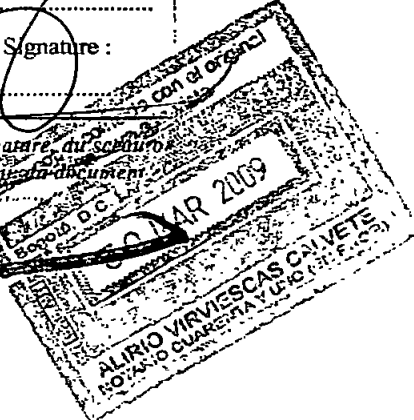
7. par le Procureur général près la Cour d'appel de PARIS

8. sous n° 174190

9. Sceau : Mme TEPLIER

10. Signature :

Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou du timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est exact.



CERTIFICATION

CERTIFICACIÓN

COMPANIES

SOCIEDADES

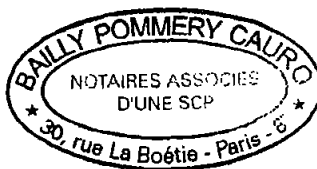
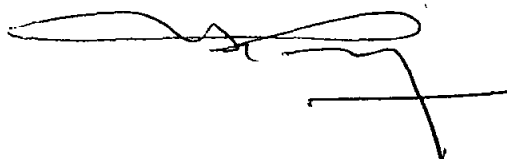
The undersigned Hervé POMMERY certifies: that the preceding signature(s) reading Hervé POMMERY (are) authentic; that the signer(s) at present fill(s) the position of Director of the said company; he (they) is (are) empowered to grant this power; and that said company exists, accomplishes its social object and is organized in _____ in accordance with the Laws of FRANCE. All the foregoing facts are known to me, due to my having examined the respective documents to which I attest.

El(la) infrascrito(a) _____ certifica: que la(s) firma(s) que antecede(n) y dice(n) _____ es (son) auténtica(s); que el (los) signatario(s) desempeña(n) actualmente el cargo(s) de _____ de _____; que tiene(n) facultad para otorgar este poder, y que dicha compañía existe, cumple su objeto social y está organizada en _____ conforme a las Leyes de _____. Todos los hechos anteriores le constan, por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Signed in PARIS on this 19th day of February 2007.

Firmado en _____ el _____ de _____ de _____.

Hervé POMMERY
NOTAIRE



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par Hervé POMMERY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de son étude

Attesté

5. à PARIS

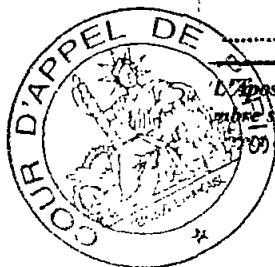
6. le 22/02/2007

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de PARIS

8. sous n° 17350

9. Sceau :

10. Signature :



L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou du timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est vrai ou que la République...



EDGAR HERMES PAIXÃO PARDO
Traductor oficial - Traducteur assermenté

Español - Français
Français - Espagnol

Traducción oficial, parcial, de un documento que me fue presentado en lengua francesa, trabajo realizado en función de mi cargo de traductor oficial de esta ciudad de Santafé de Bogotá.

Contenido del documento:

PODER de SANOFI AVENTIS, 174, Avenue de France, 75013 París, Francia, para Luis Patiño Leyva y/o Gustavo Hollmann Restrepo.

Firma ilegible, Josiane Merlier.

El suscrito, Hervé Pommery, notario en París, autentico la firma de Josiane Merlier. Esta autenticación no implica aceptación del contenido del documento. Firma ilegible y sello de la notaría. París, 19 de febrero de 2007.

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

1. República Francesa. El presente documento público. 2. Fue firmado por el señor Pommery. 3. Actuando en calidad de notario. 4. Lleva el sello de la notaría.

CERTIFICADO:

5. En París, 6. El 20 de diciembre de 2006 y el 22 de febrero de 2007. 7. Por el Procurador General de la Corte de Apelaciones de París. 8. bajo los números 174190 y 173350. 9. Sello de la Corte. 10. Firma ilegible.

La apostille confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o estampilla que está sobre el documento. No significa que el contenido del documento es correcto o que la República Francesa apruebe su contenido.

Era todo cuanto contenía el documento. Es una traducción fiel y parcial.



Edgar Hermes Paixão Pardo
Escriba en español
L.E. 1706 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

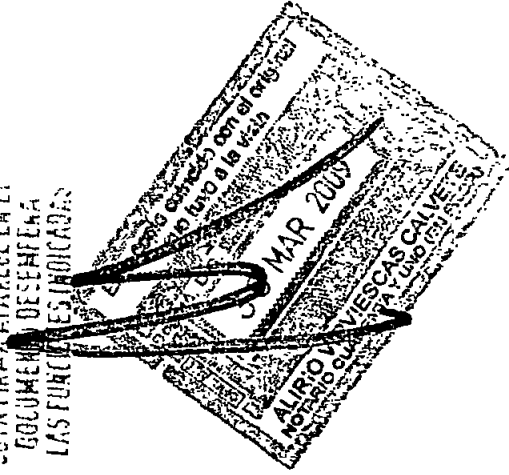
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

622036

Edgar Prieto
CUNTA FIRMA A LA LEY
DOCUMENTO DE DEFENSA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2007 JUN 28 A 11:35

Bam
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 April 2008 (10.04.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/040469 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 14/36 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2007/008294

(22) International Filing Date:

25 September 2007 (25.09.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

06020980.6 6 October 2006 (06.10.2006) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174, avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SEIBERT, Gerhard [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). VÉRTESY, László [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). WINK, Joachim [DE/DE];

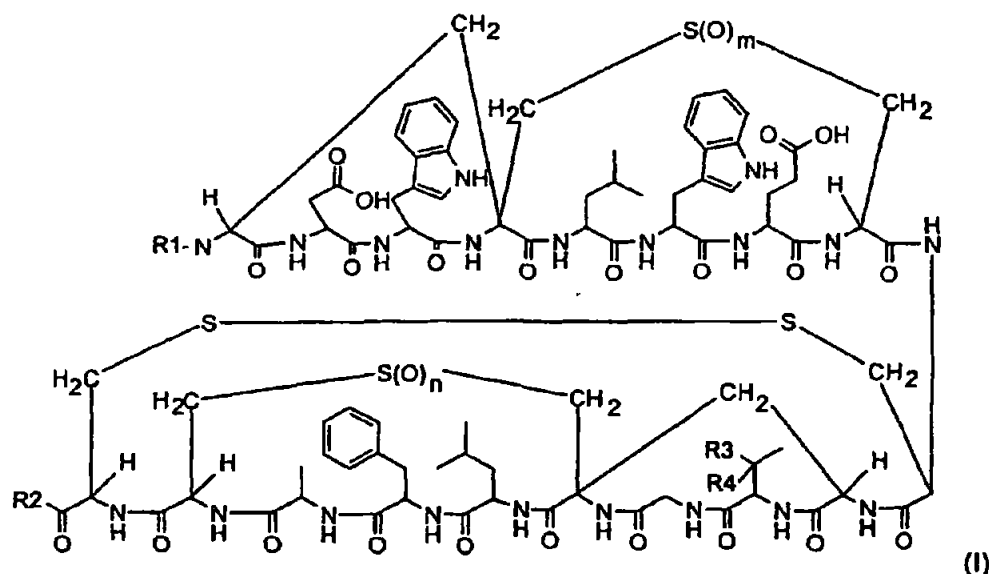
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). WINKLER, Irvin [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). SÜSSMUTH, Roderich [DE/DE]; Institut für Chemie, Strasse 17. Juni 135, 10623 Berlin-Charlottenburg (DE). SHELDRIK, George [GB/DE]; Fakultät für Chemie, Tammannstr. 4, 37077 Göttingen (DE). MEINDL, Kathrin [DE/DE]; Fakultät für Chemie, Tammannstr. 4, 37077 Göttingen (DE). BROENSTRUP, Mark [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). HOFFMANN, Holger [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). GUEHRING, Hans [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). TOTI, Luigi [CH/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(74) Agent: SIEBER, Frank; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Patentabteilung, Industriepark Höchst, Geb. K 801, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(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, DO, DZ, EC, EE, EG,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBACTERIAL AND ANTIVIRAL PEPTIDES FROM ACTINOMADURA NAMIBIENSIS



(57) Abstract: The invention refers to of a compound of the formula (I) wherein R3 and R4 are independently H or OH, and wherein m and n are independently of one another 0, 1 or 2, obtainable from Actinomadura namibiensis (DSM 6313), its use for the treatment of bacterial infections, viral infections and/or pain, and pharmaceutical composition comprising it. The compounds of formula (I) have been defined as labyrinthopeptins and consist of a highly bridged peptidic structure of 18 amino acids containing lanthionine-like residues and alpha disubstituted amino acid analogues. The amino acid sequence is XDWXLWEXCTGXLFAXC, wherein the two Cys residues form a disulfide bridge and each X independently represents one of the non-natural amino acids involved in the bridging linkages.



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, ME, 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.

(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).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

ANTIBACTERIAL AND ANTIVIRAL PEPTIDES FROM ACTINOMADURA NAMIBIENSIS

5

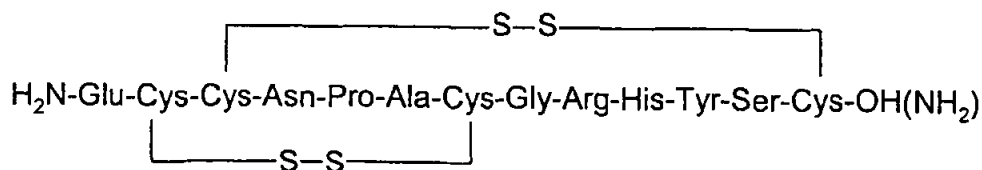
Field of invention

The present invention relates to the novel peptides isolated from *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), a method for its preparation and its use in the manufacture
10 of a medicament for the treatment of bacterial infections, for the treatment of viral infections and/or for the treatment of pain.

Background of the Invention

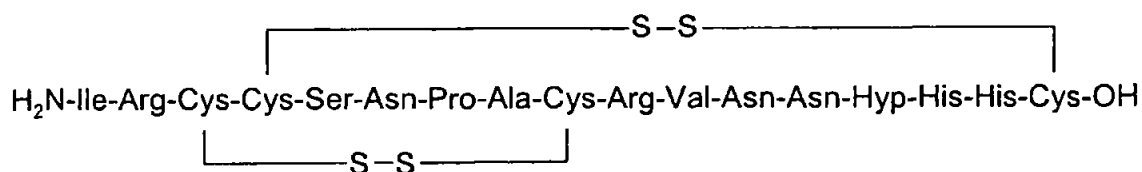
15 Several highly bridged peptides are known in the literature, for example conopeptides isolated from cone snails (for a review see e.g. Terlau & Olivera, *Physiol. Rev.* 2004, 84, 41–68) or the so-called lantibiotics (Chatterjee et al., *Chem. Rev.* 2005, 105, 633–683) from Gram-positive bacteria source. The said peptides have various utilities. The lantibiotic nisin has been used, among other utilities, as a
20 food preservative since many years.

The conopeptides are e.g. useful for the treatment of pain, diabetes, multiple sclerosis and cardiovascular diseases and currently undergo preclinical or clinical development. Examples of conopeptides are α -GI (sequence: ECCNPACGRHYSC*,
25 *amidated, connectivity: 1-3,2-4) and α -GID (sequence: IR γ CCSNPACRVNNOHVC, connectivity: 1-3,2-4), wherein O/Hyp is hydroxyproline and the connectivity indicates the position of the cysteine involved in each specific disulphide bonds, for example, first to third and second to fourth as in α -GID:



30

(α -GI)



(α -GID).

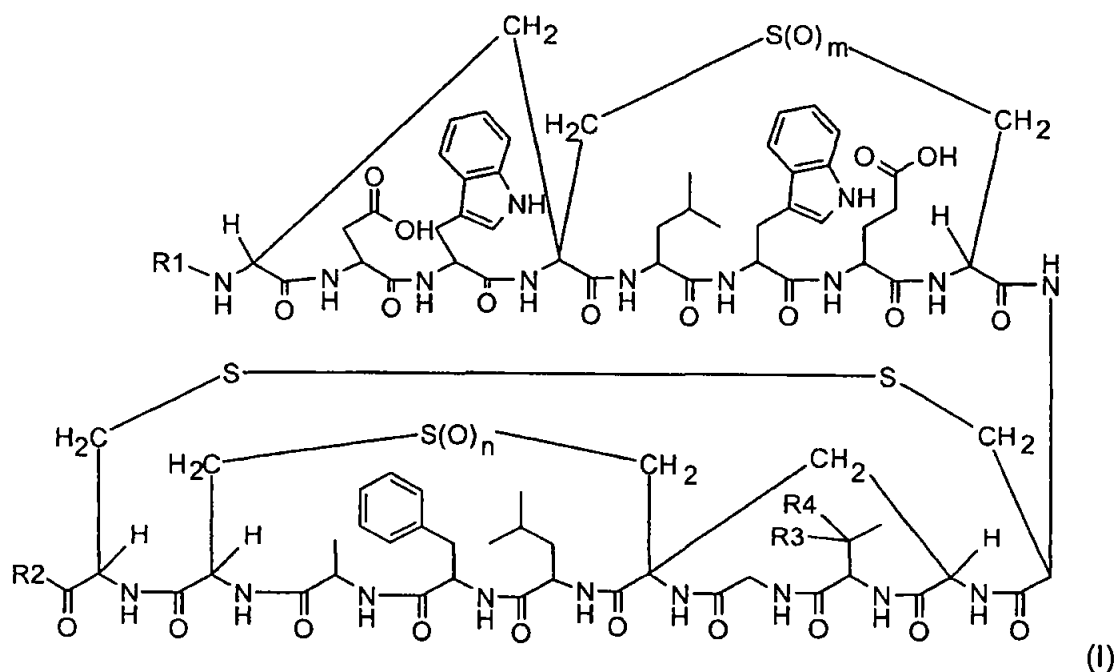
Summary of the invention

- 5 It has now surprisingly been found that highly bridged peptides can be isolated from microorganism strain *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) and are useful for the treatment of bacterial infections, viral infections and/or pain.

Detailed description of the invention

10

An embodiment of the present invention is a compound of the formula (I)



wherein

R1 is H, C(O)-(C₁-C₆)alkyl or C(O)-O-(C₁-C₆)alkyl;

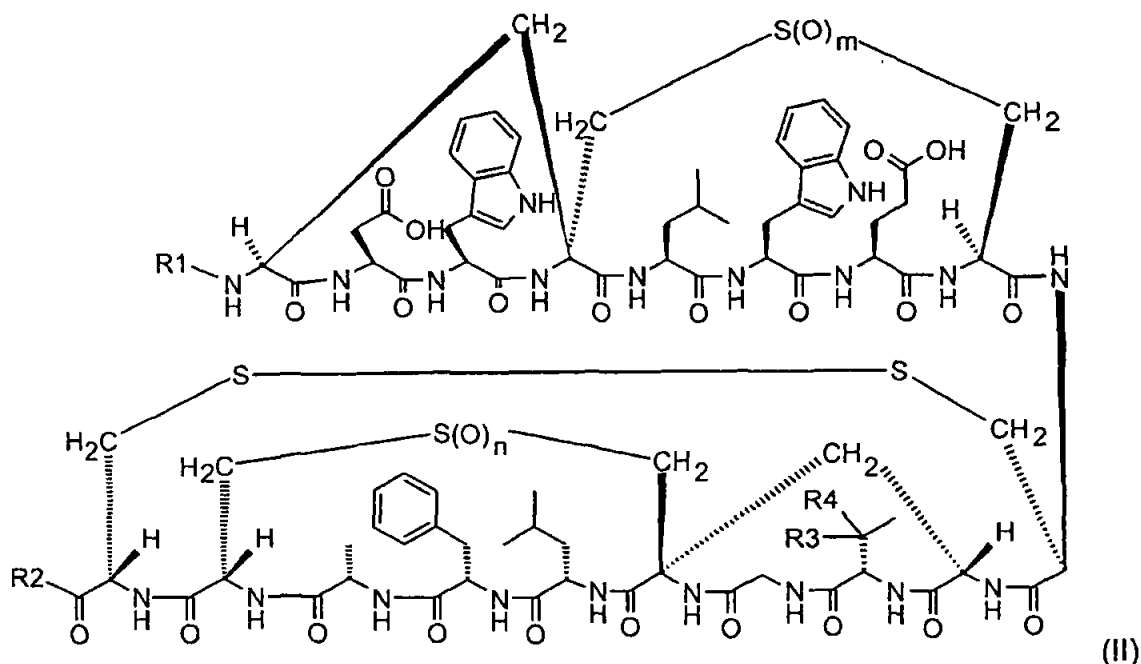
- 15 R2 is OH, NH₂, NH-(C₁-C₆)alkyl, NH-(C₁-C₄)alkylene-phenyl or NH-(C₁-C₄)alkylene-pyridyl;

R3 and R4 independently of each other H or OH, or R3 and R4 together are =O; and m and n are independently of one another 0, 1 or 2;

in any stereochemical form, or a mixture of any stereochemical forms in any ratio, or

a physiologically tolerable salt thereof.

In a further embodiment, the compound of the formula (I) is characterized by a compound of the formula (II)



wherein R1, R2, R3, R4, m and n are as defined above.

10 R1 is preferably H. R2 is preferably OH. R3 and R4 are preferably H or OH wherein if R3 is OH then R4 is H, and if R3 is H then R4 is OH, or R3 and R4 together are =O. More preferred, R3 and R4 are H or OH wherein if R3 is OH then R4 is H, and if R3 is H then R4 is OH.

15 Preferably, m and n are both 0, or m and n are both 2, or m is 0 and n is 2, or m is 2 and n is 0. Most preferred, m and n are both 0

A further embodiment of the present invention is a compound of the formula (I) or of the formula (II) wherein

R1 is H;

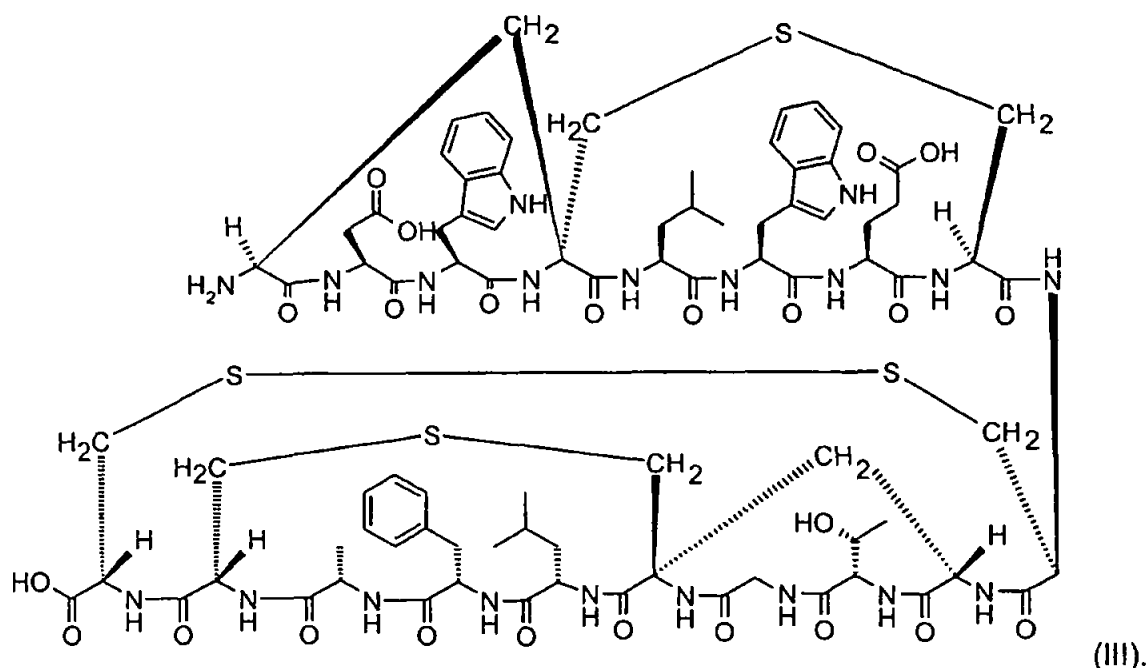
R2 is OH;

20 R3 and R4 are H or OH wherein if R3 is OH then R4 is H, and if R3 is H then R4 is OH; and

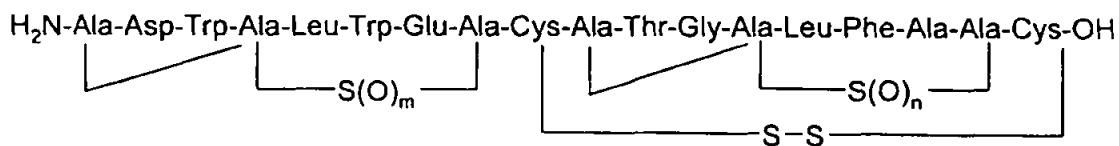
m and n are independently of one another 0, 1 or 2, preferably m and n are both 0,

or m and n are both 2, or m is 0 and n is 2, or m is 2 and n is 0, particularly preferred
 m and n are both 0;
 or a physiologically tolerable salt thereof.

- 5 Most preferred, compound (I) is characterized by a compound of the formula (III)



For a further characterization of the compounds of the present invention, the peptide
 residues were converted back to their probable precursors from ribosomal peptide
 10 synthesis. The alpha, alpha-disubstituted amino acids in residues 1 and 10 are
 without precedence in the literature. Said amino acid may be described as an Ala
 residue bridged by a methylene group and substituted at the beta-position, as shown
 below:



15

The present invention furthermore relates to all obvious chemical equivalents of the
 compounds of the formulae (I), (II) and (III) according to the invention. These
 equivalents are compounds which exhibit only a slight chemical difference, and have

the same pharmacological effect, or which are converted into the compounds according to the invention under mild conditions. Said equivalents also include, for example, salts, reduction products, oxidation products, partial hydrolytic processes esters, ethers, acetals or amides of the compounds of the formulae (I), (II) and (III) as well as equivalents which the skilled person can prepare using standard methods and, in addition to this, all the optical antipodes and diastereomers and all the stereoisomeric forms.

Unless otherwise indicated, the chiral centers in the compounds of the formula (I) can be present in the R configuration or in the S configuration. The invention relates both to the optically pure compounds and to stereoisomeric mixtures, such as enantiomeric mixtures and diastereomeric mixtures.

Physiologically tolerated salts of compounds of the formulae (I), (II) and (III) are understood as being both their organic salts and their inorganic salts, as are described in Remington's Pharmaceutical Sciences (17th edition, page 1418 (1985)). Because of their physical and chemical stability and their solubility, sodium, potassium, calcium and ammonium salts are preferred, inter alia, for acid groups; salts of hydrochloric acid, sulfuric acid or phosphoric acid, or of carboxylic acids or sulfonic acids, such as acetic acid, citric acid, benzoic acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid and p-toluenesulfonic acid, are preferred, inter alia, for basic groups.

