



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 814**

51 Int. Cl.:  
**C07D 498/04** (2006.01)  
**A61K 31/395** (2006.01)  
**A61P 31/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08784525 .1**  
96 Fecha de presentación : **20.06.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2173756**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **Derivados de macrolactona.**

30 Prioridad: **04.07.2007 EP 07290841**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.07.2011**

73 Titular/es: **SANOFI-AVENTIS**  
**174 avenue de France**  
**75013 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Hoffmann, Holger;**  
**Klemke-Jahn, Christine;**  
**Schummer, Dietmar y**  
**Kogler, Herbert**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 362 814 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

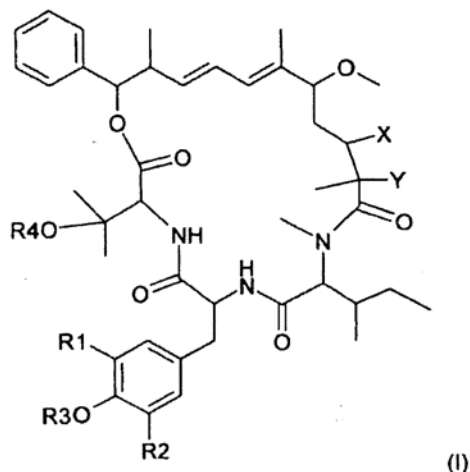
## DESCRIPCIÓN

Derivados de macrolactona

La presente invención se refiere a nuevas macrolactonas, a procedimientos para su fabricación y a su utilización. Se ha encontrado ahora que la cepa de microorganismos ST 201196 (DSM 18870) puede formar macrociclos de nuevo tipo, que presentan una actividad antifúngica fuerte contra el hongo *Candida albicans*. Por consiguiente, los compuestos son adecuados para el tratamiento de enfermedades de hongos locales y/o sistémicas.

Para el tratamiento de enfermedades infecciosas se emplea terapéuticamente un gran número de antiinfectivos. Pero los agentes patógenos son cada vez más resistentes a los medicamentos empleados, incluso amenaza un peligro grande a través de los llamados gérmenes multi-resistentes, que no sólo llevan resistencias contra grupos antiinfectivos individuales, sino que llevan al mismo tiempo varias resistencias. Incluso existen agentes patógenos, que han sido resistentes contra todos los antiinfectivos que se pueden adquirir en el mercado. No se pueden tratar ya terapéuticamente enfermedades infecciosas, que son causadas por tales gérmenes. Por lo tanto, existe una necesidad grande de agentes nuevos, que se puedan emplear contra gérmenes resistentes. En efecto, en la literatura se han descrito miles de antiinfectivos, la mayoría de los cuales, sin embargo, son demasiado tóxicos, para que puedan ser utilizados como medicamentos.

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



en la que

X e Y, independientes uno del otro, son OH, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, NH<sub>2</sub> o NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, o X e Y forman juntos un grupo -O-,

R1 y R2 son, independientes uno del otro, Cl o H,

R3 significa H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilen-NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, y

R4 significa H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo,

o una sal compatible fisiológicamente de un compuesto de la fórmula (I).

Con preferencia, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I), en la que X e Y forman juntos un grupo -O- por lo que X e Y forman en el compuesto preferido correspondiente junto con los átomos de C, a los que están ligados, un grupo epóxido.

Además, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I), en la que R1 y R2 son Cl.

Además, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I), en la que R1 es igual a Cl y R2 es igual a H.

R3 y R4 son con preferencia, independientes uno del otro, H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, de manera especialmente preferida ambos R3 y R4 son igual a H.

De manera especialmente preferida, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I), en la que X e Y forman juntos un grupo -O-, R1 y R2, independientes uno del otro, son Cl o H, y R3 y R4 significan, independientes uno del

otro, H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo,

además, a un compuesto de la fórmula (I), en la que X e Y forman juntos un grupo -O-, R1 y R2 son igual a Cl y R3 y R4, independientes uno del otro, significan H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo,

5 además, a un compuesto de la fórmula (I), en la que X e Y forman juntos un grupo -O-, R1 es igual a Cl, R2 es igual a H, y R3 y R4, independientes uno del otro, significan H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo,

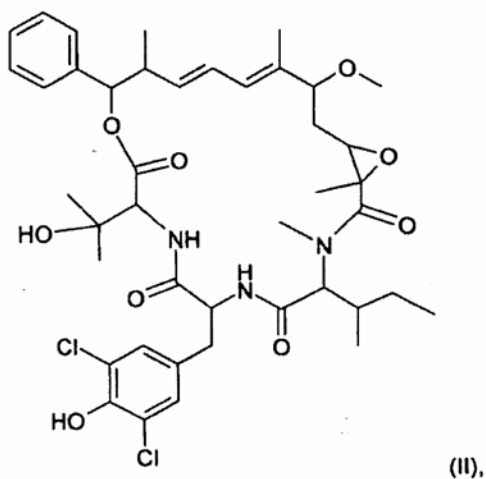
además, a un compuesto de la fórmula (I), en la que