The compounds of the present have been named Labyrinthopeptins throughout the text.

The invention also relates to a process for preparing a compound of the formula (I) wherein m and n are independently of one another 0, 1 or 2, which comprises

- a) the strain *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), or one of its variants and/or mutants, being fermented under suitable conditions in a culture medium until one or more of the compounds of the formula (I) accrue(s) in the culture medium,
- b) a compound of the formula (I) being isolated from the culture medium, and
- c) the compound of the formula (I) being derivatized, where appropriate, and/or, where appropriate, being converted into a physiologically tolerated salt.

The invention preferably relates to a process for preparing a compound of the formula (I) wherein the compound (I) is characterized by a compound of the formula (II), more preferably the invention relates to a process for preparing a compound of the formula (I) or preferred (II) wherein m and n are both 0, or m and n are both 2, or m is 0 and n is 2, or m is 2 and n is 0.

Particularly preferred, the invention preferably relates to a process for preparing a compound of the formula (I) wherein the compound (I) is characterized by a compound of the formula (III).

The culture medium is a nutrient solution or a solid medium containing at least one customary carbon source and at least one nitrogen source as well as one or more customary inorganic salts.

The process according to the invention can be used for fermenting on a laboratory scale (milliliter to liter scale) and for fermenting on an industrial scale (cubic meter scale).

Suitable carbon sources for the fermentation are assimilable carbohydrates and sugar alcohols, such as glucose, lactose, sucrose or D-mannitol, as well as carbohydrate-containing natural products, such as malt extract or yeast extract. Examples of nitrogen-containing nutrients are amino acids; peptides and proteins and also their breakdown products, for example casein, peptones or tryptones; meat extracts; yeast extracts; gluten; ground seeds, for example from corn, wheat, beans, soya or the cotton plant; distillation residues from producing alcohol; meat meals; yeast extracts; ammonium salts; nitrates. Preference is given to the nitrogen source being one or more peptide(s) which has/have been obtained synthetically or biosynthetically. Examples of inorganic salts are chlorides, carbonates, sulfates or phosphates of the alkali metals, the alkaline earth metals, iron, zinc, cobalt and manganese. Examples of trace elements are cobalt and manganese.

Conditions which are especially suitable for forming the Labyrinthopeptins according to the invention are as follows: from 0.05 to 5%, preferably from 0.1 to 2.5%, yeast

extract; from 0.2 to 5.0%, preferably from 0.1 to 2%, casitone; from 0.02 to 1.0%, preferably from 0.05 to 0.5%, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; from 0.02 to 1.5%, preferably from 0.05 to 0.7%, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ and from 0.00001% to 0.001% cyanocobalamin. The percentage values which are given are in each case based on the weight of the total
5 nutrient solution.

The microorganism is cultured aerobically, that is, for example, submerged while being shaken or stirred in shaking flasks or fermenters, or on solid medium, where appropriate while air or oxygen is being passed in. The microorganism can be
10 cultured in a temperature range of from about 18 to 35°C, preferably at from about 20 to 32°C, in particular at from 27 to 30°C. The pH range should be between 4 and 10, preferably between 6.5 and 7.5. The microorganism is generally cultured under these conditions for a period of from 2 to 10 days, preferably of from 72 to 168 hours. The microorganism is advantageously cultured in several steps, i.e. one
15 or more preliminary cultures are initially prepared in a liquid nutrient medium, with these preliminary cultures then being inoculated into the actual production medium, i.e. the main culture, for example in a ratio by volume of from 1:10 to 1:100. The preliminary culture is obtained, for example, by inoculating the strain, in the form of vegetative cells or spores, into a nutrient solution and allowing it to grow for from
20 about 20 to 120 hours, preferably for from 48 to 96 hours. Vegetative cells and/or spores can be obtained, for example, by allowing the strain to grow for from about 1 to 15 days, preferably for from 4 to 10 days, on a solid or liquid nutrient substrate, for example yeast agar.

25 The Labyrinthopeptin derivatives can be isolated and purified from the culture medium using known methods and taking account of the chemical, physical and biological properties of the natural substances. HPLC was used to test the concentrations of the respective Labyrinthopeptin derivatives in the culture medium or in the individual isolation steps, with the quantity of the substance formed
30 expediently being compared with a calibration solution.

For the isolation, the culture broth or the culture together with the solid medium is optionally lyophilized, and the Labyrinthopeptin derivatives are extracted from the

lyophilizate using an organic solvent or a mixture of water and an organic solvent, preferably containing 50-90% organic solvent. Examples of organic solvents are methanol and 2-propanol. The organic solvent phase contains the natural substances according to the invention; it is concentrated, where appropriate, in vacuo and subjected to further purification.

The further purification of one or more compounds according to the invention is effected by chromatography on suitable materials, preferably, for example, on molecular sieves, on silica gel, on aluminum oxide, on ion exchangers or on adsorber resins or on reversed phases (RPs). This chromatography is used to separate the Labyrinthopeptin derivatives. The Labyrinthopeptin derivatives are chromatographed using buffered, basic or acidified aqueous solutions or mixtures of aqueous and organic solutions.

Mixtures of aqueous or organic solutions are understood as being all water-miscible organic solvents, preferably methanol, 2-propanol or acetonitrile, at a concentration of from 5 to 99% organic solvent, preferably from 5 to 50% organic solvent, or else all buffered aqueous solutions which are miscible with organic solvents. The buffers which are to be used are the same as specified above.

The Labyrinthopeptin derivatives are separated, on the basis of their differing polarities, by means of reversed phase chromatography, for example on MCI (adsorber resin, Mitsubishi, Japan) or Amberlite XAD (TOSOHAAS), or on other hydrophobic materials, for example on RP-8 or RP-18 phases. In addition, the separation can be effected by means of normal-phase chromatography, for example on silica gel, aluminum oxide and the like.

Buffered, basic or acidified aqueous solutions are understood as being, for example, water, phosphate buffer, ammonium acetate and citrate buffer at a concentration of up to 0.5 M, as well as formic acid, acetic acid, trifluoroacetic acid, ammonia and triethylamine, or all commercially available acids and bases known to the skilled person, preferably at a concentration of up to 1%. In the case of buffered aqueous solutions, particular preference is given to 0.1% ammonium acetate.

The chromatography can be carried out using a gradient which began with 100% water and ended with 100% organic solvent; the chromatography was preferably run with a linear gradient of from 5 to 95% acetonitrile.

5 Alternatively, it is also possible to carry out a gel chromatography or chromatography on hydrophobic phases. The gel chromatography can e.g. be carried out on polyacrylamide gels or copolymer gels. The sequence of the abovementioned chromatographic steps can be reversed.

10 Insofar as Labyrinthopeptins are present as stereoisomers, they can be separated using known methods, for example by means of separation using a chiral column.

The derivatization of the OH group to an ester or ether derivative is effected using methods which are known per se (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4th edition, 1992), for example by means of reaction with an acid anhydride or by reaction with an di-alkyl carbonate or di-alkyl sulfate. Derivatization of the COOH group to an ester or amid derivative is effected using methods which are known per se (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4th edition, 1992), for example by means of reaction with ammonia to the respective
15 CONH₂ group, or with an optionally activated alkyl compound to the respective alkyl ester. Oxidation of -CH₂-S-CH₂- groups to a -CH₂-S(O)-CH₂- or a -CH₂-S(O)₂-CH₂- group can be achieved upon exposing the respective Labyrinthopeptin derivative to oxygen or air.
20

25 An isolate of the microorganism strain *Actinomadura namibiensis* was deposited under identification reference FH-A 1198 in the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen [German Collection of Microorganisms and Cell Cultures] GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Germany, in accordance with the rules of the Budapest treaty, on 23.01.1991 under the following
30 number: DSM 6313. Microorganism strain *Actinomadura namibiensis* is further described by Wink et al. in International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2003, 53, 721-724.

Instead of the strain *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), it is also possible to use its mutants and/or variants which synthesize one or more of the compounds according to the invention.

- 5 A mutant is a microorganism in which one or more genes in the genome has/have been modified, with the gene, or the genes, which is/are responsible for the ability of the organism to produce the compound according to the invention remaining functional and heritable.
- 10 Such mutants can be produced, in a manner known per se, using physical means, for example irradiation, as with ultraviolet rays or X-rays, or chemical mutagens, such as ethyl methanesulfonate (EMS); 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (MOB) or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), or as described by Brock et al. in "Biology of Microorganisms", Prentice Hall, pages 238-247 (1984).

- 15 A variant is a phenotype of the microorganism. Microorganisms have the ability to adapt to their environment and therefore exhibit highly developed physiological flexibility. All the cells of the microorganism are involved in the phenotypic adaptation, with the nature of the change not being genetically conditioned and
- 20 being reversible under altered conditions (H. Stolp, Microbial ecology: organism, habitats, activities. Cambridge University Press, Cambridge, GB, page 180, 1988).

- Screening for mutants and/or variants which synthesize one or more of the compounds according to the invention is achieved by optionally lyophilizing the
- 25 fermentation medium and extracting the lyophilizate or the fermentation broth with an organic solvent or a mixture of water and an organic solvent as defined above, and analyzing by means of HPLC or TLC or by testing the biological activity.

- The fermentation conditions may be applied to *Actinomadura namibiensis* (DSM
- 30 6313) and for mutants and/or variants thereof.

A further embodiment of the present invention is the use of a compound of the formula (I), preferably a compound of the formula (II) or (III), as defined above, for the treatment of bacterial infections, especially bacterial infections caused by Gram-

positive bacteria, for the treatment of viral infections and/or for the treatment of pain, especially neuropathic pain or inflammatory triggered pain.

5 The above described medicament (also referred to as pharmaceutical preparation or pharmaceutical composition) contains an effective amount of at least one compound of the formula (I), in any stereochemical form, or a mixture of any stereochemical forms in any ratio, or a physiologically tolerable salt or chemical equivalent thereof, as described above, and at least one pharmaceutically acceptable carrier, preferably one or more pharmaceutically acceptable carrier substances (or vehicles) and/or
10 additives (or excipients).

The medicament can be administered orally, for example in the form of pills, tablets, lacquered tablets, coated tablets, granules, hard and soft gelatin capsules, solutions, syrups, emulsions, suspensions or aerosol mixtures. Administration, however, can
15 also be carried out rectally, for example in the form of suppositories, or parenterally, for example intravenously, intramuscularly or subcutaneously, in the form of injection solutions or infusion solutions, microcapsules, implants or rods, or percutaneously or topically, for example in the form of ointments, solutions or tinctures, or in other ways, for example in the form of aerosols or nasal sprays.

20

The medicaments according to the invention are prepared in a manner known per se and familiar to one skilled in the art, pharmaceutically acceptable inert inorganic and/or organic carrier substances and/or additives being used in addition to the compound(s) of the formulae (I) in any stereochemical form, or a mixture of any
25 stereochemical forms in any ratio, or a physiologically tolerable salt or chemical equivalent thereof, as described above. For the production of pills, tablets, coated tablets and hard gelatin capsules it is possible to use, for example, lactose, corn starch or derivatives thereof, talc, stearic acid or its salts, etc. Carrier substances for soft gelatin capsules and suppositories are, for example, fats, waxes, semisolid and
30 liquid polyols, natural or hardened oils, etc. Suitable carrier substances for the production of solutions, for example injection solutions, or of emulsions or syrups are, for example, water, saline, alcohols, glycerol, polyols, sucrose, invert sugar, glucose, vegetable oils, etc. Suitable carrier substances for microcapsules, implants or rods are, for example, copolymers of glycolic acid and lactic acid. The

pharmaceutical preparations normally contain about 0.5 to about 90 % by weight of a compound of the formula (I) and/or their physiologically acceptable salts and/or their prodrugs. The amount of the active ingredient of the formula (I) in any stereochemical form, or a mixture of any stereochemical forms in any ratio, or a physiologically tolerable salt or chemical equivalent thereof, as described above, in the medicaments normally is from about 0.5 to about 1000 mg, preferably from about 1 to about 500 mg.

In addition to the active ingredients of the formula (I) in any stereochemical form, or a mixture of any stereochemical forms in any ratio, or a physiologically tolerable salt or chemical equivalent thereof, as described above, and to carrier substances, the pharmaceutical preparations can contain one or more additives such as, for example, fillers, disintegrants, binders, lubricants, wetting agents, stabilizers, emulsifiers, preservatives, sweeteners, colorants, flavorings, aromatizers,

thickeners, diluents, buffer substances, solvents, solubilizers, agents for achieving a depot effect, salts for altering the osmotic pressure, coating agents or antioxidants.

They can also contain two or more compounds of the formulae (I) in any stereochemical form, or a mixture of any stereochemical forms in any ratio, or a physiologically tolerable salt or chemical equivalent thereof. In case a

pharmaceutical preparation contains two or more compounds of the formulae (I), the selection of the individual compounds can aim at a specific overall pharmacological profile of the pharmaceutical preparation. For example, a highly potent compound with a shorter duration of action may be combined with a long-acting compound of lower potency. The flexibility permitted with respect to the choice of substituents in the compounds of the formulae (I) allows a great deal of control over the biological and physico-chemical properties of the compounds and thus allows the selection of such desired compounds. Furthermore, in addition to at least one compound of the formula (I), the pharmaceutical preparations can also contain one or more other therapeutically or prophylactically active ingredients.

When using the compounds of the formulae (I) the dose can vary within wide limits and, as is customary and is known to the physician, is to be suited to the individual conditions in each individual case. It depends, for example, on the specific compound employed, on the nature and severity of the disease to be treated, on the

mode and the schedule of administration, or on whether an acute or chronic condition is treated or whether prophylaxis is carried out. An appropriate dosage can be established using clinical approaches well known in the medical art. In general, the daily dose for achieving the desired results in an adult weighing about 75 kg is
5 from about 0.01 to about 100 mg/kg, preferably from about 0.1 to about 50 mg/kg, in particular from about 0.1 to about 10 mg/kg, (in each case in mg per kg of body weight). The daily dose can be divided, in particular in the case of the administration of relatively large amounts, into several, for example 2, 3 or 4, part administrations. As usual, depending on individual behaviour it may be necessary to deviate upwards
10 or downwards from the daily dose indicated.

Example 1: Preparation of a cryoculture of *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313)

100 ml culture medium (10 g starch, 2 g yeast extract, 10 g glucose, 10 g glycerine,
15 2.5 g cornsteep powder, 2 g peptone, 1 g NaCl, 3g CaCO₃ in 1 l tap water, pH 7.2 before sterilization) were seeded with the strain *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) in a sterile 500 ml Erlenmeyer flask and incubated for 72 hours at 27°C and 120 rpm on a shaker. Subsequently, 1 ml of the culture and 1 ml sterile conservation solution (20 g glycerine, 10 g saccharose, 70 ml de-ionised water) were mixed and
20 stored at -80°C. Alternatively, small pieces of a well-grown culture on agar were transferred Cryotubes® (Vangard International) with 1.5 ml 50% sterile glycerine solution and stored at -196°C in liquid nitrogen.

Example 2: Preparation of Labyrinthopeptins

25 A sterile 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of the culture medium described in Example 1 was seeded with a culture of *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) which was grown on an agar plate and was incubated at 27°C and 120 rpm on a shaker. After 72 hours, further Erlenmeyer flasks containing the same culture
30 medium in the same amount were seeded with 2 ml of this pre-culture each and incubated under identical conditions for 168 hours. Alternatively, a 300 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of the culture medium described in Example 1 was seeded with a culture of *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) and incubated at 25°C and 180 rpm. After 72 hours, further Erlenmeyer flasks containing the same

culture medium in the same amount were seeded with 5 ml of this pre-culture each and incubated under identical conditions for 168 hours.

Example 3: Isolation of Labyrinthopeptins

5

2 % Hyflo Super-cel diatomaceous earth (Hyflo Supercell; VWR, Darmstadt, Germany) were given to 10 l of the culture broth containing according to Example 2 and the culture was filtrated through a filter press in order to separate the culture solution from the mycel. The filtrate was given on to column containing 1 l Amberlite
10 XAD-16 resin (column diameter: 5,5 cm, column height: 42 cm), and washed with 5 l deonised water and 5 l 20 % methanol in water. The Labyrinthopeptin was eluted with 5 l 60 % methanol in water and 5 l 80 % methanol in water. The Labyrinthopeptin containing fractions were identified by HPLC-DAD and LC-ESI-MS, collectively concentrated on a rotary evaporator until an aqueous residue was
15 obtained and subsequently freeze-dried. 300 mg crude product was obtained.

Example 4: High performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) of Labyrinthopeptins

20 Column: Nucleosil 100 - C₁₈; 20 + 125 mm × 4.6 mm, 5 μ (Machery-Nagel)
Mobile phase: 0.1% H₃PO₄ in water (Eluent A) and acetonitrile (Eluent B)
linear gradient from 0% to 100 % Eluent B in Eluent A
over a period of 15 minutes
Flow: 2 ml per minute

25

Detection by UV/Vis absorption yielded peaks at 210, 230, 260, 280, 310, 360, 435 und 500 nm.

The retention time of the Labyrinthopeptin of the formula (II): 7.75 minutes.

30

Example 5: High performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectroscopy (HPLC-ESI-MS) of Labyrinthopeptins

Column: Purospher RP-18e; 125 mm × 4 mm, 5 μ (Agilent)

Mobile phase: 0.1% trifluoro acetic acid in Wasser (Eluent A) and
0.1% trifluoro acetic acid in Acetonitril (Eluent B)
linear gradient from 5% to 100 % Eluent B in Eluent A
over a period of 10 minutes

- 5 Flow: 1.5 ml per minute. The flow to the ES interface of the mass
spectrometer was reduced to 0.4 ml per minute via a T splitter.

Detection by UV absorbtion at 210 nm and ESI-MS (positive mode) wherein an ion
trap was used as mass analyzer.

10

The retention time of the Labyrinthopeptin of the formula (III) was 5.9 minutes. The
molecular mass was 1922 Da.

Example 6: Purification of Labyrinthopeptins

15

The Labyrinthopeptin crude product obtained according to Example 3 (300 mg) was
dissolved in a mixture of dimethylsulfoxide, methanol and water (1:3:6) and the
components were separated via chromatography on a Nucleosil 100 - C₁₈ column
(particle size: 10 µ, column size: 250 × 16 mm) using isocratic elution (water + 0.1 %
20 formic acid / methanol 35:65) at a flow rate of 20 ml per minute. The fractions were
analyzed with HPLC (cf. Example 4). 62 mg Labyrinthopeptin of the formula (III) was
obtained in 99% purity.

Example 7: General characteristics of Labyrinthopeptin (III)

25

The compound of the formula (III) was oxidated upon exposure to air to the
respective sulfoxides. The compound of the formula (III) contains 2 *cis*-amides
between ²Asp-³Trp and ¹¹Thr-¹²Gly.

30 Example 8: High resolving ESI-FTICR-mass spectrometry

A solution of the Labyrinthopeptin of the formula (III) in Methanol (c = 0.2 mg/ml) was
admitted through a syringe pump at a flow rate of 2 µl/min to a Bruker Apex III

FTICR MS (7T magnet) equipped with an electrospray source. Spectra were recorded in the positive mode using an external calibration.

m/z observed in Da ($z=2$, $M+2Na^+$ ion)	984.3333
Exact, mono-isotopic mass of neutral [M]	1922.6872
Theoretical mass [M] for $C_{85}H_{110}N_{20}O_{24}S_4$	1922.6885
Molecular formula	$C_{85}H_{110}N_{20}O_{24}S_4$

5

Example 9: Amino acid analysis

Hydrolysis: Labyrinthopeptin (III) (0.05 mg) was hydrolyzed in nitrogen atmosphere with 6 N HCl, 5% phenole at 110°C for 24 h. The hydrolysate was dried in a stream of nitrogen.

10

Achiral GC-MS: The hydrolysate was heated with bis-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)/Acetonitril (1:1) at 150°C for 4 h. For GC-MS experiments a DB5-fused-silica-capillary ($l = 15 \text{ m} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$ fused silica coated with dimethyl-(5%-phenylmethyl)-polysiloxane, $d_f = 0.10 \text{ }\mu\text{m}$; temperature programme: $T = 65^\circ/3'/6/280^\circ\text{C}$) was used.

15

Chiral GC-MS: The hydrolysate was esterified with 200 μl 2 N HCl in ethanol at 110°C for 30 min and dried. Subsequently, the mixture was acylated with 25 μl TFAA in 100 μl dichloromethane at 110°C 10 min for and dried. For GC-MS a fused-silica-capillary was used ($l = 22 \text{ m} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$ fused silica coated with chirasil-S-Val (Machery-Nagel), $d_f = 0.13 \text{ }\mu\text{m}$; temperature programme: $T = 55^\circ/3'/3,2/180^\circ\text{C}$).

20

		configuration
Amino acids	1 Ala, 1 Thr, 2 Leu, 1 Asp, 2 Cys, 1 Phe, 1 Glu, 2 Trp, 1 Gly	all S-amino acids

25 Example 10: NMR spectroscopy

2-D NMR spectra (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC) were measured on an AMX 600 MHz NMR spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a 5 mm Z-Grad triple resonance probe head and on a DRX500 NMR spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a 5 mm Z-Grad broad band inverse probehead. The following table shows the signals obtained in the measurements.

NMR data for the Labyrinthopeptin of the formula (III) in DMSO-d₆:

¹ H	0.68; 0.71; 0.75; 0.78; 1.05; 1.07; 1.10; 1.35; 1.40; 1.42; 1.49; 1.90; 1.96; 2.00; 2.10; 2.17; 2.26; 2.77; 2.86; 2.90; 2.97; 3.03; 3.14; 3.16; 3.18; 3.18; 3.20; 3.24; 3.29; 3.30; 3.39; 3.59; 3.67; 3.67; 3.72; 3.99; 4.02; 4.03; 4.10; 4.13; 4.14; 4.16; 4.19; 4.34; 4.36; 4.45; 4.49; 4.59; 6.96; 7.26; 7.00; 7.04; 7.08; 7.08; 7.10; 7.18; 7.22; 7.23; 7.24; 7.24; 7.31; 7.35; 7.36; 7.42; 7.51; 7.53; 7.65; 7.65; 7.69; 7.77; 7.84; 7.98; 8.00; 8.01; 8.56; 10.80; 10.81.
¹³ C	19.7; 21.3; 21.4; 22.6; 23.04; 23.2; 23.7; 26.4; 26.4; 27.1; 33.4; 35.2; 35.4; 36.7; 38.3; 40.0; 40.5; 40.7; 40.8; 40.8; 41.2; 41.2; 43.4; 48.4; 48.7; 49.0; 51.2; 51.4; 52.5; 52.6; 52.7; 53.2; 53.5; 54.0; 56.9; 60.0; 60.3; 66.4; 109.8; 110.6; 111.2; 111.2; 117.4; 118.1; 118.1; 118.2; 120.7; 120.7; 122.1; 123.4; 126.5; 127.2; 127.3; 127.8; 129.4; 136.0; 136.1; 136.6; 140.8; 169.4; 173.0; 174.3; 176.9.

Example 11: X-ray crystallography of Labyrinthopeptin (III)

10

Crystallization conditions: The protein was dissolved in 0.02 M Tris pH 8.2 (concentration 7 mg/ml). Crystals grew at room temperature by vapour drop diffusion from a 1:1 mixture of the protein solution with a solution of 60% ethanol, 0.75% PEG 6000, 0.025 M sodium acetate and 0.05 M sodium chloride. Crystals grew within about one week.

15

Measurement: X-ray data were collected on a Bruker 3-circle diffractometer with rotating anode and mirror monochromated CuK-alpha radiation. Intensities were collected on a SMART 6000 CCD area detector.

20

Crystal data:

Formula	Na N ₂₀ C ₈₅ S ₄ O ₄₈	Na C ₈₅ N ₂₀ O ₂₄ S ₄
Formula weight	2220.29	1834.82
Crystal system	orthorhombic	
Space group	<i>P</i> 21 21 2 (no. 18)	
Unit cell dimensions	<i>a</i> = 41.1360 Å	
	<i>b</i> = 12.8850 Å	
	<i>c</i> = 25.5900 Å	
Cell volume	13563.66 Å ³	
Z	4	
Density, calculated	1.087 g/cm ³	
Pearson code	oP732	
Formula type	NO4P20Q48R85	
Wyckoff sequence	<i>c</i> ¹⁸¹ <i>b</i> ³ <i>a</i>	

Atomic coordinates:

No.	Atom	AtomNo.	x	y	z	e ⁻ -density
0	Na	NA	0.26282	1.11533	-0.20024	1.0
1	N	18NH	0.16643	0.62593	0.30751	
2	C	18Ca	0.15933	0.69120	0.26221	
3	C	18Cb	0.12264	0.69329	0.24928	
4	S	18Sg	0.11248	0.78619	0.19945	
5	C	18CO	0.16446	0.80225	0.28144	
6	O	18OC1	0.15211	0.83361	0.32212	
7	O	18OC3	0.17868	0.86558	0.25381	0.290
8	O	18OC2	0.18240	0.86116	0.25780	0.710
9	N	17NH2	0.17255	0.50082	0.39461	0.570
10	C	17Ca2	0.19839	0.49670	0.35604	0.570
11	N	17NH1	0.17994	0.49779	0.40196	0.430
12	C	17Ca1	0.20056	0.49833	0.35678	0.430
13	C	17Cb	0.20165	0.38479	0.33630	1.0
14	S	13S1	0.16523	0.32006	0.32001	
15	C	17CO	0.19312	0.57036	0.31036	
16	O	17OC	0.21276	0.57136	0.27366	
17	N	16NH1	0.11776	0.48825	0.45694	0.570
18	C	16Ca1	0.14725	0.54296	0.47554	0.570
19	C	16Cb2	0.14824	0.52387	0.53451	0.570
20	C	16CO2	0.17744	0.51223	0.44580	0.570

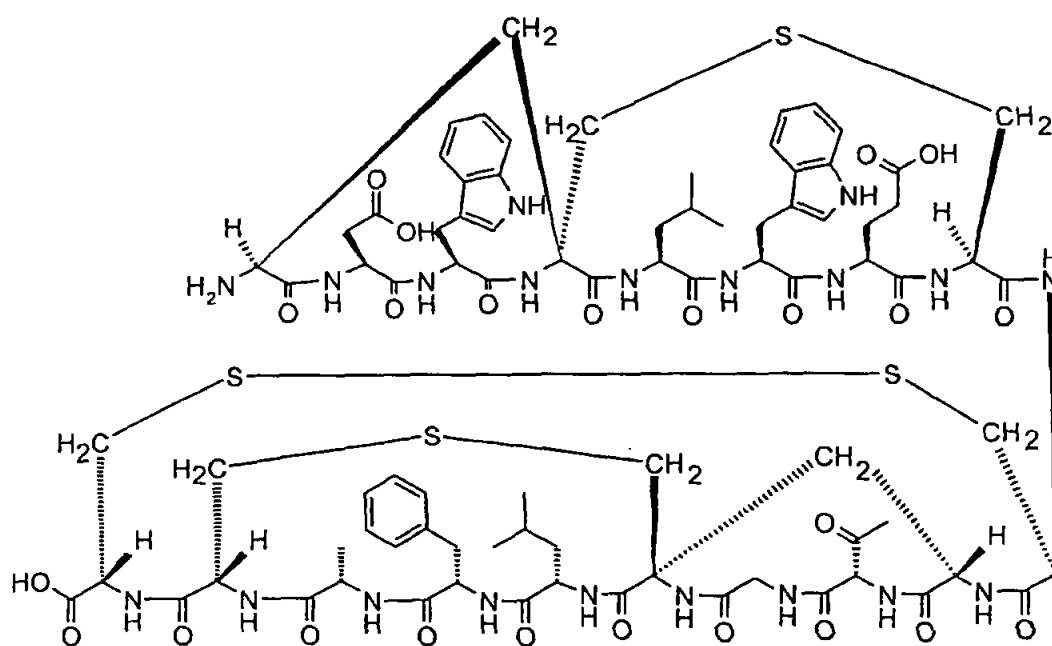
21	O	16OC2	0.20586	0.50283	0.46026	0.570
22	N	16NH2	0.12522	0.46605	0.47460	0.430
23	C	16Ca2	0.15695	0.50741	0.49039	0.430
24	C	16Cb1	0.17666	0.42678	0.52110	0.430
25	C	16CO1	0.17829	0.54862	0.44623	0.430
26	O	16OC1	0.19399	0.62818	0.45350	0.430
27	N	15NH	0.08606	0.28654	0.38875	1.0
28	C	15Ca	0.08545	0.33846	0.43783	
29	C	15Cb	0.07342	0.26519	0.48191	
30	C	15Cg	0.07342	0.31743	0.53443	
31	C	15Cd1	0.09641	0.30051	0.57015	
32	C	15Ce1	0.09892	0.34692	0.61802	
33	C	15Cz	0.07361	0.41607	0.62963	
34	C	15Ce2	0.04891	0.43679	0.59512	
35	C	15Cd2	0.04787	0.38914	0.54580	
36	C	15CO2	0.11795	0.38518	0.45303	0.570
37	O	15OC2	0.14083	0.32503	0.46100	0.570
38	C	15CO1	0.11985	0.37400	0.45272	0.430
39	O	15OC1	0.14260	0.31215	0.44467	0.430
40	N	14NH	0.09663	0.22957	0.28367	1.0
41	C	14Ca	0.06493	0.21832	0.30973	
42	C	14Cb	0.05881	0.10260	0.32228	
43	C	14Cg	0.06148	0.01917	0.28163	
44	C	14Cd1	0.05246	-0.08320	0.30793	
45	C	14Cd2	0.04038	0.05153	0.23556	
46	C	14CO	0.06073	0.27513	0.35936	
47	O	14OC	0.03420	0.31036	0.37413	
48	N	13NH	0.14348	0.21739	0.21016	
49	C	13Ca	0.13259	0.32131	0.22415	
50	C	13Cb	0.15887	0.37393	0.25639	
51	C	13CO	0.10174	0.31603	0.25729	
52	O	13OC	0.08431	0.39162	0.25920	
53	N	12NH	0.13789	0.04315	0.10383	
54	C	12Ca	0.14494	0.06092	0.15913	
55	C	12CO	0.12665	0.15374	0.17941	
56	O	12OC	0.09846	0.17540	0.16440	
57	N	11NH	0.18026	0.23392	0.10274	
58	C	11Ca	0.18245	0.14769	0.06491	
59	C	11Cb	0.21437	0.08040	0.07601	
60	O	11Og	0.24067	0.15367	0.06932	

61	C	11Cg	0.21483	-0.00652	0.03877	
62	C	11CO	0.15298	0.08188	0.06213	
63	O	11OC	0.14289	0.05192	0.01723	
64	N	10NH	0.15427	0.48630	0.10547	
65	C	10Ca	0.15553	0.39216	0.13693	
66	C	10Cb	0.12680	0.38774	0.17495	
67	C	10CO	0.15563	0.30214	0.09785	
68	O	10OC	0.13341	0.29174	0.06737	
69	N	9NH	0.15921	0.62732	0.02599	
70	C	9Ca	0.17078	0.65813	0.07761	
71	C	9Cb1	0.15364	0.74568	0.10696	0.650
72	S	9Sg2	0.11348	0.70773	0.12986	0.650
73	C	9Cb2	0.14430	0.73147	0.09699	0.350
74	S	9Sg1	0.15631	0.80140	0.15424	0.350
75	C	9CO	0.17309	0.56593	0.11423	1.0
76	O	9OC	0.19300	0.56593	0.15084	
77	N	8NH	0.18541	0.52953	-0.09746	
78	C	8Ca	0.16349	0.52728	-0.05346	
79	C	8Cb	0.15665	0.41428	-0.03791	
80	S	4S1	0.14207	0.33194	-0.08922	
81	C	8CO	0.17870	0.57819	-0.00528	
82	O	8OC	0.20763	0.56423	0.00430	
83	N	7NH	0.20632	0.49826	-0.20125	
84	C	7Ca	0.21045	0.59830	-0.17558	1.0
85	C	7Cb	0.20977	0.68941	-0.21403	
86	C	7Cg	0.23965	0.69290	-0.24846	
87	C	7Cd	0.27179	0.70780	-0.21942	
88	O	7O2	0.27356	0.77789	-0.18617	
89	O	7O2	0.29422	0.64688	-0.23185	
90	C	7CO	0.18551	0.60947	-0.13036	
91	O	7OC	0.16934	0.68669	-0.12474	
92	N	6NH	0.14508	0.31502	-0.23408	
93	C	6Ca	0.17581	0.36438	-0.24779	
94	C	6Cb	0.17865	0.38440	-0.30618	
95	C	6Cg	0.21065	0.42228	-0.32263	
96	C	6Cd1	0.24023	0.37835	-0.31634	
97	N	6Ne	0.26396	0.43927	-0.33810	
98	C	6Ce2	0.24957	0.52674	-0.35877	
99	C	6Cd2	0.21551	0.51704	-0.34959	
100	C	6Ce1	0.19382	0.59341	-0.36554	

101	C	6Cz1	0.20739	0.67707	-0.39101	
102	C	6Ch	0.24169	0.68111	-0.39910	
103	C	6Cz2	0.26459	0.61009	-0.38421	
104	C	6CO	0.17783	0.46644	-0.21817	
105	O	6OC	0.15276	0.51859	-0.21294	
106	N	5NH	0.09092	0.22755	-0.18031	
107	C	5Ca	0.10636	0.17447	-0.22462	
108	C	5Cb	0.08579	0.17788	-0.27331	
109	C	5Cg1	0.06556	0.08855	-0.29223	0.400
110	C	5Cd2	0.05562	0.00295	-0.25553	0.400
111	C	5CD3	0.03406	0.13232	-0.31950	0.400
112	C	5Cg2	0.05122	0.12511	-0.26843	0.600
113	C	5Cd1	0.05227	0.02119	-0.24021	0.600
114	C	5Cd2	0.03647	0.22422	-0.25795	0.600
115	C	5CO	0.14049	0.21405	-0.23552	1.0
116	O	5OC	0.16220	0.15250	-0.24447	
117	N	4NH	0.04424	0.29531	-0.10297	
118	C	4Ca	0.07828	0.26318	-0.08968	
119	C	4Cb	0.09901	0.36213	-0.08847	
120	C	4CO	0.09150	0.19084	-0.13193	
121	O	4OC	0.10378	0.10656	-0.12020	
122	N	3NH	-0.02049	0.37136	-0.10602	
123	C	3Ca	-0.01386	0.26387	-0.12087	
124	C	3Cb	-0.02263	0.24478	-0.17726	
125	C	3Cg	-0.05642	0.26752	-0.19336	
126	C	3Cd1	-0.08244	0.28646	-0.16303	
127	N	3Ne	-0.10966	0.30431	-0.19328	
128	C	3Ce2	-0.10052	0.29888	-0.24451	
129	C	3Cd2	-0.06697	0.27528	-0.24627	
130	C	3Ce1	-0.05275	0.26512	-0.29539	
131	C	3Cz1	-0.07001	0.27753	-0.33970	
132	C	3Ch	-0.10351	0.30097	-0.33634	
133	C	3Cz2	-0.11905	0.31339	-0.29019	
134	C	3CO	0.02125	0.22763	-0.11313	
135	O	3OC	0.02703	0.13349	-0.11547	
136	N	2NH	0.00873	0.33093	-0.00078	
137	C	2Ca	-0.02584	0.34024	-0.01079	
138	C	2Cb	-0.04293	0.38712	0.03587	
139	C	2Cg	-0.07852	0.41234	0.02763	
140	O	2Od1	-0.09430	0.35452	-0.00285	

141	O	2Od2	-0.09060	0.48825	0.05303	
142	C	2CO	-0.02912	0.40784	-0.06006	
143	O	2OC	-0.03851	0.49903	-0.05444	
144	N	1NH	0.07381	0.20163	0.05701	
145	C	1Ca	0.06250	0.25417	0.00903	
146	C	1Cb	0.07969	0.20450	-0.03763	
147	C	1CO	0.02526	0.24331	0.00649	
148	O	1OC	0.01235	0.15545	0.00653	

Example 12: Oxidation of Labyrinthopeptin (III)



- 5 50 mg Labyrinthopeptin (III) (0.026 mmol) were dissolved in 1 ml DMSO and mixed with 11 mg 1-Hydroxy-1-oxide-1,2-Benziodoxol-3(1H)-one (IBX, 0.039 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 6 h at 40 °C and further 12 h at room temperature, and subsequently purified by reversed-phase HPLC on a Phenomenex Luna® Axia 5 μ m C18 (2) column (dimension: 100 mm x 30 mm) with a XTerra®
- 10 Prep MS C18 10 μ m pre-column (Waters, Dimension: 19 x 10 mm). A gradient of 5% to 95% acetonitrile in water over 30 min (containing 0.1% ammonium acetat, pH 7.0) was used as the eluent. Column flow (60 ml/min) was fractioned and by UV detection. Fraction 7 to 11 contained the desired compound. The said fractions yielded 25 mg (50 %) after lyophilization. The product was characterized by mass
- 15 spectroscopy (Bruker Daltonics MicroTof).

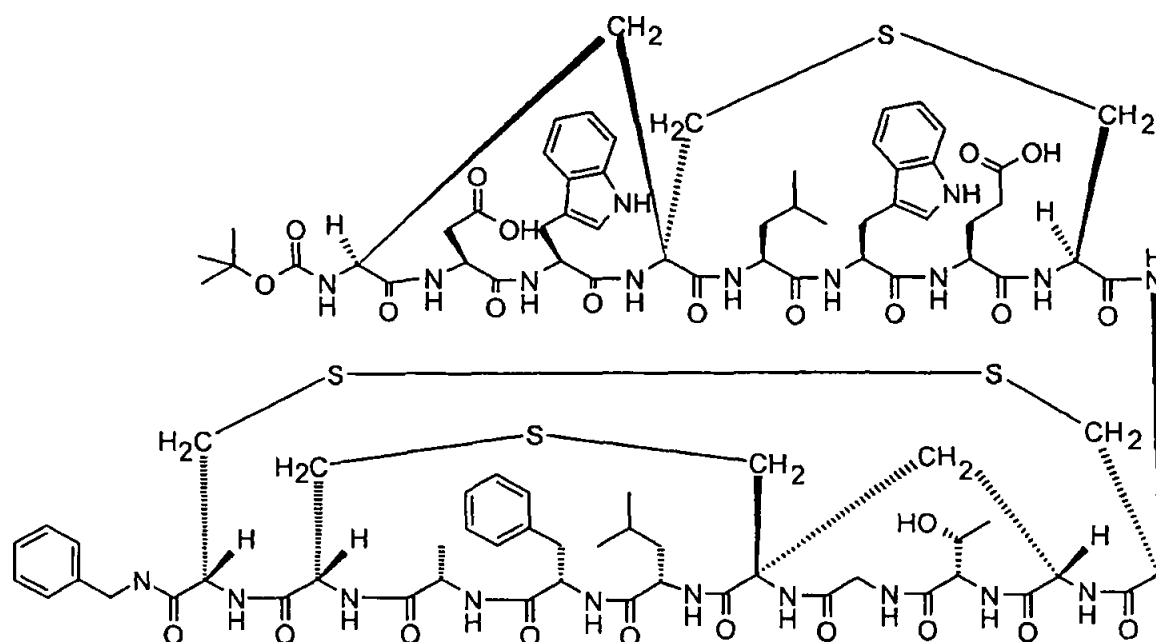
UV: 222 sh, 278 nm

ESI-MS: MW = 1920.66518 (mono MW)

Molecular formula: C₈₅H₁₀₈N₂₀O₂₄S₄

5 Molecular weight (MW) = 1922.2

Example 13: Peptid synthesis on the C-terminal end of Labyrinthopeptins (III)



- 10 40 mg Labyrinthopeptin (III) (0.021 mmol) were dissolved in 2 ml abs. dimethylformamid and treated with 10 mg (0.045 mmol) di-*tert*-butyl-dicarbonate (Boc₂O) and 7 mg (0.054 mmol) diisopropylethylamin for 1 h at room temperature. Subsequently, 6.8 mg (0.063 mmol) benzylamin and 50 µl (0.072 mmol) a 50 %
- 15 mixture was purified via reversed-phase HPLC on a Waters XBridge Shield® 5 µm C18 Säule (dimension: 100 mm x 30 mm) containing a XBridge Shield® C18 10 µm pre-column (Waters, dimension: 19 x 10 mm). A gradient of 5% to 95% acetonitrile in water over 30 min (contaiming 0.1% ammonium acetat, pH 7.0) was used as the eluent. Column flow (60 ml/min) was fractioned and by UV detection. Fraktions 30
- 20 and 31 were combined and yielded 9.6 mg (22 %) of the desired compound. The product was characterized by mass spectroscopy (Bruker Daltonics MicroTof).

UV: 222 sh, 276 nm

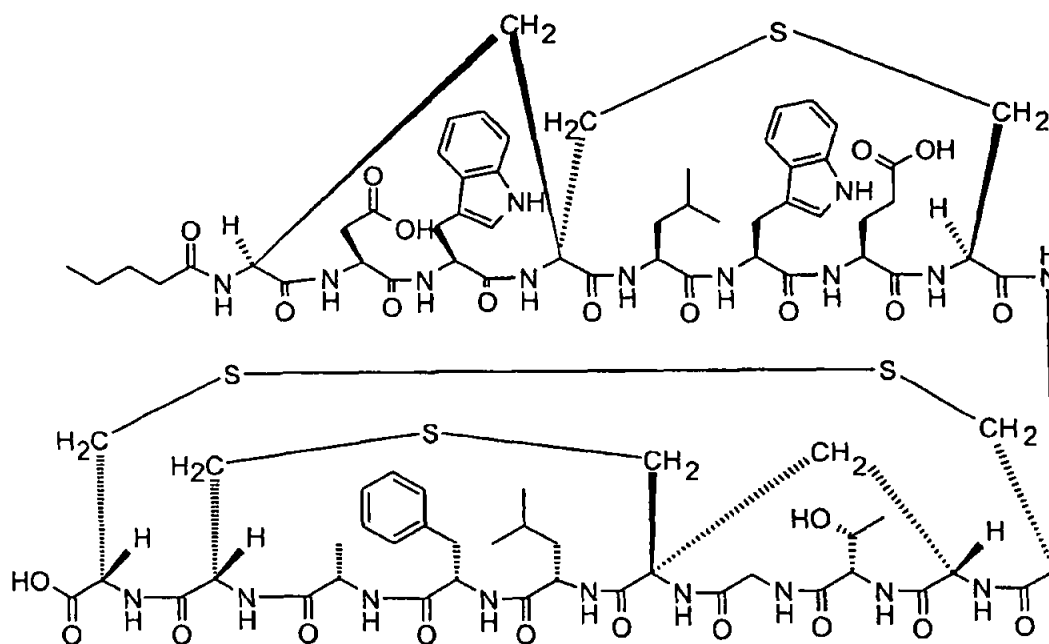
ESI-MS: MW = 2111.79018 (mono MW)

Molecular formula: C₉₇H₁₂₅N₂₁O₂₅S₄

Molecular weight (MW) = 2113.5

5

Example 14: Peptid synthesis on the N-terminal end of Labyrinthopeptins (III)



5 mg (0.028 mmol) 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (CDMT) were dissolved in 2
 10 ml abs. dimethylformamid and mixed with 8.6 mg (0.085 mmol) N-methylmorpholine (NMM). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. 3.3 mg (0.028 mmol) n-capronic acid was added and the mixture stirred for further 30 min at room temperature. Subsequently, 40 mg (0.021 mmol) Labyrinthopeptin (III) was added and the resulting mixture was stirred for further 2 h at room temperature. The
 15 reaction mixture was purified via reversed-phase HPLC on a Waters XBridge Shield® 5 µm C18 Säule (dimension: 100 mm x 30 mm) with a XBridge Shield® C18 10 µm pre-column (Waters, dimension: 19 x 10 mm). A gradient of 5% to 95% acetonitrile in water over 30 min (containing 0.1% formic acid, pH 2.0) was used as the eluent. Column flow (60 ml/min) was fractioned and by UV detection. Fraktions
 20 38 to 40 were combined and yielded 11.0 mg (26 %) of the desired compound. The product was characterized by mass spectroscopy (Bruker Daltonics MicroTof).

UV: 220 sh, 278 nm

ESI-MS: MW = 2020.75738 (mono MW)

Molecular formula: C₉₁H₁₂₀N₂₀O₂₅S₄

Molecular weight (MW) = 2022.3

5 Example 15: Antibacterial activity

After culturing the organisms in liquid beef extract broth, the suspensions of bacteria were adjusted to a defined density by dilution with fresh culture medium ($5 \cdot 10^5$ organisms/ml).

10

Labyrinthopeptin (III) was dissolved and diluted with water in a geometric dilution series (factor 2). 1.5 ml of the solution in the individual dilution steps were mixed with 13.5 ml liquid agar (Müller-Hinton agar) at approximately 45°C.

- 15 The maximum compound concentration in the petri dish was usually 100 mg/l. An agar plate with no compound served as a control.

After the culture medium had cooled and solidified, the agar plates were inoculated simultaneously with 20 different bacterial strains using a Multipoint Inoculator

- 20 delivering $5 \cdot 10^4$ colony forming units (cfu) per inoculation spot and then incubated at 37°C for 17 hours under aerobic conditions.

After incubation, the plates were examined macroscopically for the lowest compound concentration at which bacterial growth is no longer visible. A single colony or a haze growth at the inoculation spot was disregarded.