X e Y forman juntos un grupo -O-,

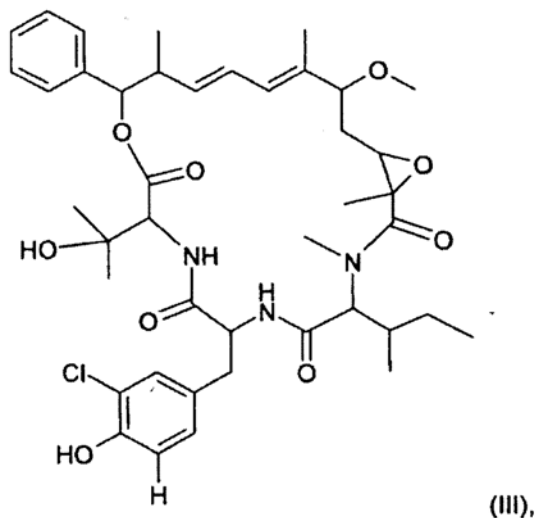
R3 y R4 son igual a H, y

en la que R1 y R2, independientes uno del otro, son igual a Cl o H.

10 con preferencia, en la que R1 y R2 son igual a Cl (designada a continuación también como compuesto de la fórmula (II)),



o en la que, además, con preferencia, R1 es igual a Cl R2 es igual a H (designada a continuación también como compuesto de la fórmula (III)),



15

o en la que con preferencia R1 y R2 son igual a H.

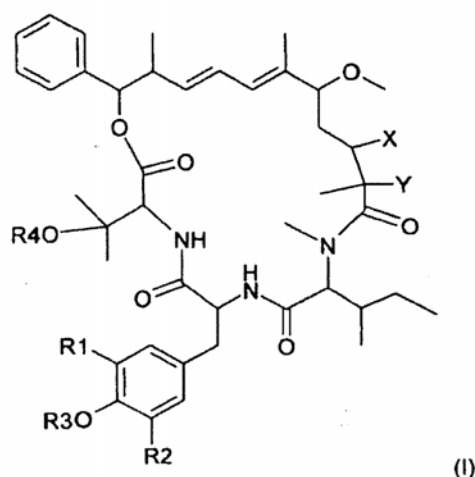
(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo significa un grupo alquilo lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, Tert-butilo, n-pentilo o n-hexilo.

Los centros de quiralidad en los compuestos de la fórmula (I) pueden estar presentes, si no se indica otra cosa, en la configuración R o en la configuración S. La invención se refiere tanto a los compuestos puramente ópticos como también a mezclas de estereoisómeros como mezclas de enantiómeros y mezclas de diastereómeros.

Por sales compatibles fisiológicamente de compuestos de la fórmula (I) se entiende tanto sus sales orgánicas como también inorgánicas, como se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (17<sup>a</sup> edición, página 1418 (1985)). En virtud de la estabilidad física y química y de la solubilidad, se prefieren, para grupos ácidos, entre otros, sales de sodio, de potasio, de calcio y de amonio; para grupos básicos se prefieren, entre otros, sales del ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o de ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos, como por ejemplo ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico y ácido p-toluolsulfónico.

La presente invención se refiere, además, a todos los equivalentes químicos evidentes de los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con la invención. Tales equivalentes son compuestos que, presentan una diferencia química insignificante, es decir, que tienen el mismo efecto o se transforman en condiciones suaves en los compuestos de acuerdo con la invención. A los equivalentes mencionados pertenecen, por ejemplo, también sales, productos de reducción, productos de oxidación, ésteres, éteres, acetales o amidas de los compuestos de la fórmula (I) así como equivalentes, que el técnico puede preparar con métodos estándar.

La invención se refiere, además, a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I)



20 en la que

X e Y, independientes uno del otro, son OH, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, NH<sub>2</sub> o NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, o X e Y forman juntos un grupo -O-,

R1 y R2 son, independientes uno del otro, Cl o H,

R3 significa H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilen-NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, y

25 R4 significa H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo,

o una sal compatible fisiológicamente de un compuesto de la fórmula (I)

caracterizado porque

1. la cepa ST 201196 (DSM 18870) o una de sus variantes y/o mutantes es fermentada, en condiciones adecuadas, en un medio de cultivo, que contiene una fuente de Cl, hasta que se acumulan uno o varios de los compuestos de la fórmula (I) en el medio de cultivo y
2. un compuesto de la fórmula (I) es aislado del medio de cultivo, y
3. dado el caso, se deriva el compuesto de la fórmula (I) y/o se transforma en una sal compatible fisiológicamente.

El medio de cultivo es una solución nutritiva o un medio sólido con al menos una fuente de carbono y de nitrógeno así como con las sales inorgánicas habituales.

Como fuente de Cl se puede utilizar, por ejemplo, NaCl o CaCl<sub>2</sub>. En este caso, la cepa ST 201196 (DSM 18870) produjo con preferencia compuestos de la fórmula (I), en los que los restos R1 y R2 son igual a Cl y en la que R es igual a Cl y R2 es igual a H. Con preferencia, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I), en la que R1 y R2 son igual a Cl. Además, la invención se refiere con preferencia a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I), en la que R1 es igual a H, R2 es igual a Cl.