25

The antibacterial effect was assessed as the Minimum Inhibitory Concentration of the test compound (MIC: lowest compound concentration at which bacterial growth is no longer macroscopically visible):

30

Test organism	MIC
Staphylococcus aureus SG 511	12,5 mg/l
Staphylococcus aureus 285	12,5 mg/l

Staphylococcus aureus 503	3,13 mg/l
Streptococcus pyogenes 308 A	3,13 mg/l
Streptococcus pyogenes 77 A	3,13 mg/l
Streptococcus faecium D	6,25 mg/l

Example 16: Antiviral activity

Viruses can only multiply in living cells. The viral studies were therefore carried out in cell cultures. The viruses were selected either because of their importance as infectious agents or typical biochemical or morphological structures.

A dilution series of Labyrinthopeptin (III) was prepared in 96-well microtiter plates. Hela or Vero cells, according to the infecting virus, are added to give a confluent monolayer within 24h of incubation. After incubation for 3 hours, the respective virus is added to the cells in a concentration which is expected to completely destroy the cell monolayer within 2 days. The cultures are incubated at 37°C in a gassed incubator (5% CO₂ in air). After 24 hours the maximal tolerated dose of test compound (MTD) in the cell culture is evaluated by microscopic examination. The results were compared with non-infected tissue control and a corresponding infection control:

No.	Host organism	Test organism	Inhibition [mg/l]
1	Vero cells	Mycovirus (RNA/Influenza A/Aichi)	44,44
2	Hela cells	Herpes (DNA), Simples 1	133,33
3	Vero cells	Herpes (DNA), Simplex 2 VR 734	44,44
4	Hela cells	Adenovirus (DNA), 5"	133,33

Example 17: Neuropathic pain activity

Labyrinthopeptin (III) was studied in the spared nerve injury (SNI) mouse model of neuropathic pain in order to proof the activity on tactile allodynia. Under general anaesthesia, the two major branches of the sciatic nerve in adult male C57B6 mice

(22.7g $\pm$ 0.26SEM) have been ligated and transected, with the sural nerve left intact. Tactile allodynia has been determined with the automatic von Frey test: using a dump needle stick, the plantar skin of hind paws was exposed to a pressure stimulus of increasing intensity up to 5 g. The force in grams at which the animal responded with hindpaw withdrawal was used as a read-out for tactile allodynia. The study was performed 7 days after nerve lesion over 6 hours with an additional measurement after 24 hours. Within two days after nerve transection, tactile allodynia developed completely and remained stable over at least two weeks. The compound was administered intravenous as a single application (3 mg/kg). As a vehicle for the intravenous application was the 1:1:18 (Ethanol:Solutol: phosphate buffered saline) vehicle chosen.

Paw withdrawal threshold (PWT) measurements have been used to calculate significant treatment effects, and for AUC calculations over a reference time period (6hours) and subsequent % benefit calculations. For the statistical analysis the PWT values of the ipsilateral hind paws were used in two ways: first, with a 2-way ANOVA based on the PWT values for specific times (within a period of 24 hours) and second with a 1-way ANOVA on non-transformed delta AUC values [AUC1-6hour].

Two-way analysis of variance with repeated measures (Repeated factor: TIME, Analysis variable: PWT) followed by a Complementary Analysis (Effect of factor GROUP for each level of factor TIME (Winer analysis), Analysis variable: PWT) and a subsequent Dunnett's test for factor TREATMENT for each level of factor TIME (Two sided comparison vs level VEHICLE) revealed highly significant differences from the vehicle group from 1 to 6 hours after intravenous application for each compound. The effect was gone 24 hours after application. 1-way ANOVA using delta [AUC1-6hour] values revealed a p value of $p < 0.0001$. Dunnett analysis and gave significant treatment effects for both compounds. The percent benefit of the treatment was evaluated using the [AUC1-6hour] values of the ipsilateral vehicle group (0% benefit) and all [AUC1-6hour] values of the contralateral sides of all three groups (100% benefit = maximal possible effect). Compared to these margins Labyrinthopeptin (III) achieved 97% benefit.

In conclusion, the compound significantly reduces tactile allodynia in the SNI mouse model of neuropathic pain.

Example 18: Inflammatory triggered pain activity

5

Labyrinthopeptin (III) was studied in the carrageenan (CAR) induced hindpaw inflammation model in mice in order to proof the activity on thermal hyperalgesia, a typical readout for inflammatory triggered pain.

- 10 Induction of hind paw inflammation: Under slight general Isofluran anaesthesia, CAR 2% (Sigma, Deisenhofen, Germany) in 20µl saline was injected into the plantar aspect of both hind paws in male C57B6 mice. Paw withdrawal latencies (PWL) were determined on exposure of the paws to a defined thermal stimulus using a commercially available apparatus (Plantar Test Ugo Basile Biological Research
- 15 Apparatus, Comerio, Italy) fitted with a mini camera to ensure proper placement of the infrared heat below the hind paw of interest. Mice were kept in the test cages over the whole study period (6 hours).

- Measurement of thermal hyperalgesia: The timer which measures the duration of reflecting infrared light by the hind paw is started by the investigator and stopped, if
- 20 the animal is shaking the affected hind paw. A cut off was set at 16 seconds to prevent tissue damage. The study was performed before and over 6 hours after CAR injection. Paw withdrawal latencies in seconds were used as readout for further analysis.

25

As a vehicle for the intravenous application was the 1:1:18 (Ethanol : Solutol : phosphate buffered saline) vehicle chosen.

- Paw withdrawal latencies (PWL) measurements have been used to calculate
- 30 significant treatment effects, and for AUC calculations over a reference time period (6hours) and subsequent % benefit calculations. For the statistical analysis the PWL values of both hindpaws were used in two ways: first, with a 2-way analysis of variance (ANOVA) based on the PWL values for specific times (within a period of 6

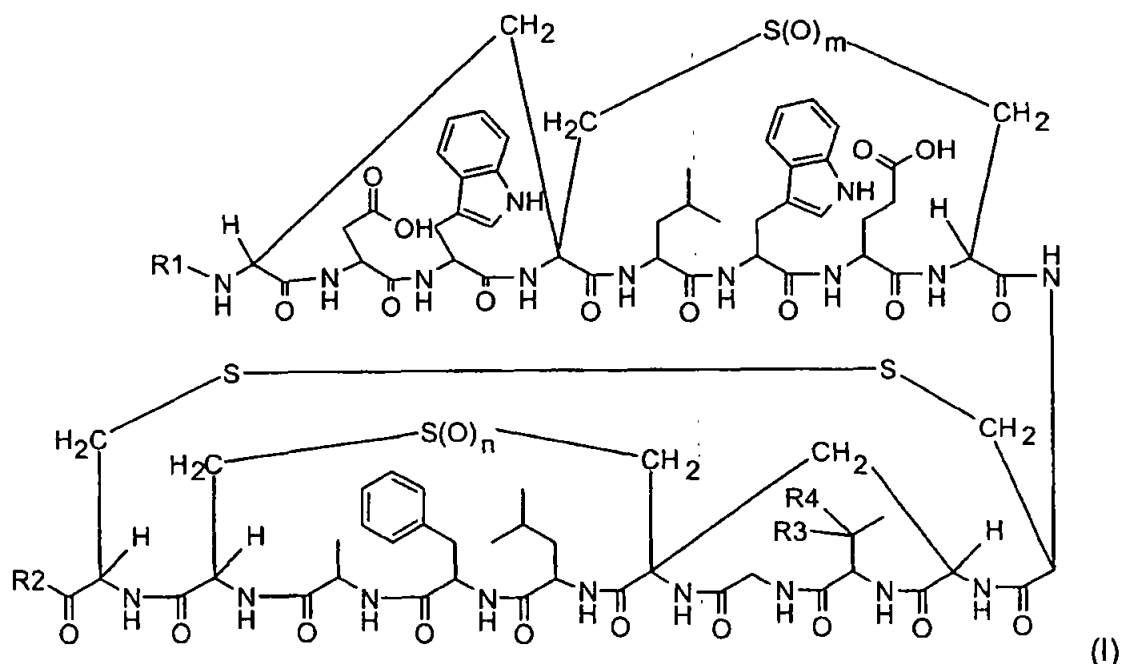
hours) and second with a 1-way ANOVA on non-transformed delta AUC values [AUC1-6hour].

- Two-way Analysis of variance with repeated measures (Repeated factor: TIME, Analysis variable: PWL) followed by a Complementary Analysis (Effect of factor GROUP for each level of factor TIME (Winer analysis), Analysis variable: PWL) and a subsequent Dunnett's test for factor DOSAGE for each level of factor TIME (Two sided comparison vs level 0 = VEHICLE) revealed highly significant differences from the vehicle group from 1 to 2 hours after intravenous application for both dosages.
- 5 The effect was gone 4 hours after application. 1-way ANOVA using delta [AUC1-6hour] values revealed a p value of $p < 0.0001$. Dunnett analysis and gave significant treatment effects for both dosages. The percent benefit of the treatment was evaluated using the [AUC1-6hour] values of the vehicle group (0% benefit) and all [AUC1-6hour] values before CAR was injected (theoretical baseline over 6 hours =
- 10 maximum possible effect = 100% effect). Compared to these margins the 1 mg/kg dosage group achieved 37 and the 10 mg/kg group 34% benefit.
- 15

In conclusion, the compound significantly reduced thermal hyperalgesia in the CAR mouse model of inflammatory triggered pain.

Patent claims:

- 5 1. A compound of the formula (I)



wherein

R1 is H, C(O)-(C₁-C₆)alkyl or C(O)-O-(C₁-C₆)alkyl;

R2 is OH, NH₂, NH-(C₁-C₆)alkyl, NH-(C₁-C₄)alkylene-phenyl or

10 NH-(C₁-C₄)alkylene-pyridyl;

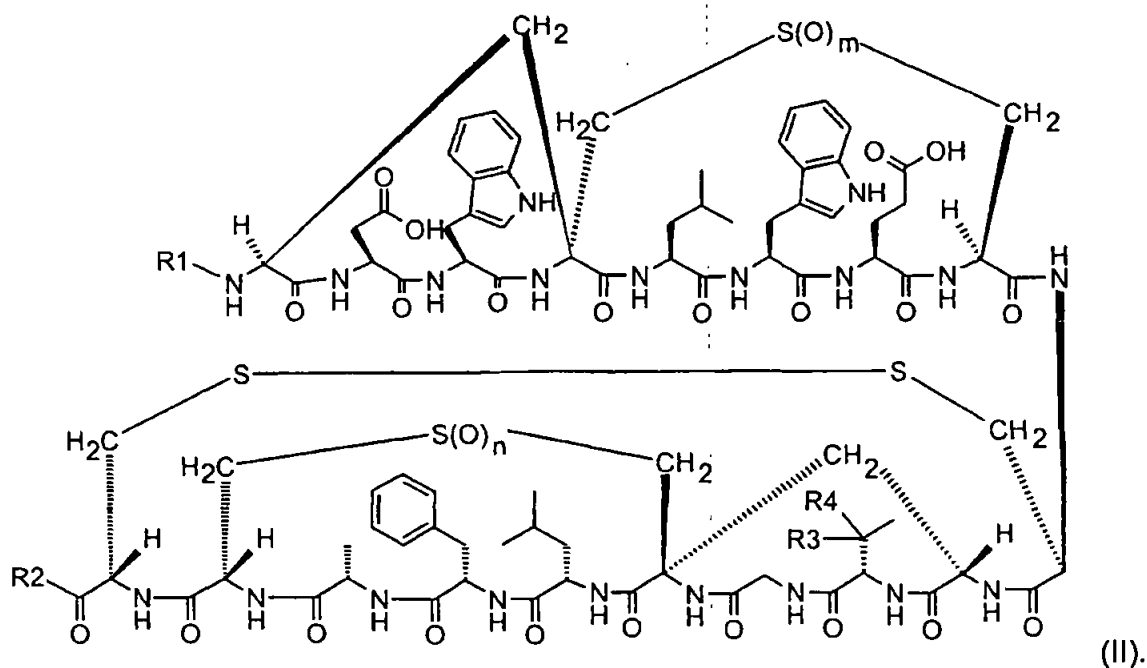
R3 and R4 independently of each other H or OH, or R3 and R4 together are =O; and

m and n are independently of one another 0, 1 or 2;

in any stereochemical form, or a mixture of any stereochemical forms in any ratio, or a physiologically tolerable salt thereof.

15

2. A compound of the formula (I) according to claim 1 characterized the formula (II)



3. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 or 2 wherein R1 is H.

5

4. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 or 3 wherein R2 is OH.

5. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 or 4 wherein R3 and R4 are H or OH wherein if R3 is OH then R4 is H, or if R3 is H then R4 is OH, or R3 and R4 together are =O.

10

6. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 5 wherein R3 is OH and R4 is H, or if R3 is H and R4 is OH.

15

7. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 6 wherein m and n are both 0, or m and n are both 2, or m is 0 and n is 2, or m is 2 and n is 0.

8. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 7 wherein m and n are both 0.

20

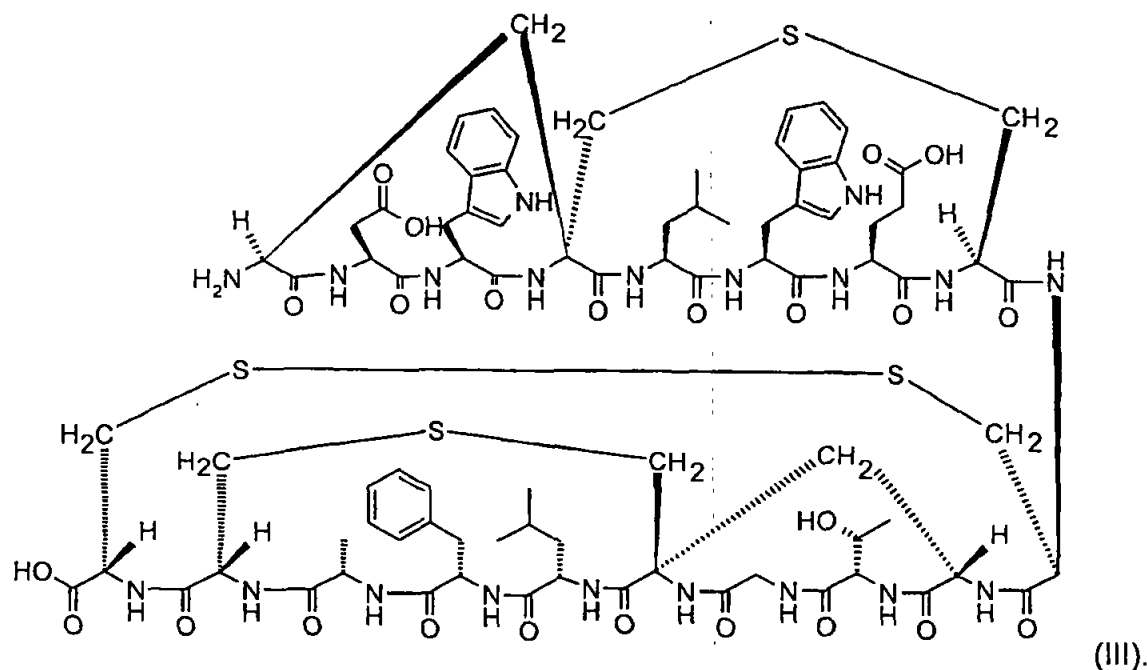
9. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 8 wherein

R1 is H; R2 is OH; R3 and R4 independently of each other H or OH wherein if R3 is OH then R4 is H, and if R3 is H then R4 is OH; and m and n are independently of one another 0, 1 or 2.

10. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 9 wherein R1 is H; R2 is OH; R3 and R4 independently of each other H or OH wherein if R3 is OH then R4 is H, and if R3 is H then R4 is OH; and m and n are both 0, or m and n are both 2, or m is 0 and n is 2, or m is 2 and n is 0.

11. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 10 wherein R1 is H; R2 is OH; R3 and R4 independently of each other H or OH wherein if R3 is OH then R4 is H, and if R3 is H then R4 is OH; and m and n are both 0.

12. A compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 11 characterized by a compound of the formula (III)



13. A compound isolated from *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), characterized by a monoisotopic neutral molecular mass of 1922.6872 Da, and a molecular formula of C₈₅H₁₁₀N₂₀O₂₄S₄.

14. Use of a compound according to any one of claims 1 to 13 for the preparation

of a medicament for the treatment of bacterial infections, viral infections and/or pain.

15. A pharmaceutical composition comprising at least one compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 13 and at least one pharmaceutically acceptable ingredient.

16. A process for preparing a compound of the formula (I) according to any one of claims 1 to 13, which comprises

- 10 a) the strain *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), or one of its variants and/or mutants, being fermented under suitable conditions in a culture medium until one or more of the compounds of the formula (I) accrue(s) in the culture medium,
- b) a compound of the formula (I) being isolated from the culture medium, and
- c) the compound of the formula (I) being derivatized, where appropriate, and/or, where appropriate, being converted into a physiologically tolerated salt.

15

17. A process according to claim 16 wherein the compound (I) is characterized by a compound of the formula (II).

18. A process according to any one of claims 16 or 17 wherein the compound (I) is characterized by a compound of the formula (III).

20

19. A process according to any one of claims 16 to 18 wherein m and n are both 0, or m and n are both 2, or m is 0 and n is 2, or m is 2 and n is 0.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/008294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/36 C07K7/08 C12P21/02 A61P31/12 A61P31/04
A61K38/10

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, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARAZZI ALESSANDRA ET AL: "Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase II. Structure elucidation" JOURNAL OF ANTIBIOTICS (TOKYO), vol. 58, no. 4, April 2005 (2005-04), pages 260-267, XP002434109 ISSN: 0021-8820 abstract	
A	GOLDSTEIN B P ET AL: "A-40926 A NEW GLYCOPEPTIDE ANTIBIOTIC WITH ANTI-NEISSERIA ACTIVITY" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 31, no. 12, 1987, pages 1961-1966, XP002434110 ISSN: 0066-4804 abstract	
	----- -/-- -----	



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
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 January 2008

Date of mailing of the international search report

12/02/2008

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

Fausti, Simone

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/008294

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	R. SÜSSMUTH: "Charakterisierung und molekularbiologische Handhabung eines bakteriellen Actinomadura-Stamms zur Aufklärung der Labyrinthopeptin-Biosynthese" INTERNET ARTICLE, [Online] 27 April 2007 (2007-04-27), XP002466709 Retrieved from the Internet: URL: http://www.alstep.tu-berlin.de/wissdoc/s/suessmuth_actinom.pdf [retrieved on 2007-05-18] the whole document -----	

PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRALES DE ACTINOMADURA NAMIBIENSIS

Campo de la invención

5

La presente invención se refiere a los nuevos péptidos aislados de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), a un método para su preparación y a su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas, para el tratamiento de infecciones virales y/o para el tratamiento del dolor.

10

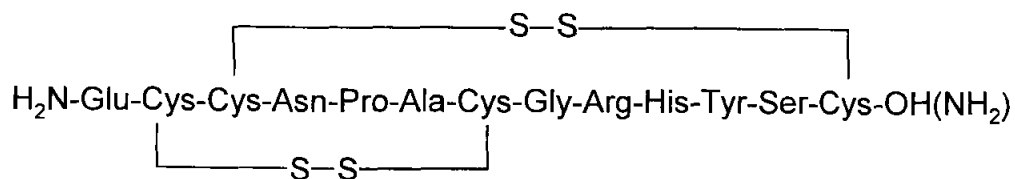
Antecedentes de la Invención

En la bibliografía se conocen varios péptidos fuertemente unidos, por ejemplo conopéptidos aislados de caracoles como (para una revisión, véase, por ejemplo, Terlau & Olivera, *Physiol. Rev.* 2004, 84, 41–68) o los denominados lantibióticos (Chatterjee et al., *Chem. Rev.* 2005, 105, 633-683) procedentes de bacterias Gram-positivas. Dichos péptidos tienen diversas utilidades. El lantibiótico nisina se ha usado, entre otras utilidades, como conservante alimentario durante muchos años.

20

Los conopéptidos son útiles, por ejemplo, para el tratamiento del dolor, diabetes, esclerosis múltiple y enfermedades cardiovasculares y actualmente se encuentran en desarrollo preclínico o clínico. Son ejemplos de conopéptidos α -GI (secuencia: ECCNPACGRHYSC*, *amidado, conectividad: 1-3,2-4) y α -GID (secuencia: IR γ CCSNPACRVNNOHVC, conectividad: 1-3,2-4), donde O/Hyp es hidroxiprolina y la conectividad indica la posición de la cisteína implicada en cada uno de los enlaces disulfuro específicos, por ejemplo, primera a tercera y segunda a cuarta como en α -GID:

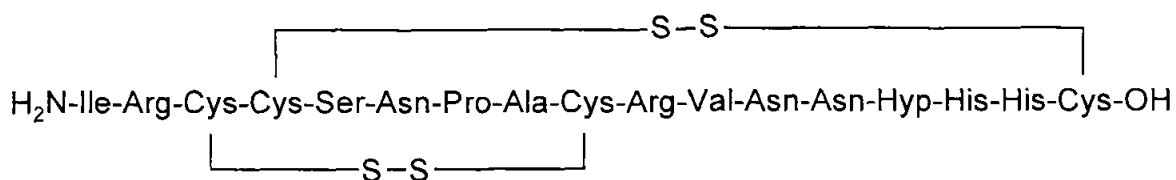
25



30

(α -GI)

- 2 -

(α -GID).

Compendio de la invención

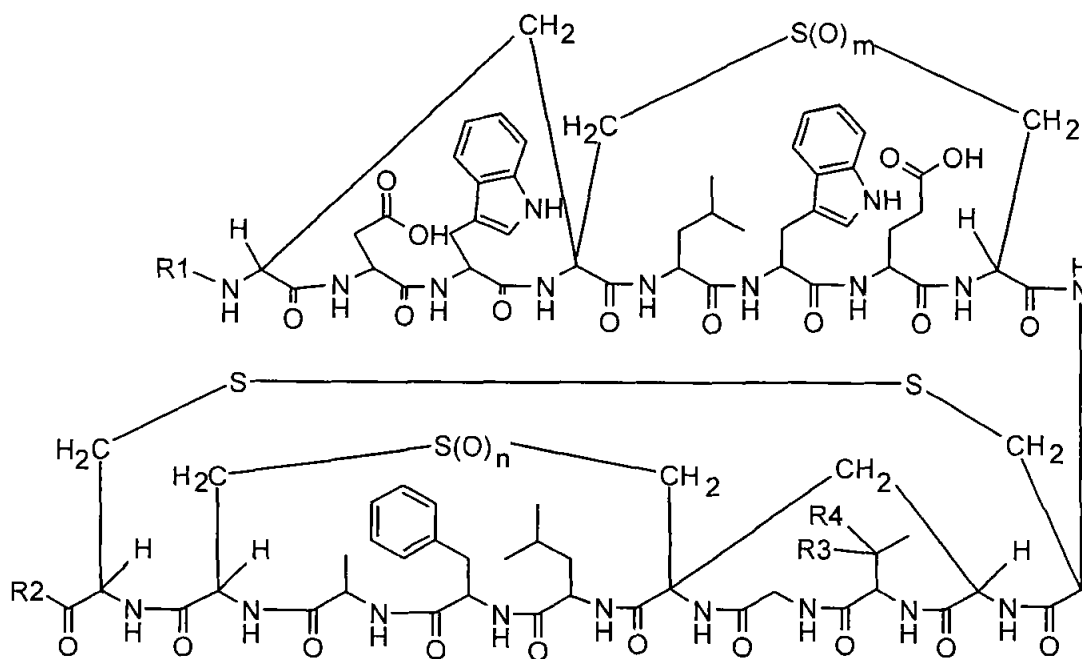
5

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que pueden aislarse péptidos fuertemente unidos de la cepa de microorganismos *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) y son útiles para el tratamiento de infecciones bacterianas, infecciones virales y/o dolor.

10

Descripción detallada de la invención

Una realización de la presente invención es un compuesto de la fórmula (I)



15

en la que

R1 es H, C(O)-alquilo (C_1-C_6) o C(O)-O-alquilo (C_1-C_6);

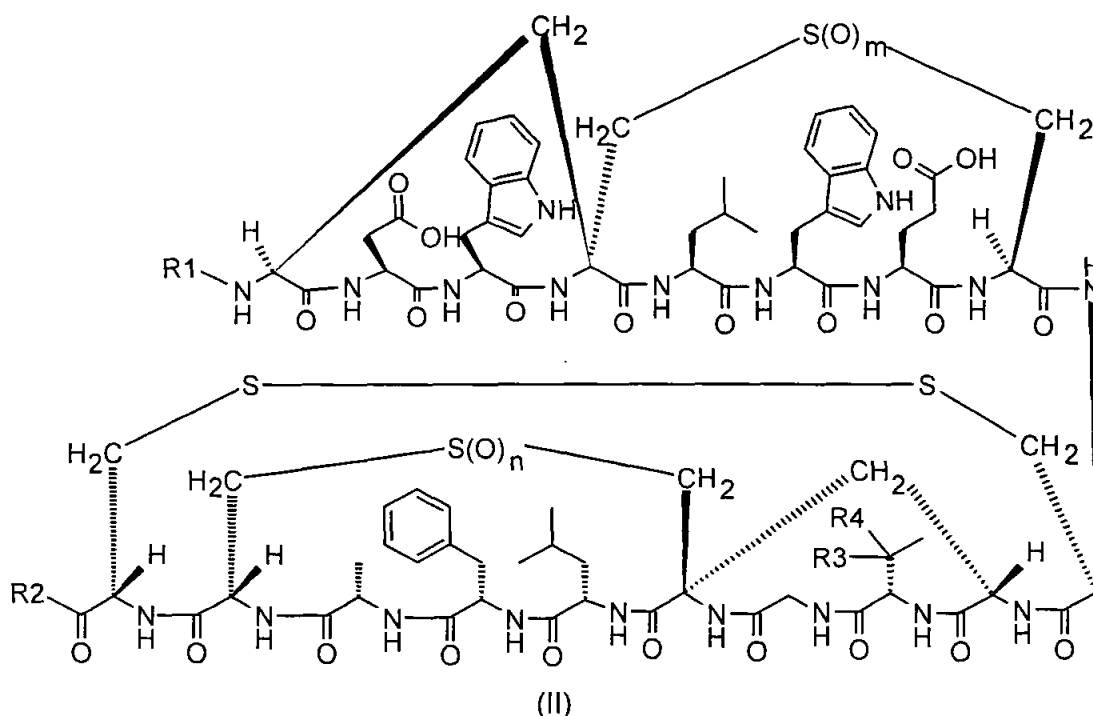
R2 es OH, NH_2 , NH-alquilo (C_1-C_6), NH-alquilenos (C_1-C_4)-fenilo o NH-alquilenos (C_1-C_4)-piridilo;

20

- 3 -

R3 y R4, independientemente entre sí, son H o OH, o R3 y R4 juntos son =O; y
 m y n son, independientemente entre sí, 0, 1 ó 2;
 en cualquier forma estereoquímica, o una mezcla de varias formas estereoquímicas
 cualesquiera en cualquier proporción, o una sal fisiológicamente tolerable del
 mismo.

En una realización adicional, el compuesto de la fórmula (I) se caracteriza
 por un compuesto de la fórmula (II)



en la que R1, R2, R3, R4, m y n son como se han definido anteriormente.

R1 es preferiblemente H. R2 es preferiblemente OH. R3 y R4 son
 preferiblemente H o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, y si R3 es H,
 entonces R4 es OH, o R3 y R4 juntos son =O. Más preferiblemente, R3 y R4 son H
 o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, y si R3 es H, entonces R4 es OH.

Preferiblemente, m y n son los dos 0, o m y n son los dos 2, o m es 0 y n es
 2, o m es 2 y n es 0. Más preferiblemente, m y n son los dos 0.

Una realización adicional de la presente invención es un compuesto de la
 fórmula (I) o de la fórmula (II) en la que

R1 es H;

R2 es OH;

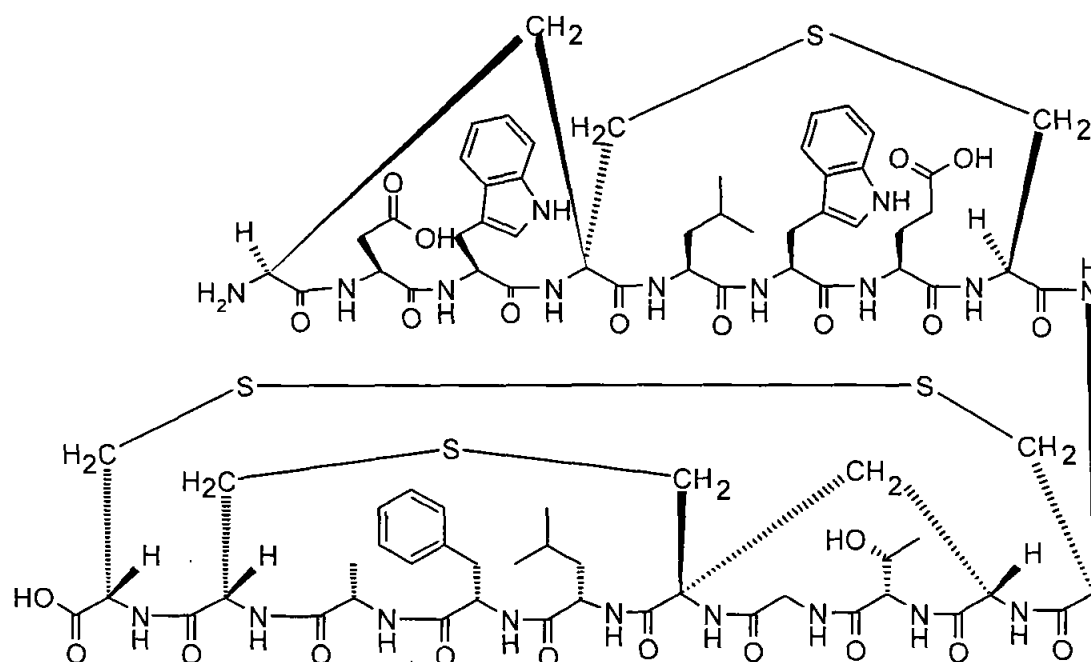
R3 y R4 son H o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, y si R3 es H, entonces
 R4 es OH; y

- 4 -

m y n son, independientemente entre sí, 0, 1 ó 2, preferiblemente m y n son los dos 0, o m y n son los dos 2, o m es 0 y n es 2, o m es 2 y n es 0, de una forma particularmente preferida, m y n son los dos 0;

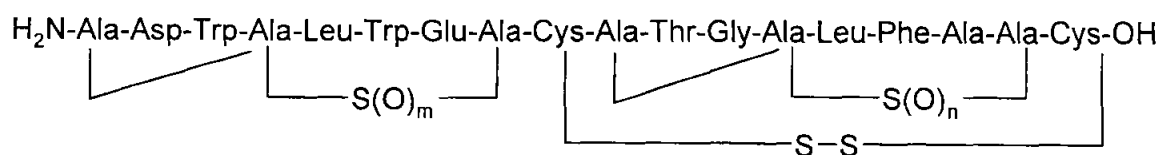
o una sal fisiológicamente tolerable del mismo.

- 5 Más preferiblemente, el compuesto (I) se caracteriza por un compuesto de la fórmula (III)



(III).

- 10 Para una caracterización adicional de los compuestos de la presente invención, los restos peptídicos se convirtieron de nuevo en sus precursores probables por síntesis de péptidos ribosomales. Los aminoácidos alfa,alfa-disustituidos en los restos 1 y 10 no tienen precedentes en la bibliografía. Dicho aminoácido puede describirse como un resto Ala unido por un grupo metileno y
- 15 sustituido en la posición beta, como se muestra a continuación:



- La presente invención se refiere adicionalmente a todos los equivalentes
- 20 químicos obvios de los compuestos de las fórmulas (I), (II) y (III) de acuerdo con la

invención. Estos equivalentes son compuestos que sólo muestran una ligera diferencia química, y tienen el mismo efecto farmacológico, o que se convierten en los compuestos de acuerdo con la invención en condiciones suaves. Dichos equivalentes también incluyen, por ejemplo, sales, productos de reducción, productos de oxidación, ésteres de procesos hidrolíticos parciales, éteres, acetales o amidas de los compuestos de las fórmulas (I), (II) y (III) así como equivalentes que el especialista en la técnica puede preparar usando métodos convencionales y, además de éstos, todas las antípodas ópticas y diastereómeros y todas las formas estereoisoméricas.

10 A menos que se indique otra cosa, los centros quirales de los compuestos de la fórmula (I) pueden estar presentes en la configuración R o en la configuración S. La invención se refiere tanto a los compuestos ópticamente puros como a mezclas estereoisoméricas, tales como mezclas enantioméricas y mezclas diastereoméricas.

15 Por sales fisiológicamente toleradas de los compuestos de las fórmulas (I), (II) y (III) se entienden sus sales orgánicas y sus sales inorgánicas, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences (17ª edición, página 1418 (1985)). Debido a su estabilidad física y química y a su solubilidad, se prefieren las sales de sodio, potasio, calcio y amonio, entre otras, para grupos ácidos; se
20 prefieren sales de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o de ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico y ácido p-toluenosulfónico, entre otras, para grupos básicos.

Los compuestos de la presente invención se han denominado
25 Laberintopeptinas a lo largo del texto.

La invención también se refiere a un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I) en la que m y n son, independientemente entre sí, 0, 1 ó 2, que comprende

- a) fermentación de la cepa *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), o una de sus
30 variantes y/o mutaciones, en condiciones adecuadas en un medio de cultivo hasta que uno o más de los compuestos de la fórmula (I) se acumule(n) en el medio de cultivo,
- b) aislamiento de un compuesto de la fórmula (I) a partir del medio de cultivo, y
- c) derivatización del compuesto de la fórmula (I), cuando sea apropiado, y/o,
35 cuando sea apropiado, conversión en una sal fisiológicamente tolerada.

Preferiblemente, la invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I) donde el compuesto (I) se caracteriza por un compuesto de la fórmula (II), más preferiblemente la invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I) o preferiblemente (II) en la que m y n son los dos 0, o m y n son los dos 2, o m es 0 y n es 2, o m es 2 y n es 0.

De una forma particularmente preferida, la invención se refiere preferiblemente a un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I) donde el compuesto (I) se caracteriza por un compuesto de la fórmula (III).

El medio de cultivo es una solución nutritiva o un medio sólido que contiene al menos una fuente de carbono habitual y al menos una fuente de nitrógeno, así como una o más sales inorgánicas habituales.

El proceso de acuerdo con la invención puede usarse para fermentación a escala de laboratorio (escala de mililitros a litros) y para fermentación a una escala industrial (escala de metros cúbicos).

Las fuentes de carbono adecuadas para la fermentación son carbohidratos y alcoholes de azúcar asimilables, tales como glucosa, lactosa, sacarosa o D-manitol, así como productos naturales que contienen carbohidratos, tales como extracto de malta o extracto de levadura. Son ejemplos de nutrientes que contienen nitrógeno aminoácidos; péptidos y proteínas y sus productos de degradación, por ejemplo caseína, peptonas o triptonas; harinas de carne; extractos de levadura; gluten; semillas de siembra, por ejemplo de maíz, trigo, judías, soja o la planta de algodón; residuos de destilación de la producción de alcohol; harinas de carne; extractos de levadura; sales de amonio; y nitratos. Se da preferencia a la fuente de nitrógeno que es uno o más péptidos que se han obtenido sintéticamente o biosintéticamente. Son ejemplos de sales inorgánicas cloruros, carbonatos, sulfatos o fosfatos de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, hierro, cinc, cobalto y manganeso. Son ejemplos de oligoelementos cobalto y manganeso.

Las condiciones que son especialmente adecuadas para formar las Laberintopectinas de acuerdo con la invención son las siguientes: de 0,05 a 5%, preferiblemente de 0,1 a 2,5%, de extracto de levadura; de 0,2 a 5,0%, preferiblemente de 0,1 a 2%, de casitona; de 0,02 a 1,0%, preferiblemente de 0,05 a 0,5%, de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; de 0,02 a 1,5%, preferiblemente de 0,05 a 0,7%, de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ y de 0,00001% a 0,001% de cianocobalamina. Los valores de porcentaje que se dan en cada caso se basan en el peso de la solución total de nutrientes.

- 7 -

El microorganismo se cultiva en condiciones aerobias, es decir, por ejemplo, sumergido mientras se remueve o agita en matraces o fermentadores de agitación, o sobre un medio sólido, cuando sea apropiado, mientras se pasa aire u oxígeno. El microorganismo puede cultivarse en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 18 a 35°C, preferiblemente de aproximadamente 20 a 32°C, en particular de 27 a 30°C. El intervalo de pH debe estar entre 4 y 10, preferiblemente entre 6,5 y 7,5. El microorganismo se cultiva generalmente en estas condiciones durante un periodo de 2 a 10 días, preferiblemente de 72 a 168 horas. El microorganismo se cultiva ventajosamente en varias etapas, es decir, inicialmente se preparan uno o más cultivos preliminares en un medio nutriente líquido, inoculándose después estos cultivos preliminares en el medio de producción real, es decir, el cultivo principal, por ejemplo en una proporción en volumen de 1:10 a 1:100. El cultivo preliminar se obtiene, por ejemplo, inoculando la cepa, en forma de células vegetativas o esporas, en una solución de nutrientes y dejando que crezca de aproximadamente 20 a 120 horas, preferiblemente durante 48 a 96 horas. Las células vegetativas y/o esporas pueden obtenerse, por ejemplo, dejando que la cepa crezca durante aproximadamente 1 a 15 días, preferiblemente durante aproximadamente 4 a 10 días, en un sustrato nutriente sólido o líquido, por ejemplo agar de levadura.

Los derivados de Laberintopectina pueden aislarse y purificarse a partir del medio de cultivo usando métodos conocidos y teniendo en cuenta las propiedades químicas, físicas y biológicas de las sustancias naturales. Se usó análisis por HPLC para ensayar las concentraciones de los derivados de Laberintopectina respectivos en el medio de cultivo o en las etapas de aislamiento individuales, comparándose la cantidad de la sustancia formada de forma conveniente con una solución de graduación.

Para el aislamiento, el caldo de cultivo o el cultivo junto con el medio sólido se liofilizan opcionalmente, y los derivados de Laberintopectina se extraen del liofilizado usando un disolvente orgánico o una mezcla de agua y un disolvente orgánico, que contiene preferiblemente 50-90% de disolvente orgánico. Son ejemplos de disolventes orgánicos metanol y 2-propanol. La fase del disolvente orgánico contiene las sustancias naturales de acuerdo con la invención; se concentra, cuando sea apropiado, al vacío y se somete a purificación adicional.

La purificación adicional de uno o más compuestos de acuerdo con la invención se realiza por cromatografía sobre materiales adecuados,

preferiblemente, por ejemplo, sobre tamices moleculares, sobre gel de sílice, sobre óxido de aluminio, sobre intercambiadores iónicos o sobre resinas adsorbentes o sobre fases inversas (RP). Esta cromatografía se usa para separar los derivados de Laberintopectina. Los derivados de Laberintopectina se cromatografían usando
5 soluciones acuosas tamponadas, básicas o acidificadas o mezclas de soluciones acuosas y orgánicas.

Por mezclas de soluciones acuosas u orgánicas se entienden todos los disolventes orgánicos miscibles en agua, preferiblemente metanol, 2-propanol o acetonitrilo, a una concentración de 5 a 99% de disolvente orgánico,
10 preferiblemente de 5 a 50% de disolvente orgánico o, si no, todas las soluciones acuosas tamponadas que son miscibles con disolventes orgánicos. Los tampones que pueden usarse son los mismos que se han especificado anteriormente.

Los derivados de Laberintopectina se separan, basándose en sus diferentes polaridades, por medio de cromatografía de fase inversa, por ejemplo sobre MCI
15 (resina adsorbedora, Mitsubishi, Japón) o Amberlite XAD (TOSHAAS), o sobre otros materiales hidrófobos, por ejemplo sobre fases de RP-8 o RP-18. Además, la separación puede realizarse por medio de cromatografía de fase normal, por ejemplo sobre gel de sílice, óxido de aluminio y similares.

Por soluciones acuosas, básicas o acidificadas, tamponadas, se entiende,
20 por ejemplo, agua, tampón fosfato, acetato amónico y tampón citrato a una concentración de hasta 0,5 M, así como ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, amoníaco y trietilamina, o todos los ácidos y bases disponibles en el mercado conocidos por el especialista, preferiblemente a una concentración de hasta 1%. En el caso de soluciones acuosas tamponadas, se da preferencia
25 particular al acetato amónico al 0,1%.

La cromatografía puede realizarse usando un gradiente que comienza con agua al 100% y finaliza con disolvente orgánico al 100%; la cromatografía se realizó preferiblemente con un gradiente lineal de acetonitrilo de 5 a 95%.

Como alternativa, también es posible realizar una cromatografía en gel o
30 cromatografía sobre fases hidrófobas. La cromatografía en gel puede realizarse, por ejemplo, sobre geles de poliacrilamida o geles de copolímeros. La secuencia de las etapas cromatográficas mencionadas anteriormente puede invertirse.

En la medida en la que las Laberintopectinas están presentes como estereoisómeros, pueden separarse usando métodos conocidos, por ejemplo por
35 medio de separación usando una columna quiral.

La derivatización del grupo OH para dar un derivado de éster o éter se realiza usando métodos que se conocen per se (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4ª edición, 1992), por ejemplo por medio de reacción con un anhídrido de ácido o por reacción con un carbonato de dialquilo o sulfato de dialquilo. La derivatización del grupo COOH para dar un derivado de éster o amida se realiza usando métodos que se conocen per se (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4ª edición, 1992), por ejemplo por medio de reacción con amoníaco para el grupo CONH₂ respectivo, o con un compuesto de alquilo opcionalmente activado para dar el éster de alquilo respectivo. La oxidación de grupos -CH₂-S-CH₂- para dar un grupo -CH₂-S(O)-CH₂- o -CH₂-S(O)₂-CH₂- puede conseguirse por exposición de los derivados de Laberintopectina respectivos a oxígeno o al aire.

Un aislado de la cepa de microorganismos *Actinomadura namibiensis* se depositó con la referencia de identificación FH-A 1198 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen [Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares] GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Alemania, de acuerdo con la reglas del tratado de Budapest, el 23 de enero de 1991 con el siguiente número: DSM 6313. La cepa de microorganismos *Actinomadura namibiensis* se describe adicionalmente por Wink et al. en International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2003, 53, 721-724.

En lugar de la cepa *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), también es posible usar sus mutantes y/o variantes que sintetizan uno o más de los compuestos de acuerdo con la invención.

Un mutante es un microorganismo en el que uno o más genes del genoma se ha(n) modificado, siendo el gen, o los genes, responsables de que se mantenga funcional y heredable la capacidad del organismo para producir el compuesto de acuerdo con la invención.

Tales mutantes pueden producirse, de una manera conocida per se, usando medios físicos, por ejemplo irradiación, tal como con rayos ultravioleta o rayos X, o mutágenos químicos, tales como metanosulfonato de etilo (EMS); 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (MOB) o N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), o como se describe por Brock et al. en "Biology of Microorganisms", Prentice Hall, páginas 238-247 (1984).

Una variante es un fenotipo del microorganismo. Los microorganismos

tienen la capacidad de adaptarse a su medio y, por lo tanto, muestran una flexibilidad fisiológica muy desarrollada. Todas las células de los microorganismos están implicadas en la adaptación fenotípica, sin que esté condicionada genéticamente la naturaleza del cambio y siendo reversible en condiciones alteradas (H. Stolp, Microbial ecology: organism, habitats, activities. Cambridge University Press, Cambridge, GB, página 180, 1988).

La selección de mutantes y/o variantes que sintetizan uno o más de los compuestos de acuerdo con la invención se realiza liofilizando opcionalmente el medio de fermentación, extrayendo el liofilizado o el caldo de fermentación con un disolvente orgánico o una mezcla de agua y un disolvente orgánico como se ha definido anteriormente y analizando por medio de HPLC o TLC o ensayando la actividad biológica.

Las condiciones de fermentación pueden aplicarse a *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) y para mutantes y/o variantes del mismo.

Una realización adicional de la presente invención es el uso de un compuesto de la fórmula (I), preferiblemente un compuesto de la fórmula (II) o (III), como se ha definido anteriormente, para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente infecciones bacterianas provocadas por bacterias Gram-positivas, para el tratamiento de infecciones virales y/o para el tratamiento del dolor, especialmente dolor neuropático o dolor provocado por inflamación.

El medicamento descrito anteriormente (también denominado preparación farmacéutica o composición farmacéutica) contiene una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la fórmula (I), en cualquier forma estereoquímica, o una mezcla de varias formas estereoquímicas cualesquiera en cualquier proporción, o una sal fisiológicamente tolerable o equivalente químico del mismo, como se ha descrito anteriormente, y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una o más sustancias de soporte farmacéuticamente aceptable (o vehículos) y/o aditivos (o excipientes).

El medicamento puede administrarse por vía oral, por ejemplo en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos lacados, comprimidos recubiertos, gránulos, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, jarabes, emulsiones, suspensiones o mezclas en aerosol. Sin embargo, la administración también se puede llevar a cabo por vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios, o por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, en forma de soluciones de inyección o soluciones de infusión, microcápsulas, implantes o varillas, o por vía

percutánea o tópica, por ejemplo, en forma de pomadas, soluciones o tinturas, o en otras formas, por ejemplo en forma de aerosoles o pulverizaciones nasales.

Los medicamentos de acuerdo con la invención se preparan de una manera conocida per se y familiar para un especialista en la técnica, usándose sustancias de soporte y/o aditivos orgánicos y/u inorgánicos farmacéuticamente aceptables inertes además de el(los) compuesto(s) de las fórmulas (I) en cualquier forma estereoquímica, o una mezcla de varias formas estereoquímicas cualesquiera en cualquier proporción, o una sal fisiológicamente tolerable o equivalente químico del (de los) mismo(s), como se ha descrito anteriormente. Para la producción de píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura es posible utilizar, por ejemplo, lactosa, almidón de maíz o sus derivados, talco, ácido esteárico o sus sales, etc. Son sustancias de soporte para cápsulas de gelatina blanda y supositorios, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o hidrogenados, etc. Son sustancias de soporte adecuadas para la producción de soluciones, por ejemplo, soluciones inyectables, o de emulsiones o jarabes, por ejemplo, agua, solución salina, alcoholes, glicerol, polioles, sacarosa, azúcar invertido, glucosa, aceites vegetales, etc. Son sustancias de soporte adecuadas para microcápsulas, implantes o varillas, por ejemplo, copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico. Las preparaciones farmacéuticas contienen normalmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 90% en peso de un compuesto de la fórmula (I) y/o sus sales fisiológicamente aceptables y/o sus profármacos. La cantidad del ingrediente activo de la fórmula (I) en cualquier forma estereoquímica, o una mezcla de varias formas estereoquímicas cualesquiera en cualquier proporción, o una sal fisiológicamente tolerable o equivalente químico del mismo, como se ha descrito anteriormente, en los medicamentos es normalmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1000 mg, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg.

Además de los ingredientes activos de la fórmula (I) en cualquier forma estereoquímica, o una mezcla de varias formas estereoquímicas cualesquiera en cualquier proporción, o una sal fisiológicamente tolerable o equivalente químico de los mismos, como se ha descrito anteriormente, y de las sustancias de soporte, las preparaciones farmacéuticas pueden contener uno o más aditivos tales como, por ejemplo, cargas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, estabilizadores, emulsionantes, conservantes, edulcorantes, colorantes, aromatizantes, espesantes, diluyentes, sustancias tampón, disolventes,

solubilizantes, agentes para conseguir un efecto de depósito, sales para alterar la presión osmótica, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener dos o más compuestos de las fórmulas (I) en cualquier forma estereoquímica, o una mezcla de varias formas estereoquímicas cualesquiera en cualquier proporción, o una sal fisiológicamente tolerable o equivalente químico de los mismos. En caso de que una preparación farmacéutica contenga dos o más compuestos de las fórmulas (I), la selección de los compuestos individuales puede llevar a un perfil farmacológico global específico de la preparación farmacéutica. Por ejemplo, un compuesto altamente potente con una duración de acción más corta puede combinarse con un compuesto de acción prolongada de potencia más baja. La flexibilidad permitida con respecto a la elección de sustituyentes en los compuestos de las fórmulas (I) permite un enorme grado de control sobre las propiedades biológicas y físico-químicas de los compuestos y, por lo tanto, permite la selección de tales compuestos deseados. Adicionalmente, además de al menos un compuesto de la fórmula (I), las preparaciones farmacéuticas también pueden contener uno o más ingredientes terapéutica o profilácticamente activos diferentes.

Cuando se usan los compuestos de las fórmulas (I), la dosis puede variar dentro de amplios límites y, como es habitual y se conoce por el médico, debe ser apropiada para las condiciones individuales en cada caso individual. Depende, por ejemplo, del compuesto específico empleado, de la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se ha de tratar, del modo y el plan de administración, de si la afección tratada es aguda o crónica o de si se realiza una profilaxis. Puede establecerse una dosificación apropiada usando métodos clínicos bien conocidos en la técnica médica. En general, la dosis diaria para lograr los resultados deseados en un adulto que pesa aproximadamente 75 kg es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, en particular de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, (en cada caso en mg por kg de peso corporal). La dosis diaria se puede dividir, en particular en el caso de administrar cantidades relativamente grandes, en varias administraciones, por ejemplo en 2, 3 ó 4 administraciones separadas. Como es habitual, dependiendo del comportamiento individual puede ser necesario desviarse hacia arriba o hacia abajo de la dosis diaria indicada.

Ejemplo 1: Preparación de un criocultivo de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313)

- 13 -

Se sembraron 100 ml de medio de cultivo (10 g de almidón, 2 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 10 g de glicerina, 2,5 g de polvo de macerado de maíz, 2 g de peptona, 1 g de NaCl, 3 g de CaCO₃ en 1 l de agua corriente, pH 7,2 antes de la esterilización) con la cepa *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) en un
5 matraz Erlenmeyer estéril de 500 ml y la mezcla se incubó durante 72 horas a 27°C y a 120 rpm en un agitador. Posteriormente, se mezclaron 1 ml del cultivo y 1 ml de solución de conservación estéril (20 g de glicerina, 10 g de sacarosa, 70 ml agua desionizada) y la mezcla se almacenó a -80°C. Como alternativa, se transfirieron
10 pequeños trozos de un cultivo bien desarrollado sobre agar a Cryotubes® (Vanguard International) con 1,5 ml de solución de glicerina estéril al 50% y la mezcla se almacenó a -196°C en nitrógeno líquido.

Ejemplo 2: Preparación de Laberintopeptinas

15 Un matraz Erlenmeyer estéril de 500 ml que contenía 100 ml del medio de cultivo descrito en el Ejemplo 1 se sembró con un cultivo de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) que se había desarrollado sobre una placa de agar y se incubó a 27°C y a 120 rpm en un agitador. Después de 72 horas, se sembraron
20 más matraces Erlenmeyer que contenían el mismo medio de cultivo en la misma cantidad con 2 ml de este precultivo y se incubaron en idénticas condiciones durante 168 horas. Como alternativa, un matraz Erlenmeyer de 300 ml que contenía 100 ml del medio de cultivo descrito en el Ejemplo 1 se sembró con un cultivo de
25 *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313) y se incubó a 25°C y a 180 rpm. Después de 72 horas, se sembraron más matraces Erlenmeyer que contenían el mismo medio de cultivo en la misma cantidad con 5 ml de este precultivo y se incubaron en idénticas condiciones durante 168 horas.

Ejemplo 3: Aislamiento de Laberintopeptinas

30 Se aplicó tierra de diatomeas Hyflo Super-cel al 2% (Hyflo Supercell; VWR, Darmstadt, Alemania) a 10 l del caldo de cultivo de acuerdo con el Ejemplo 2 y el cultivo se filtró a través de una prensa de filtro para separar la solución de cultivo de las micelas. El filtrado se puso en una columna que contenía 1 l de resina Amberlite
35 XAD-16 (diámetro de la columna: 5,5 cm, altura de la columna: 42 cm) y se lavó con 5 l de agua desionizada y 5 l de metanol al 20% en agua. La Laberintopeptina se

- 14 -

eluyó con 5 l de metanol al 60% en agua y 5 l de metanol al 80% en agua. Las fracciones que contenían Laberintopectina se identificaron mediante análisis por HPLC-DAD y LC-ESI-MS, se concentraron de forma colectiva en un evaporador rotatorio hasta que se obtuvo un residuo acuoso y posteriormente se liofilizaron. Se
5 obtuvieron 300 mg de producto bruto.

Ejemplo 4: Cromatografía líquida de alta resolución con detección por matriz de diodos (HPLC-DAD) de Laberintopectinas

10 Columna: Nucleosil 100 - C₁₈; 20 + 125 mm × 4,6 mm, 5 μ (Machery-Nagel)
Fase móvil: H₃PO₄ al 0,1% en agua (Eluyente A) y acetonitrilo (Eluyente B)
gradiente lineal de Eluyente B en Eluyente A de 0% a 100%
durante un periodo de 15 minutos
Flujo: 2 ml por minuto

15

La detección por absorción UV/Vis produjo picos a 210, 230, 260, 280, 310, 360, 435 y 500 nm.

Tiempo de retención de la Laberintopectina de la fórmula (II): 7,75 minutos

20 Ejemplo 5: Cromatografía líquida de alta resolución con espectroscopia de masas por ionización por electronebulización (HPLC-ESI-MS) de Laberintopectinas

Columna: Purospher RP-18e; 125 mm × 4 mm, 5 μ (Agilent)
Fase móvil: ácido trifluoroacético al 0,1% en Wasser (Eluyente A) y
25 ácido trifluoroacético al 0,1% en Acetonitrilo (Eluyente B)
gradiente lineal de Eluyente B en Eluyente A de 5% a 100%
durante un periodo de 10 minutos
Flujo: 1.5 ml por minuto. El flujo hacia la interfaz ES del espectrómetro de masas se redujo a 0,4 ml por minuto mediante un divisor T.

30

Detección por absorción UV a 210 nm y ESI-MS (modo positivo) donde se usó un colector de iones como analizador de masas.

El tiempo de retención de la Laberintopectina de la fórmula (III) fue de 5,9 minutos. La masa molecular era 1922 Da.

35

Ejemplo 6: Purificación de Laberintopectinas

El producto bruto de Laberintopectina obtenido de acuerdo con el Ejemplo 3 (300 mg) se disolvió en una mezcla de dimetilsulfóxido, metanol y agua (1:3:6) y los componentes se separaron por cromatografía sobre una columna Nucleosil 100 - C₁₈ (tamaño de partículas: 10 µ, tamaño de la columna: 250 × 16 mm) usando elución isocrática (agua + ácido fórmico al 0,1%/metanol, 35:65) a un caudal de 20 ml por minuto. Las fracciones se analizaron con HPLC (véase el Ejemplo 4). Se obtuvieron 62 mg de Laberintopectina de la fórmula (III) con una pureza de 99%.

10

Ejemplo 7: Características generales de Laberintopectina (III)

El compuesto de la fórmula (III) se oxidó después de la exposición al aire para dar los respectivos sulfóxidos. El compuesto de la fórmula (III) contiene 2-*cis*-amidas entre ²Asp-³Trp y ¹¹Thr-¹²Gly.

15

Ejemplo 8: ESI-FTICR-Espectrometría de masas de alta resolución

Una solución de la Laberintopectina de la fórmula (III) en Metanol (c = 0,2 mg/ml) se introdujo a través de una bomba de jeringa a un caudal de 2 µl/min en un Bruker Apex III FTICR MS (7T magnet) equipado con una fuente de electronebulización. Los espectros se registraron en el modo positivo usando un calibre externo.

20

m/z observado en Da (z=2, M+2Na ⁺ ion)	984,3333
Exacto, masa mono-isotópica del neutro [M]	1922,6872
Masa teórica [M] para C ₈₅ H ₁₁₀ N ₂₀ O ₂₄ S ₄	1922,6885
Fórmula molecular	C ₈₅ H ₁₁₀ N ₂₀ O ₂₄ S ₄

25

Ejemplo 9: Análisis de aminoácidos

Hidrólisis: La Laberintopectina (III) (0,05 mg) se hidrolizó en una atmósfera de nitrógeno con HCl 6 N, fenol al 5% a 110°C durante 24 h. El hidrolizado se secó en una corriente de nitrógeno.

30

GC-MS aquiral: El hidrolizado se calentó con bis-(Trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)/Acetonitrilo (1:1) a 150°C durante 4 h. Para los experimentos de GC-MS se usó un capilar de sílice fundida con DB5 (l = 15 m × 0,25 µm sílice fundida recubierta con dimetil-(fenilmetil 5%)-polisiloxano, d_f = 0,10 µm; programa de temperaturas: T = 65°/3°/6/280°C).

GC-MS quiral: El hidrolizado se esterificó con 200 µl de HCl 2 N en etanol a 110°C durante 30 min y se secó. Posteriormente, la mezcla se aciló con 25 µl de TFAA en 100 µl de diclorometano a 110°C durante 10 min y se secó. Para el análisis por GC-MS se usó un capilar de sílice fundida (l = 22 m × 0,25 µm sílice fundida recubierta con chirasil-S-Val (Machery-Nagel), d_f = 0,13 µm; programa de temperaturas: T = 55°/3°/3,2/180°C).

		configuración
Aminoácidos	1 Ala, 1 Thr, 2 Leu, 1 Asp, 2 Cys, 1 Phe, 1 Glu, 2 Trp, 1 Gly	todos S-aminoácidos

15 Ejemplo 10: Espectroscopia RMN

Los espectros de 2-D RMN (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC) se midieron en un espectrómetro de RMN AMX 600 MHz (Bruker, Karlsruhe, Alemania) equipado con una cabeza de sonda de resonancia triple Z-Grad de 5 mm y en un espectrómetro de RMN DRX500 (Bruker, Karlsruhe, Alemania) equipado con una cabeza de sonda inversa de banda ancha Z-Grad de 5 mm. La siguiente tabla muestra las señales obtenidas en las mediciones.

Datos de RMN para la Laberintopectina de la fórmula (III) en DMSO-d₆:

¹ H	0,68; 0,71; 0,75; 0,78; 1,05; 1,07; 1,10; 1,35; 1,40; 1,42; 1,49; 1,90; 1,96; 2,00; 2,10; 2,17; 2,26; 2,77; 2,86; 2,90; 2,97; 3,03; 3,14; 3,16; 3,18; 3,18; 3,20; 3,24; 3,29; 3,30; 3,39; 3,59; 3,67; 3,67; 3,72; 3,99; 4,02; 4,03; 4,10; 4,13; 4,14; 4,16; 4,19; 4,34; 4,36; 4,45; 4,49; 4,59; 6,96; 7,26; 7,00; 7,04; 7,08; 7,08; 7,10; 7,18; 7,22; 7,23; 7,24; 7,24; 7,31; 7,35; 7,36; 7,42; 7,51; 7,53; 7,65; 7,65; 7,69; 7,77; 7,84; 7,98; 8,00; 8,01; 8,56; 10,80; 10,81.
----------------	---

- 17 -

¹³ C	19,7; 21,3; 21,4; 22,6; 23,04; 23,2; 23,7; 26,4; 26,4; 27,1; 33,4; 35,2; 35,4; 36,7; 38,3; 40,0; 40,5; 40,7; 40,8; 40,8; 41,2; 41,2; 43,4; 48,4; 48,7; 49,0; 51,2; 51,4; 52,5; 52,6; 52,7; 53,2; 53,5; 54,0; 56,9; 60,0; 60,3; 66,4; 109,8; 110,6; 111,2; 111,2; 117,4; 118,1; 118,1; 118,2; 120,7; 120,7; 122,1; 123,4; 126,5; 127,2; 127,3; 127,8; 129,4; 136,0; 136,1; 136,6; 140,8; 169,4; 173,0; 174,3; 176,9.
-----------------	---

Ejemplo 11 : Cristalografía de rayos X de Laberintopectina (III)

Condiciones de cristalización: La proteína se disolvió en Tris 0,02 M a pH 8,2 (concentración de 7 mg/ml). Los cristales se desarrollaron a temperatura ambiente por difusión de gotas de vapor de una mezcla 1:1 de la solución de proteína con una solución de etanol al 60%, PEG 6000 al 0,75%, acetato sódico 0,025 M y cloruro sódico 0,05 M. Los cristales se desarrollaron durante aproximadamente una semana.

10

Medición: Los datos de rayos X se recogieron en un difractómetro Bruker 3-circle con ánodo rotatorio y radiación CuK-alfa especular monocroma. Las intensidades se recogieron en un detector de área SMART 6000 CCD.

15 Datos de los cristales:

Fórmula	NaN ₂₀ C ₈₅ S ₄ O ₄₈	NaC ₈₅ N ₂₀ O ₂₄ S ₄
Peso de la fórmula	2220,29	1834,82
Sistema cristalino	ortorrómbico	
Grupo espacial	<i>P</i> 21 21 2 (Nº 18)	
Dimensiones celulares unitarias	<i>a</i> = 41,1360 Å	
	<i>b</i> = 12,8850 Å	
	<i>c</i> = 25,5900 Å	
Volumen celular	13563,66 Å ³	
Z	4	
Densidad, calculada	1,087 g/cm ³	
Código de Pearson	oP732	
Tipo de Fórmula	NO4P20Q48R85	
Secuencia de Wyckoff	c ¹⁸¹ b ³ a	

Coordenadas atómicas:

Nº	Átomo	Nº de Átomo	x	y	z	densidad e ⁻
0	Na	NA	0,26282	1,11533	-0,20024	1,0
1	N	18NH	0,16643	0,62593	0,30751	
2	C	18Ca	0,15933	0,69120	0,26221	
3	C	18Cb	0,12264	0,69329	0,24928	
4	S	18Sg	0,11248	0,78619	0,19945	
5	C	18CO	0,16446	0,80225	0,28144	
6	O	18OC1	0,15211	0,83361	0,32212	
7	O	18OC3	0,17868	0,86558	0,25381	0,290
8	O	18OC2	0,18240	0,86116	0,25780	0,710
9	N	17NH2	0,17255	0,50082	0,39461	0,570
10	C	17Ca2	0,19839	0,49670	0,35604	0,570
11	N	17NH1	0,17994	0,49779	0,40196	0,430
12	C	17Ca1	0,20056	0,49833	0,35678	0,430
13	C	17Cb	0,20165	0,38479	0,33630	1,0
14	S	13S1	0,16523	0,32006	0,32001	
15	C	17CO	0,19312	0,57036	0,31036	
16	O	17OC	0,21276	0,57136	0,27366	
17	N	16NH1	0,11776	0,48825	0,45694	0,570
18	C	16Ca1	0,14725	0,54296	0,47554	0,570
19	C	16Cb2	0,14824	0,52387	0,53451	0,570
20	C	16CO2	0,17744	0,51223	0,44580	0,570
21	O	16OC2	0,20586	0,50283	0,46026	0,570
22	N	16NH2	0,12522	0,46605	0,47460	0,430
23	C	16Ca2	0,15695	0,50741	0,49039	0,430
24	C	16Cb1	0,17666	0,42678	0,52110	0,430
25	C	16CO1	0,17829	0,54862	0,44623	0,430
26	O	16OC1	0,19399	0,62818	0,45350	0,430

- 19 -

27	N	15NH	0,08606	0,28654	0,38875	1,0
28	C	15Ca	0,08545	0,33846	0,43783	
29	C	15Cb	0,07342	0,26519	0,48191	
30	C	15Cg	0,07342	0,31743	0,53443	
31	C	15Cd1	0,09641	0,30051	0,57015	
32	C	15Ce1	0,09892	0,34692	0,61802	
33	C	15Cz	0,07361	0,41607	0,62963	
34	C	15Ce2	0,04891	0,43679	0,59512	
35	C	15Cd2	0,04787	0,38914	0,54580	
36	C	15CO2	0,11795	0,38518	0,45303	0,570
37	O	15OC2	0,14083	0,32503	0,46100	0,570
38	C	15CO1	0,11985	0,37400	0,45272	0,430
39	O	15OC1	0,14260	0,31215	0,44467	0,430
40	N	14NH	0,09663	0,22957	0,28367	1,0
41	C	14Ca	0,06493	0,21832	0,30973	
42	C	14Cb	0,05881	0,10260	0,32228	
43	C	14Cg	0,06148	0,01917	0,28163	
44	C	14Cd1	0,05246	-0,08320	0,30793	
45	C	14Cd2	0,04038	0,05153	0,23556	
46	C	14CO	0,06073	0,27513	0,35936	
47	O	14OC	0,03420	0,31036	0,37413	
48	N	13NH	0,14348	0,21739	0,21016	
49	C	13Ca	0,13259	0,32131	0,22415	
50	C	13Cb	0,15887	0,37393	0,25639	
51	C	13CO	0,10174	0,31603	0,25729	
52	O	13OC	0,08431	0,39162	0,25920	
53	N	12NH	0,13789	0,04315	0,10383	
54	C	12Ca	0,14494	0,06092	0,15913	
55	C	12CO	0,12665	0,15374	0,17941	
56	O	12OC	0,09846	0,17540	0,16440	

57	N	11NH	0,18026	0,23392	0,10274	
58	C	11Ca	0,18245	0,14769	0,06491	
59	C	11Cb	0,21437	0,08040	0,07601	
60	O	11Og	0,24067	0,15367	0,06932	
61	C	11Cg	0,21483	-0,00652	0,03877	
62	C	11CO	0,15298	0,08188	0,06213	
63	O	11OC	0,14289	0,05192	0,01723	
64	N	10NH	0,15427	0,48630	0,10547	
65	C	10Ca	0,15553	0,39216	0,13693	
66	C	10Cb	0,12680	0,38774	0,17495	
67	C	10CO	0,15563	0,30214	0,09785	
68	O	10OC	0,13341	0,29174	0,06737	
69	N	9NH	0,15921	0,62732	0,02599	
70	C	9Ca	0,17078	0,65813	0,07761	
71	C	9Cb1	0,15364	0,74568	0,10696	0,650
72	S	9Sg2	0,11348	0,70773	0,12986	0,650
73	C	9Cb2	0,14430	0,73147	0,09699	0,350
74	S	9Sg1	0,15631	0,80140	0,15424	0,350
75	C	9CO	0,17309	0,56593	0,11423	1,0
76	O	9OC	0,19300	0,56593	0,15084	
77	N	8NH	0,18541	0,52953	-0,09746	
78	C	8Ca	0,16349	0,52728	-0,05346	
79	C	8Cb	0,15665	0,41428	-0,03791	
80	S	4S1	0,14207	0,33194	-0,08922	
81	C	8CO	0,17870	0,57819	-0,00528	
82	O	8OC	0,20763	0,56423	0,00430	
83	N	7NH	0,20632	0,49826	-0,20125	
84	C	7Ca	0,21045	0,59830	-0,17558	1,0
85	C	7Cb	0,20977	0,68941	-0,21403	
86	C	7Cg	0,23965	0,69290	-0,24846	

- 21 -

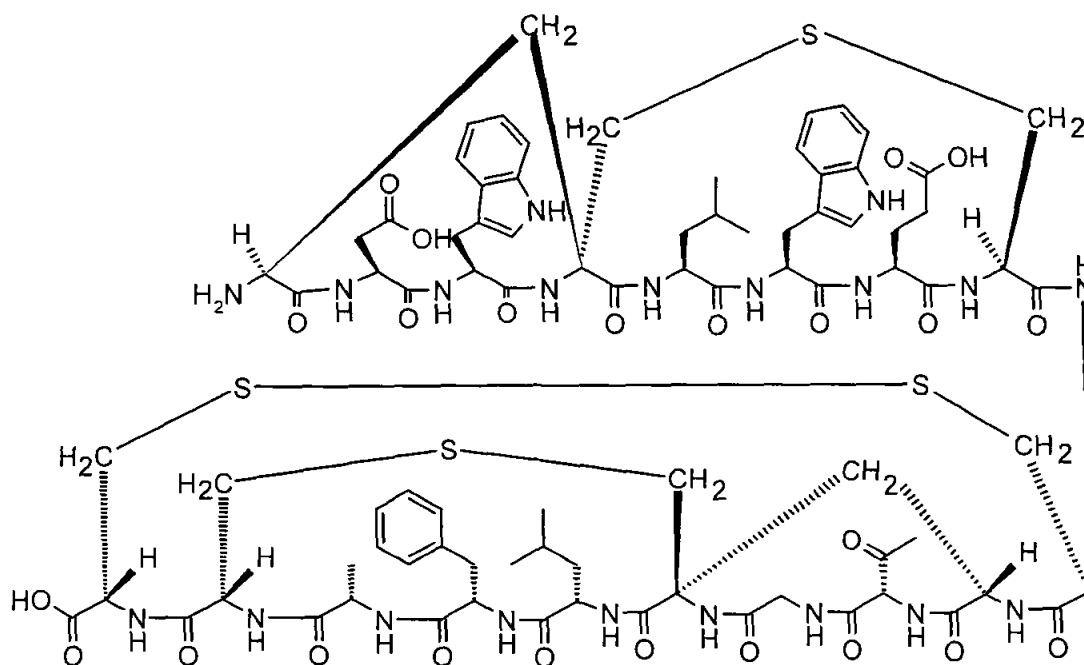
87	C	7Cd	0,27179	0,70780	-0,21942	
88	O	7O2	0,27356	0,77789	-0,18617	
89	O	7O2	0,29422	0,64688	-0,23185	
90	C	7CO	0,18551	0,60947	-0,13036	
91	O	7OC	0,16934	0,68669	-0,12474	
92	N	6NH	0,14508	0,31502	-0,23408	
93	C	6Ca	0,17581	0,36438	-0,24779	
94	C	6Cb	0,17865	0,38440	-0,30618	
95	C	6Cg	0,21065	0,42228	-0,32263	
96	C	6Cd1	0,24023	0,37835	-0,31634	
97	N	6Ne	0,26396	0,43927	-0,33810	
98	C	6Ce2	0,24957	0,52674	-0,35877	
99	C	6Cd2	0,21551	0,51704	-0,34959	
100	C	6Ce1	0,19382	0,59341	-0,36554	
101	C	6Cz1	0,20739	0,67707	-0,39101	
102	C	6Ch	0,24169	0,68111	-0,39910	
103	C	6Cz2	0,26459	0,61009	-0,38421	
104	C	6CO	0,17783	0,46644	-0,21817	
105	O	6OC	0,15276	0,51859	-0,21294	
106	N	5NH	0,09092	0,22755	-0,18031	
107	C	5Ca	0,10636	0,17447	-0,22462	
108	C	5Cb	0,08579	0,17788	-0,27331	
109	C	5Cg1	0,06556	0,08855	-0,29223	0,400
110	C	5Cd2	0,05562	0,00295	-0,25553	0,400
111	C	5CD3	0,03406	0,13232	-0,31950	0,400
112	C	5Cg2	0,05122	0,12511	-0,26843	0,600
113	C	5Cd1	0,05227	0,02119	-0,24021	0,600
114	C	5Cd2	0,03647	0,22422	-0,25795	0,600
115	C	5CO	0,14049	0,21405	-0,23552	1,0
116	O	5OC	0,16220	0,15250	-0,24447	

- 22 -

117	N	4NH	0,04424	0,29531	-0,10297	
118	C	4Ca	0,07828	0,26318	-0,08968	
119	C	4Cb	0,09901	0,36213	-0,08847	
120	C	4CO	0,09150	0,19084	-0,13193	
121	O	4OC	0,10378	0,10656	-0,12020	
122	N	3NH	-0,02049	0,37136	-0,10602	
123	C	3Ca	-0,01386	0,26387	-0,12087	
124	C	3Cb	-0,02263	0,24478	-0,17726	
125	C	3Cg	-0,05642	0,26752	-0,19336	
126	C	3Cd1	-0,08244	0,28646	-0,16303	
127	N	3Ne	-0,10966	0,30431	-0,19328	
128	C	3Ce2	-0,10052	0,29888	-0,24451	
129	C	3Cd2	-0,06697	0,27528	-0,24627	
130	C	3Ce1	-0,05275	0,26512	-0,29539	
131	C	3Cz1	-0,07001	0,27753	-0,33970	
132	C	3Ch	-0,10351	0,30097	-0,33634	
133	C	3Cz2	-0,11905	0,31339	-0,29019	
134	C	3CO	0,02125	0,22763	-0,11313	
135	O	3OC	0,02703	0,13349	-0,11547	
136	N	2NH	0,00873	0,33093	-0,00078	
137	C	2Ca	-0,02584	0,34024	-0,01079	
138	C	2Cb	-0,04293	0,38712	0,03587	
139	C	2Cg	-0,07852	0,41234	0,02763	
140	O	2Od1	-0,09430	0,35452	-0,00285	
141	O	2Od2	-0,09060	0,48825	0,05303	
142	C	2CO	-0,02912	0,40784	-0,06006	
143	O	2OC	-0,03851	0,49903	-0,05444	
144	N	1NH	0,07381	0,20163	0,05701	
145	C	1Ca	0,06250	0,25417	0,00903	
146	C	1Cb	0,07969	0,20450	-0,03763	

147	C	1CO	0,02526	0,24331	0,00649	
148	O	1OC	0,01235	0,15545	0,00653	

Ejemplo 12: Oxidación de Laberintopectina (III)



5

Se disolvieron 50 mg de Laberintopectina (III) (0,026 mmol) en 1 ml de DMSO y se mezclaron con 11 mg de 1-hidroxi-1-óxido-1,2-benziodoxol-3(1H)-ona (IBX, 0,039 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 6 h a 40°C y durante 12 h más a temperatura ambiente y posteriormente se purificó por HPLC de fase inversa sobre una columna Phenomenex Luna® Axia 5 μ m C18 (2) (dimensiones: 100 mm x 30 mm) con una pre-columna XTerra® Prep MS C18 10 μ m (Waters, Dimensiones: 19 x 10 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo en agua de 5% a 95% durante 30 min (que contenía acetato amónico al 0,1%, pH 7,0) como eluyente. El flujo de la columna (60 ml/min) se fraccionó y se sometió a detección UV. Las fracciones 7 a 11 contenían el compuesto deseado. Dichas fracciones produjeron 25 mg (50%) después de la liofilización. El producto se caracterizó por espectroscopía de masas (Bruker Daltonics MicroTof).

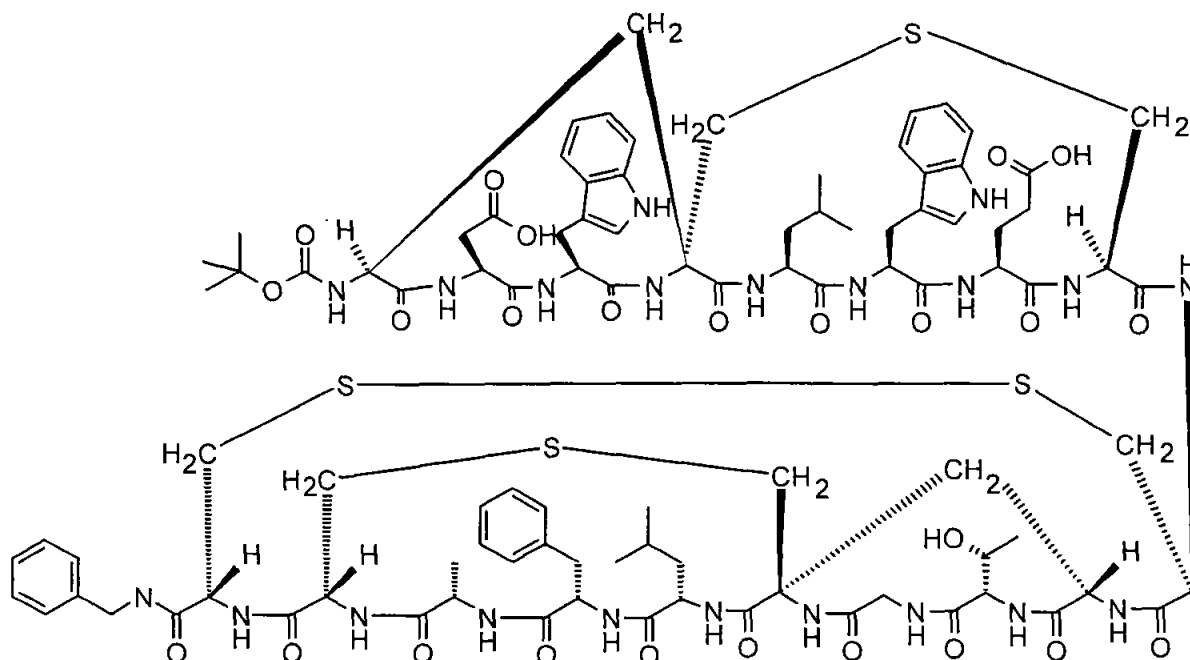
UV: 222 sh, 278 nm

20 ESI-MS: PM = 1920,66518 (mono PM)

Fórmula molecular: C₈₅H₁₀₈N₂₀O₂₄S₄

Peso molecular (PM) = 1922,2

Ejemplo 13: Síntesis peptídica en el extremo terminal C de Laberintopectinas (III)



5

Se disolvieron 40 mg de Laberintopectina (III) (0,021 mmol) en 2 ml de dimetilformamida abs. y la mezcla se trató con 10 mg (0,045 mmol) de dicarbonato de di-*terc*-butilo (Boc₂O) y 7 mg (0,054 mmol) de diisopropiletilamina durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 6,8 mg (0,063 mmol) de bencilamina y 50 µl (0,072 mmol) de una solución al 50% de anhídrido del ácido propilfosfónico en DMF. La mezcla de reacción se purificó por HPLC de fase inversa sobre una columna Waters XBridge Shield® 5 µm C18 (dimensiones: 100 mm x 30 mm) que contenía una precolumna XBridge Shield® C18 10 µm (Waters, dimensiones: 19 x 10 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo en agua de 5% a 95% durante 30 min (que contenía acetato amónico al 0,1%, pH 7,0) como eluyente. El flujo de la columna (60 ml/min) se fraccionó y se sometió a detección UV. Las fracciones 30 y 31 se combinaron y produjeron 9,6 mg (22%) del compuesto deseado. El producto se caracterizó por espectroscopía de masas (Bruker Daltonics MicroTof).

10

15

20

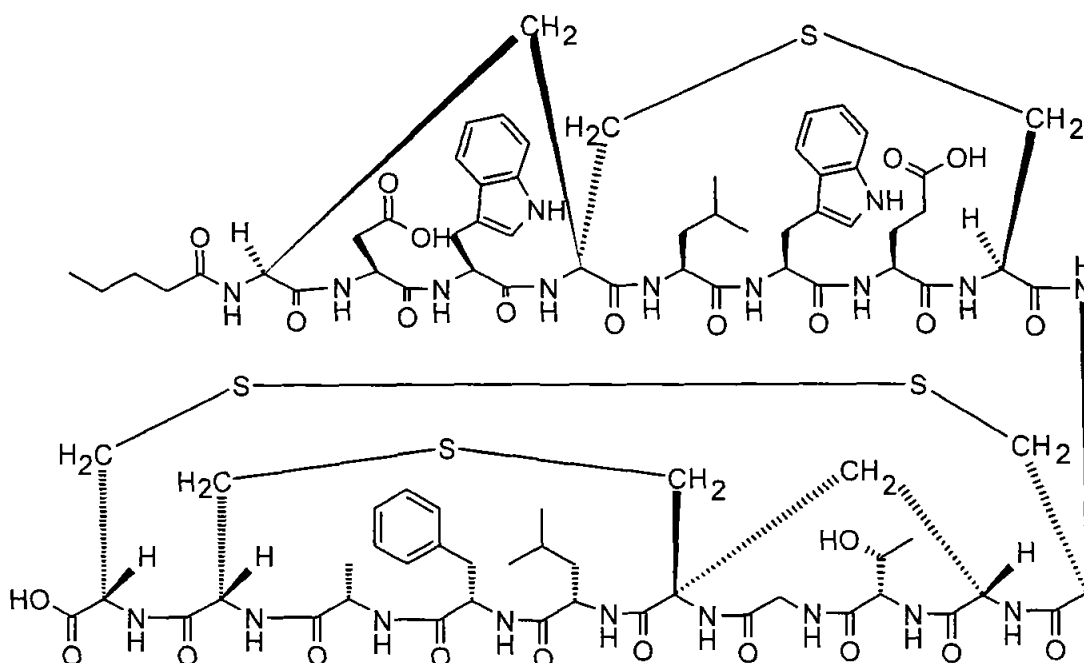
UV: 222 sh, 276 nm

ESI-MS: PM = 2111,79018 (mono PM)

Fórmula molecular: C₉₇H₁₂₅N₂₁O₂₅S₄

Peso molecular (PM) = 2113,5

Ejemplo 14: Síntesis peptídica en el extremo terminal N de Laberintopectinas (III)



5

Se disolvieron 5 mg (0,028 mmol) de 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT) en 2 ml de dimetilformamida abs. y se mezclaron con 8,6 mg (0,085 mmol) de N-metilmorfolina (NMM). La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadieron 3,3 mg (0,028 mmol) de ácido n-caprónico y la mezcla se agitó durante 30 min más a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 40 mg (0,021 mmol) de Laberintopectina (III) y la mezcla resultante se agitó durante 2 h más a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó por HPLC de fase inversa sobre una columna Waters XBridge Shield® 5 µm C18 (dimensiones: 100 mm x 30 mm) con una precolumna XBridge Shield® C18 10 µm (Waters, dimensiones: 19 x 10 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo en agua de 5% a 95% durante 30 min (que contenía ácido fórmico al 0,1%, pH 2,0) como eluyente. El flujo de la columna (60 ml/min) se fraccionó y se sometió a detección UV. Las fracciones 38 a 40 se combinaron y produjeron 11,0 mg (26%) del compuesto deseado. El producto se caracterizó por espectroscopía de masas (Bruker Daltonics MicroTof).

20

UV: 220 sh, 278 nm

ESI-MS: PM = 2020,75738 (mono PM)

Fórmula molecular: C₉₁H₁₂₀N₂₀O₂₅S₄

Peso molecular (PM) = 2022,3

5

Ejemplo 15: Actividad antibacteriana

Después de cultivar los organismos en caldo de extracto líquido de carne de vaca, las suspensiones de bacterias se ajustaron hasta alcanzar una densidad definida por dilución con medio de cultivo recién preparado ($5 \cdot 10^5$ organismos/ml).

10

Se disolvió la Laberintopectina (III) y se diluyó con agua en una serie de diluciones geométrica (factor 2). Se mezclaron 1,5 ml de la solución en las etapas de dilución individuales con 13,5 ml de agar líquido (agar Müller-Hinton) a aproximadamente 45°C.

15

La concentración máxima de compuesto en el la placa petri era normalmente de 100 mg/l. Una placa de agar sin compuesto sirvió como control.

Después de que el medio de cultivo se hubiera enfriado y solidificado, las placas de agar se inocularon simultáneamente con 20 cepas diferentes de bacterias usando un inoculador Multipoint que liberaba $5 \cdot 10^4$ unidades formadoras de colonias (cfu) por aplicación de inoculación y después se incubaron a 37°C durante 17 horas en condiciones aerobias.

20

Después de la incubación, las placas se examinaron macroscópicamente para determinar la concentración mínima de compuesto a la que dejó de ser visible el crecimiento bacteriano. Era indiferente una única colonia o un crecimiento turbio en la aplicación de la inoculación.

25

El efecto antibacteriano se evaluó como la Concentración Mínima Inhibidora del compuesto de ensayo (CMI: mínima concentración de compuesto a la que dejó de ser visible macroscópicamente el crecimiento bacteriano):

Organismo de ensayo	CMI
Staphylococcus aureus SG 511	12,5 mg/l
Staphylococcus aureus 285	12,5 mg/l
Staphylococcus aureus 503	3,13 mg/l
Streptococcus pyogenes 308 A	3,13 mg/l

Streptococcus pyogenes 77 A	3,13 mg/l
Streptococcus faecium D	6,25 mg/l

Ejemplo 16: Actividad antiviral

Los virus sólo pueden multiplicarse en células vivas. Por lo tanto, se realizaron estudios virales en cultivos celulares. Los virus se seleccionaron por su importancia como agentes infecciosos o estructuras bioquímicas o morfológicas típicas.

Se prepara una serie de diluciones de Laberintopectina (III) en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se añaden células Hela o Vero, de acuerdo con el virus de infección, para dar una monocapa confluyente en 24 h de inoculación. Después de la incubación durante 3 horas, se añade el virus respectivo a las células en una concentración que se espera que destruya completamente la monocapa celular en 2 días. Los cultivos se incuban a 37°C en un incubador gasificado (CO₂ al 5% en aire). Después de 24 horas, la dosis máxima tolerada del compuesto de ensayo (DMT) en el cultivo celular se evalúa por examen microscópico. Los resultados se compararon con tejido de control no infectado y un control de infección correspondiente:

Nº	Organismo hospedador	Organismo de ensayo	Inhibición [mg/l]
1	Células Vero	Micovirus (ARN/Influenza A/Aichi)	44,44
2	Células Hela	Herpes (ADN), Simplex 1	133,33
3	Células Vero	Herpes (ADN), Simplex 2 VR 734	44,44
4	Células Hela	Adenovirus (ADN), 5"	133,33

Ejemplo 17: Actividad para el dolor neuropático

La Laberintopectina (III) se estudió en el modelo de ratón de lesión selectiva del nervio (SNI) de dolor neuropático con el fin de demostrar la actividad sobre el tacto. Con anestesia general, se han ligado y transeccionado las dos ramas principales del nervio ciático en ratones C57B6 machos adultos (22,7g ± 0,26SEM), dejando intacto el nervio sural izquierdo. Se ha determinado la alodinia táctil con el

ensayo automático de von Frey: usando un filamento de aguja de descarga, la piel plantar de las patas traseras se expuso a un estímulo de presión de intensidad creciente de hasta 5 g. La fuerza en gramos a la que el animal respondió retirando la pata trasera se usó como lectura de salida para la alodinia táctil. El estudio se realizó 7 días después de la lesión nerviosa durante 6 horas con una medición adicional después de 24 horas. En los dos días posteriores a la transección nerviosa, la alodinia táctil se desarrolló completamente y permaneció estable durante al menos dos semanas. El compuesto se administró por vía intravenosa como una única aplicación (3 mg/kg). Como vehículo para la aplicación intravenosa, se eligió 1:1:18 de (Etanol:Solutol:solución salina tamponada con fosfato).

Las mediciones del umbral de retirada de la pata (PWT) se han usado para calcular los efectos de tratamiento significativos, y para los cálculos de AUC durante un periodo de tiempo de referencia (6 horas) y los cálculos posteriores de % de beneficios. Para el análisis estadístico, se usaron los valores PWT de las patas traseras ipsilaterales de dos maneras: primero, con un ANOVA de 2 vías basado en los valores de PWT para tiempos específicos (dentro de un periodo de 24 horas) y segundo con un ANOVA de 1 vía sobre valores AUC delta no transformados [AUC1-6 hora].

El Análisis de varianza de 2 vías con mediciones repetidas (Factor repetido: TIEMPO, variable del análisis: PWT) seguido de un Análisis Complementario (Efecto del factor GRUPO para cada nivel de factor TIEMPO (análisis de Winer), variable del análisis: PWT) y un ensayo de Dunnett posterior para el factor TRATAMIENTO para cada nivel de factor TIEMPO (comparación bilateral frente a nivel VEHÍCULO) reveló diferencias muy significativas del grupo de vehículo de 1 a 6 horas después de la aplicación intravenosa para cada compuesto. El efecto desapareció 24 horas después de la aplicación. El ANOVA de 1 vía usando valores delta [AUC1-6 hora] reveló un valor p de $p < 0,0001$. El análisis de Dunnett proporcionó efectos de tratamiento significativos para los dos compuestos. El porcentaje de beneficio del tratamiento se evaluó usando los valores [AUC1-6 hora] del grupo de vehículo ipsilateral (beneficio de 0%) y todos los valores [AUC1-6 hora] de los lados contralaterales de los tres grupos (beneficio del 100% = efecto máximo posible). En comparación con estos valores marginales, la Laberintopectina (III) consiguió un beneficio del 97%.

En conclusión, el compuesto reduce significativamente la alodinia táctil en el modelo de ratón SNI de dolor neuropático.

Ejemplo 18: Actividad en el dolor provocado por inflamación

Se estudió la laberintopectina (III) en el modelo de inflamación de pata trasera inducida por carragenina (CAR) en ratones para demostrar la actividad sobre la hiperalgesia térmica, una lectura de salida típica para el dolor provocado por inflamación.

Inducción de inflamación en la pata trasera: Con una anestesia general ligera con isoflurano, se inyectó CAR al 2% (Sigma, Deisenhofen, Alemania) en 20 µl de solución salina en el aspecto plantar de las dos patas traseras de ratones C57B6 macho. Se determinaron las latencias de retirada de la pata (PWL) tras la exposición de las patas a un estímulo térmico definido usando un aparato disponible en el mercado (Plantar Test Ugo Basile Biological Research Apparatus, Comerio, Italia) equipado con una minicámara para asegurar la colocación apropiada del calor infrarrojo debajo de la pata trasera de interés. Los ratones se mantuvieron en las jaulas de ensayo durante todo el periodo de estudio (6 horas).

Medición de hiperalgesia térmica: El investigador acciona el cronómetro que mide la duración del reflejo de la luz infrarroja por la pata trasera y lo detiene si el animal está agitando la pata trasera afectada. Se fijó el límite a 16 segundos para prevenir lesiones en los tejidos. El estudio se realizó antes y durante las 6 horas posteriores a la inyección de CAR. Como lectura de salida para un análisis adicional se usaron las latencias de retirada de la pata en segundos.

Como vehículo para la aplicación intravenosa se eligió el vehículo 1:1:18 (etanol:Solutol:solución salina tamponada con fosfato).

Las mediciones de las latencias de retirada de la pata (PWL) se han usado para calcular los efectos del tratamiento significativos, y para los cálculos de AUC durante un periodo de tiempo de referencia (6 horas) y los posteriores cálculos de efectos beneficiosos en %. Para el análisis estadístico, los valores de PWL de las dos patas traseras se usaron de dos formas: en primer lugar, con un análisis de varianza de 2 vías (ANOVA) basado en los valores de PWL para tiempos específicos (dentro de un periodo de 6 horas) y en segundo lugar con un ANOVA de 1 vía sobre valores de AUC delta no transformados [AUC1-6 horas].

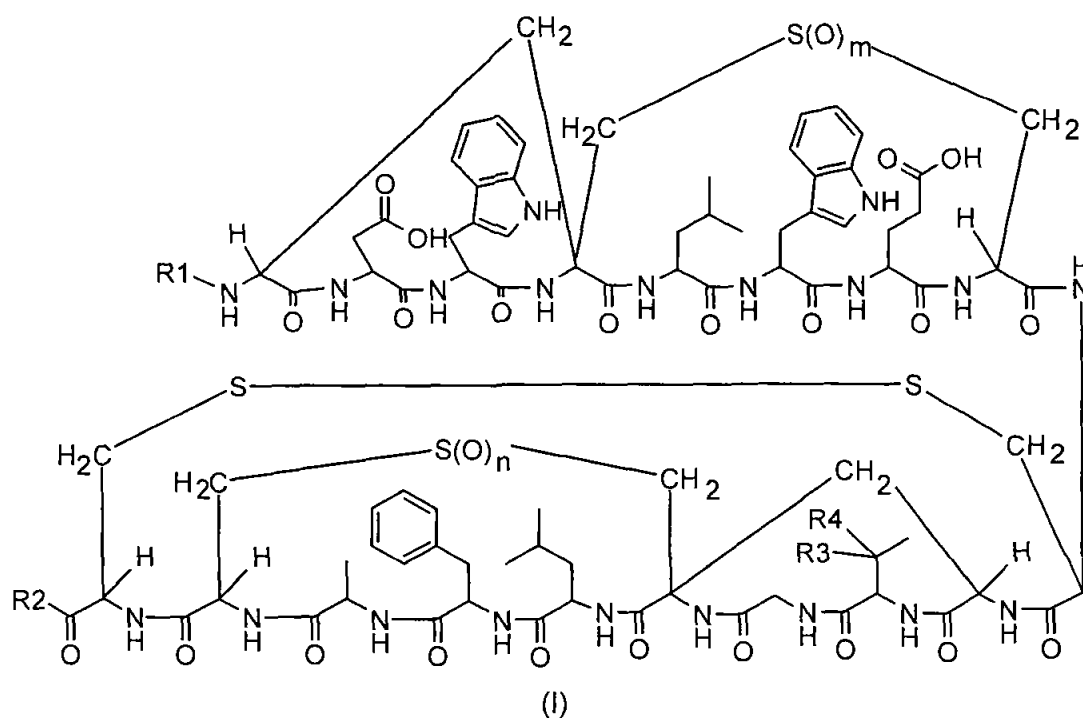
El análisis de varianza de 2 vías con mediciones repetidas (factor repetido:

TIEMPO, variable de análisis: PWL) seguido de un análisis complementario (efecto del factor GRUPO para cada nivel de factor TIEMPO (análisis de Winer), variable de análisis: PWL) y un ensayo de Dunnett posterior para el factor DOSIFICACIÓN para cada nivel de factor TIEMPO (comparación bilateral frente a nivel 0 = VEHÍCULO) reveló diferencias muy significativas del grupo de vehículo desde 1 a 2 horas después de la aplicación intravenosa de las dos dosificaciones. El efecto desapareció 4 horas después de la aplicación. El ANOVA de 1 vía usando valores delta |AUC1-6 horas| reveló un valor de $p < 0,0001$. El análisis de Dunnett proporcionó efectos del tratamiento significativos para las dos dosificaciones. El porcentaje de beneficio del tratamiento se evaluó usando los valores de |AUC1-6 horas| del grupo de vehículo (0% de beneficio) y todos los valores de |AUC1-6 horas| antes de inyectar CAR (valor basal teórico durante 6 horas = máximo efecto posible = efecto de 100%). En comparación con estos márgenes, el grupo de dosificación de 1 mg/kg consiguió un beneficio de 37% y el grupo de 10 mg/kg de 34%.

En conclusión, el compuesto redujo significativamente la hiperalgesia térmica en el modelo de dolor provocado por inflamación inducido por CAR en ratón.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I)



en la que

R1 es H, C(O)-alquilo (C₁-C₆) o C(O)-O-alquilo (C₁-C₆);

- 10 R2 es OH, NH₂, NH-alquilo (C₁-C₆), NH-alquileno (C₁-C₄)-fenilo o NH-alquileno (C₁-C₄)-piridilo;

R3 y R4, independientemente entre sí, son H o OH, o R3 y R4 juntos son =O; y

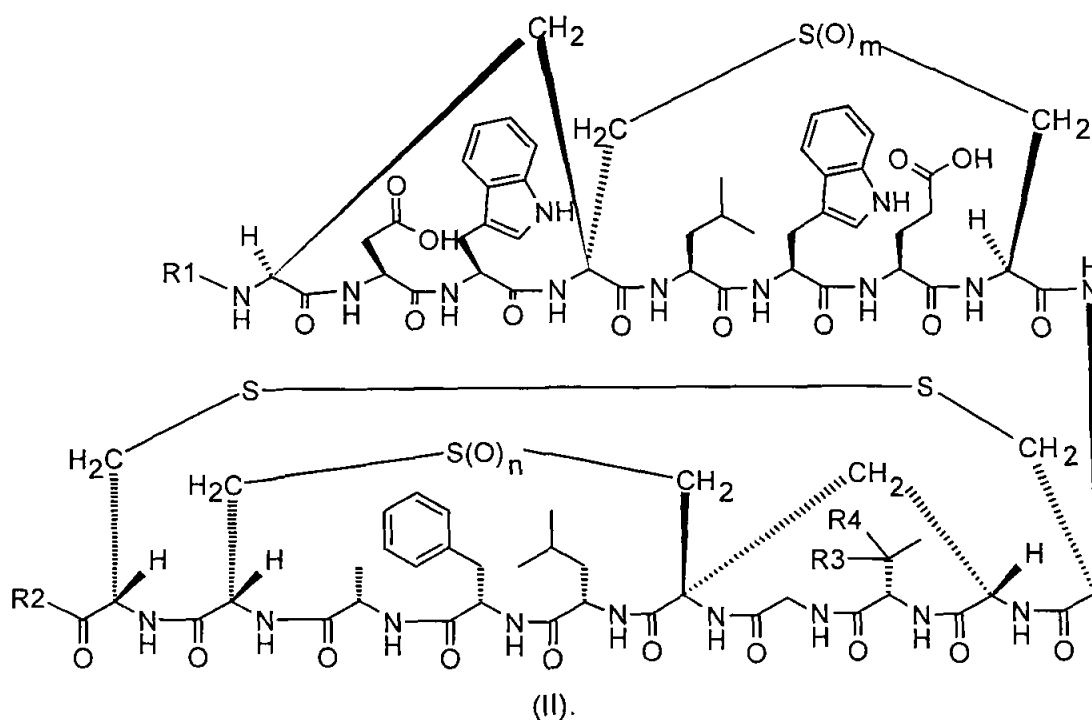
m y n son, independientemente entre sí, 0, 1 ó 2;

en cualquier forma estereoquímica, o una mezcla de varias formas estereoquímicas

- 15 cualesquiera en cualquier proporción, o una sal fisiológicamente tolerable del mismo.

2. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado por la fórmula (II)

- 32 -



3. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 ó 2, en el que R1 es H.
4. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1 ó 3, en el que R2 es OH.
- 10 5. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1 ó 4, en el que R3 y R4 son H o OH donde, si R3 es OH, entonces
R4 es H, o si R3 es H, entonces R4 es OH, o R3 y R4 juntos son =O.
6. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 5, en el que R3 es OH y R4 es H, o si R3 es H, R4 es OH.
7. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 6, en el que m y n son los dos 0, o m y n son los dos 2, o m es
0 y n es 2, o m es 2 y n es 0.
- 20 8. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 7, en el que m y n son los dos 0.

- 33 -

9. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que R1 es H; R2 es OH; R3 y R4, independientemente entre sí, son H o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, y si R3 es H, entonces R4 es OH; y m y n son, independientemente entre sí, 0, 1 ó 2.

5

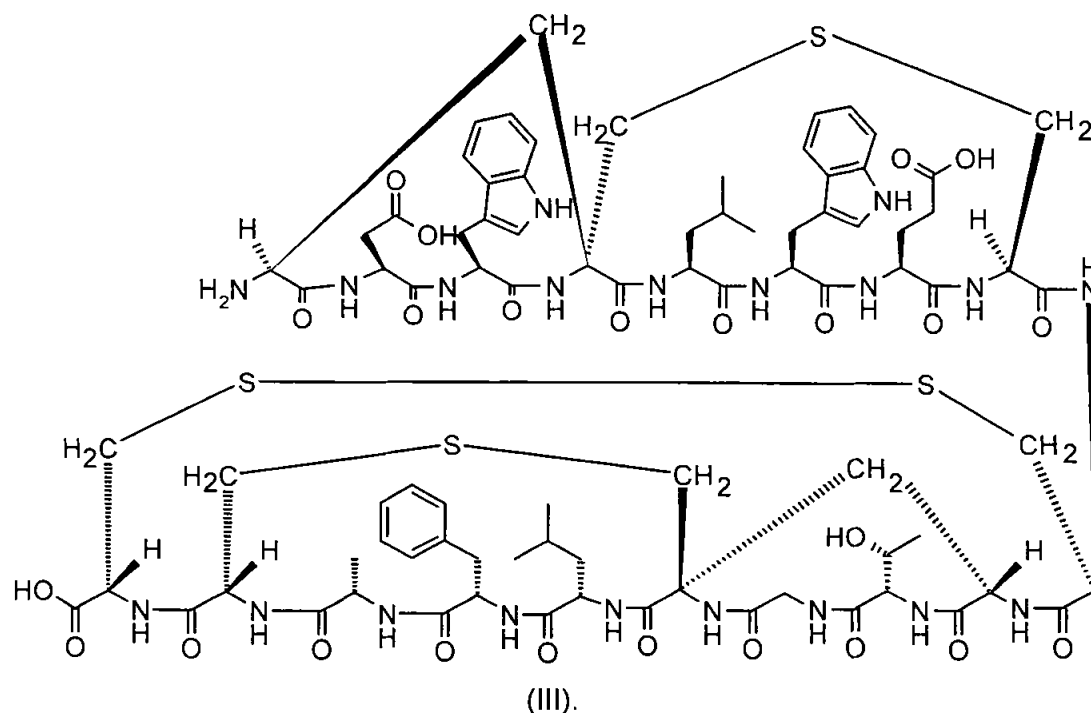
10. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R1 es H; R2 es OH; R3 y R4, independientemente entre sí, son H o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, y si R3 es H, entonces R4 es OH; y m y n son los dos 0, o m y n son los dos 2, o m es 0 y n es 2, o m es 2 y n es 0.

10

11. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que R1 es H; R2 es OH; R3 y R4, independientemente entre sí, son H o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, y si R3 es H, entonces R4 es OH; y m y n son los dos 0.

15

12. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por un compuesto de la fórmula (III)



20

13. Un compuesto aislado de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), caracterizado por una masa molecular neutra monoisotópica de 1922,6872 Da, y

una fórmula molecular de $C_{85}H_{110}N_{20}O_{24}S_4$.

14. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas, infecciones virales y/o dolor.

15. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable.

10

16. Un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende

a) fermentación de la cepa *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), o una de sus variantes y/o mutaciones, en condiciones adecuadas en un medio de cultivo hasta que uno o más de los compuestos de la fórmula (I) se acumulen en el medio de cultivo,

15

b) aislamiento de un compuesto de la fórmula (I) a partir del medio de cultivo, y
c) derivatización del compuesto de la fórmula (I), cuando sea apropiado, y/o, cuando sea apropiado, conversión en una sal fisiológicamente tolerada.

20

17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el compuesto (I) se caracteriza por un compuesto de la fórmula (II).

18. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, en el que el compuesto (I) se caracteriza por un compuesto de la fórmula (III).

25

19. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que m y n son los dos 0, o m y n son los dos 2, o m es 0 y n es 2, o m es 2 y n es 0.

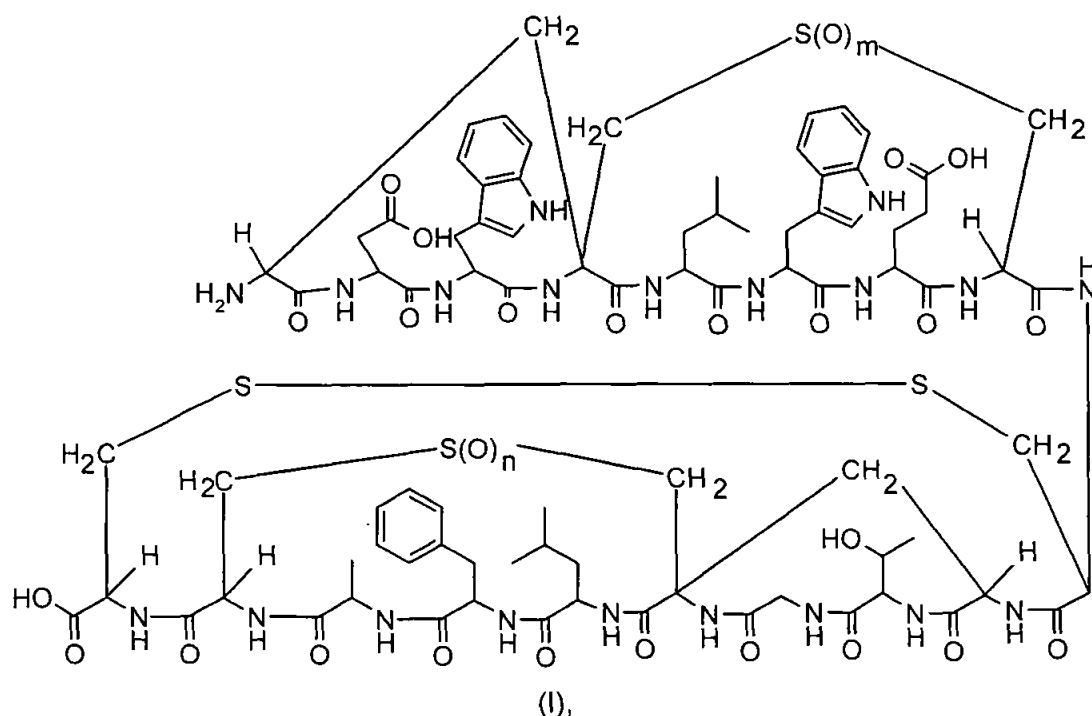
30

PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRALES DE ACTINOMADURA NAMIBIENSIS

Resumen

5

La invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I)



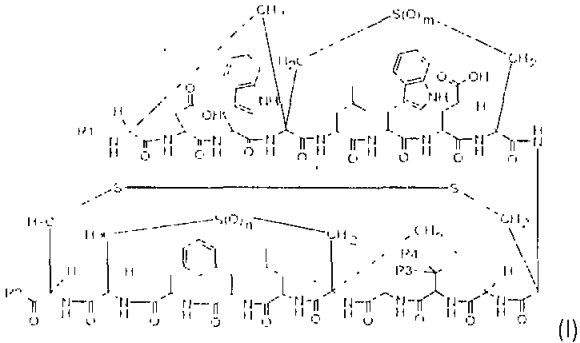
- 10 en la que R3 y R4 son, independientemente entre sí, H o OH, y en donde m y n son, independientemente entre sí, 0, 1 ó 2, que puede obtenerse a partir de *Actinomadura namibiensis* (DSM 6313), a su uso para el tratamiento de infecciones bacterianas, infecciones virales y/o dolor y a una composición farmacéutica que lo comprende. El compuesto de la fórmula (I) ha sido definido como Laberintopeptinas
- 15 y consiste en una estructura peptídica fuertemente unida de 18 aminoácidos que contiene residuos tipo lantiomina y análogos de aminoácidos alfa-disustituídos. La secuencia de aminoácidos es XDWXLWEXCXTGXLFAXC, en donde los dos residuos Cys forman un puente disulfuro y cada X representa, independientemente,
- 20 uno de los aminoácidos no naturales implicados en los enlaces de unión.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) N° de solicitud		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional			
(71) Solicitante(s) SANOFI-AVENTIS			
(72) Inventor(es) Prof. Dr. GERHARD SEIBERT, Dr. LÁSZLÓ VÉRTESY, Dr. JOACHIM WINK, Dr. IRVIN WINKLER, Dr. MARK BROENSTRUP, Dr. HOLGER HOFFMANN, Dr. HANS GUEHRING, Dr. LUIGI TOTI, Prof. Dr. RODERICH SÜSSMUTH, Prof. Dr. GEORGE M. SHELDRICK, Dr. KATHRIN MEINDL			
(74) Apoderado. DR. LUIS PATIÑO LEYVA			
(30) Prioridad	(31) N° Prioridad 06020980.6	(32) Fecha 06/10/2006	(33) País EP
(85) Fecha inicio fase nacional		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 10/04/2008	
Fecha de presentación de la solicitud: 25/09/2007		N° publicación: WO 2008/040469 A1	
N° de solicitud PCT/EP2007/008294			
(54) Título. PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRALES DE ACTINOMADURA NAMIBIENSIS			

Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
		DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	
		EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN	
SUPERINTENDENCIA		SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud		(51) int Cl.:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) SANOFI-AVENTIS	
(30) Prioridad	31) N° Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	06020980.6	06/10/2006	EP
		(72) Inventor(es) Prof. Dr. GERHARD SEIBERT Dr. LÁSZLÓ VÉRTESY Dr. JOACHIM WINK Y OTROS	
		(74) Apoderado DR. LUIS PATIÑO LEYVA	
(85) Fecha limite inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 10/04/2008	
Fecha de presentación de la solicitud 25/09/2007		N° publicación: WO 2008/040469 A1	
N° de solicitud PCT/EP2007/008294			
(54) Titulo PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRALES DE ACTINOMADURA NAMIBIENSIS			

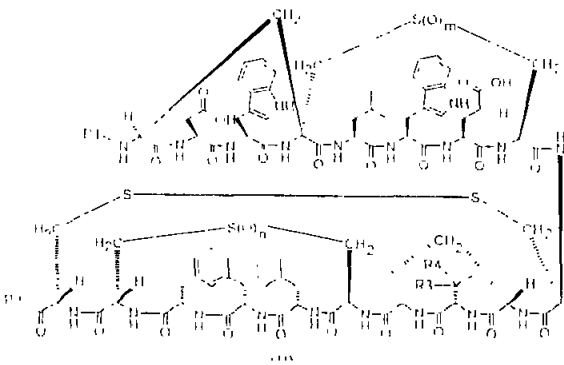
Reivindicacion(es):

1 Un compuesto de la fórmula (I)



en la que
R1 es H, C(O)-alquilo (C1-C6) o C(O)-O-alquilo (C1-C6);
R2 es OH, NH2, NH-alquilo (C1-C6), NH-alquileo (C1-C4)-fenilo
o NH-alquileo (C1-C4)-piridilo,
R3 y R4, independientemente entre sí, son H o OH, o R3 y R4
juntos son =O, y
m y n son, independientemente entre sí, 0, 1 ó 2,
en cualquier forma estereoquímica, o una mezcla de varias
formas estereoquímicas cualesquiera en cualquier proporción,
o una sal fisiológicamente tolerable del mismo.

2 Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicacion 1 caracterizado por la formula (II)



3. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R1 es H
4. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que R2 es OH
5. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4, en el que R3 y R4 son H o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, o si R3 es H, entonces R4 es OH, o R3 y R4 juntos son =O.
6. Un compuesto de la formula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R3 es OH y R4 es H, o si R3 es H, R4 es OH.
7. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que m y n son los dos 0, o m y n son los dos 2, o m es 0 y n es 2, o m es 2 y n es 0
8. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que m y n son los dos 0.
9. Un compuesto de la formula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que R1 es H, R2 es OH; R3 y R4, independientemente entre sí son H o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, y si R3 es H, entonces R4 es OH; y m y n son, independientemente entre sí, 0, 1 o 2.
10. Un compuesto de la formula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R1 es H, R2 es OH; R3 y R4, independientemente entre sí, son H o OH donde, si R3 es OH, entonces R4 es H, y si R3 es H, entonces R4 es OH; y m y n son los dos 0, o m y n son los dos 2, o m es 0 y n es 2, o m es 2 y n es 0

83
B

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Patentabteilung K 801
Vorg. 422

To:

SIEBER, Frank
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Patentabteilung
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 18 December 2007 (18.12.2007)	Eing.: 09. Jan. 2008	
Applicant's or agent's file reference DE2006/039	☐ wv. ☒ obliegen ☐ Vert. wie Vorg. / angegeben	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2007/008294	International filing date (day/month/year) 25 September 2007 (25.09.2007)	

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☒ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person

 ☐ the name

 ☐ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

GUEHRING, Hans
/c Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
Germany

DE

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the records as Applicant for the United States of America only and Inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office

 ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority

 ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority

 ☐ other:
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Aumaitre Chantal

Facsimile No. +41 22 338 70 80

e-mail pt11.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 11

84
H

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 42.1)
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Patentabteilung K 801
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

To:

SIEBER, Frank
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Patentabteilung
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 18 December 2007 (18.12.2007)	Eing.: 09. Jan. 2008	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference DE2006/039	☐ vv.	
International application No. PCT/EP2007/008294	☒ ablegen ☐ Vert. wie Vorg. / angegeben	International filing date (day/month/year) 25 September 2007 (25.09.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☒ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

TOTI, Luigi
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
Germany

CH

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the records as Applicant for the United States of America only and Inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority
 ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Aumaitre Chantal

e-mail pt11.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 11

Facsimile No. +41 22 338 70 80

85
75

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 412)

To:

SIEBER, Frank
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Patentabteilung
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt am Main
GERMANY

Date of mailing (day/month/year) 18 December 2007 (18.12.2007)	Vorg. Eing.: 09. Jan. 2008	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference DE2006/039	☐ Wv. ☒ ablegen ☐ Vert. wie Vorg. / angegeben	
International application No. PCT/EP2007/008294	International filing date (day/month/year) 25 September 2007 (25.09.2007)	

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☒ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person

 ☐ the name

 ☐ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

HOFFMANN, Holger
/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
Germany

DE

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the records as Applicant for the United States of America only and Inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office

 ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority

 ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority

 ☐ other:
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Aumaitre Chantal

e-mail pt11.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 11

Facsimile No. +41 22 338 70 80

86
78

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions)Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Patentabteilung K 801

To:

SIEBER, Frank
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Patentabteilung
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 18 December 2007 (18.12.2007)	Vorg.	
Applicant's or agent's file reference DE2006/039	Eing.: 09. Jan. 2008	
International application No. PCT/EP2007/008294	☐ wv. ☒ ablegen ☐ Vert. wie Vorg./angegeg.	International filing date (day/month/year) 25 September 2007 (25.09.2007)

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☒ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address BROENSTRUP, Mark /o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH 65926 Frankfurt am Main Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the records as Applicant for the United States of America only and Inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Aumaitre Chantal e-mail pt11.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 11
---	--

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Form PCT/IB/306 (October 2005)

I/DHQH67JX0

87
B

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

Eing.: 10. Dez. 2007

(PCT Administrative Instructions, Section 111)

To:

SIEBER, Frank
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Patentabteilung
Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Date of mailing (day month year)

27 November 2007 (27.11.2007)

Applicant's or agent's file reference

DE2006/039

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/EP2007/008294

International filing date (day month year)

25 September 2007 (25.09.2007)

International publication date (day month year)

Not yet published

Priority date (day month year)

06 October 2006 (06.10.2006)

Applicant

SANOFI-AVENTIS et al

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR" in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)

2. *(If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date

Priority application No.

Country or regional Office
or PCT receiving OfficeDate of receipt
of priority document

06 October 2006 (06.10.2006)

06020980.6

EP

29 October 2007 (29.10.2007)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yolaine Cussac

Facsimile No +41 22 338 82 70

e-mail PT11.PCT@WIPO.INT

Telephone No +41 22 338 74 11