Con preferencia, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I), en la que X e Y forman un grupo -O- y, además, R3 y R4 son como se ha descrito anteriormente o con preferencia H.

De manera especialmente preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (II). Además, de manera especialmente preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (III). Además, la invención se refiere de manera especialmente preferida a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I), en la que R1, R2, R3 y R4 son igual a H.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede emplear para la fermentación a escala de laboratorio (escala de mililitros a litros) y para la escala industrial (escala de metros cúbicos).

Como fuentes de carbono para la fermentación son adecuados hidratos de carbono asimilables y alcoholes de azúcar, como glucosa, lactosa, sacarosa o D-manitol así como productos naturales que contienen hidrato de carbono, como por ejemplo extracto de malta o extracto de levadura. Como sustancias nutritivas que contienen nitrógeno se contemplan: aminoácidos; péptidos y proteínas así como sus productos de desintegración, por ejemplo Probion F (Applied Microbiology and Biotechnology 1984, 19(1), 23-28). caseína, peptona o tristona; extractos de carne; extractos de levadura, gluten; semillas trituradas, por ejemplo de maíz, trigo, habas, soja o plantas de algodón; residuos de destilación de la producción de alcohol; harinas de carne; extractos de levadura; sales de amonio, nitratos. Con preferencia, la fuente de nitrógeno es uno o varios péptidos obtenidos sintéticamente o bien biosintéticamente. Sales inorgánicas son, por ejemplo, cloruros, carbonitos, sulfatos o fosfato de los metales alcalinos o alcalinotérreos, hierro, cinc, cobalto y manganeso. Elementos trazas son, por ejemplo, cobalto y manganeso.

Condiciones adecuadas para la formación de las sustancias de acuerdo con la invención son las siguientes; la formación de las sustancias de acuerdo con la invención se desarrolla con preferencia en un medio de cultivo, que contiene o bien de 0,05 % a 5 %, con preferencia de 0,1 % a 2,5 % de Provino F; de 0,02 a 1,0 %, con preferencia de 0,05 a 0,5 % de CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; de 0,02 % a 1,5 %, con preferencia de 0,05 % a 0,7 % de MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O así como de 0,00001 % a 0,001 % de cianocobalamina, 1,5 % de la resina adsorbente XAD-16, o de 0,05 a 5 %, con preferencia de 0,1 a 2,5 % de harina de levadura; de 0,2 a 5,0 %, con preferencia de 0,1 a 2 % de glicerina; de 0,02 % a 1,0 %, con preferencia de 0,05 a 0,5 % de CaCl<sub>2</sub>; de 0,02 % a 1,5 %, con preferencia de 0,05 % a 0,7 % de MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O así como de 0,00001 % a 0,001 % de cianocobalamina. Las indicaciones de porcentaje son en cada caso con relación al peso de toda la solución nutritiva.

El cultivo del microorganismo se realiza de forma aeróbica, por lo tanto, por ejemplo en cultivo submerso bajo vibración o agitación en matraz vibratorio o instalaciones de fermentación o en medio sólido, dado el caso con la introducción de aire u oxígeno. Se puede realizar en un intervalo de temperatura desde aproximadamente 18 hasta 35 °C, con preferencia aproximadamente desde 20 hasta 30 °C, en particular desde 27 hasta 30 °C. El intervalo de pH debería estar entre 4 y 10, con preferencia entre 6,5 y 9. Se incuba el microorganismo en estas condiciones, en general, durante un periodo de tiempo de 3 a 18 días, con preferencia desde 144 hasta 216 horas. De manera ventajosa, se cultiva en varias fases, es decir, que se establecen en primer lugar uno o varios pre-cultivos en un medio nutritivo líquido, que son vacunados entonces en el medio de producción propiamente dicho, el cultivo principal, por ejemplo en la relación de volumen 1:1 a 1:100. El pre-cultivo se obtiene, por ejemplo, vacunando la cepa en forma de células vegetativas o cuerpos de fruto en una solución nutritiva y dejándolo crecer desde aproximadamente 3 hasta 13 días, con preferencia desde 96 hasta 240 horas. Las células vegetativas y/o los cuerpos de fruto se pueden obtener, por ejemplo, dejando crecer la cepa aproximadamente durante 3 a 15 días, con preferencia durante 7 a 10 días, sobre un suelo nutritivo sólido o líquido, por ejemplo agar de levadura.

El aislamiento o bien la purificación de las sustancias de la fórmula (I) a partir del medio de cultivo se realiza de acuerdo con métodos conocidos teniendo en cuenta las propiedades químicas, físicas y biológicas de las sustancias nutritivas. Para el ensayo de la concentración de los derivados respectivos en el medio de cultivo o en las fases de aislamiento individuales se utiliza HPLC.

Para el aislamiento se centrifuga el caldo de cultivo y/o se filtra sobre un dispositivo de filtración. El Mycel con la XAD se liofiliza, a continuación se extraen las sustancias nutritivas desde el liofilizado con un disolvente orgánico, por ejemplo metanol o 2-propanol. La fase de disolvente orgánico contiene las sustancias nutritivas de acuerdo con la invención, dado el caso se concentra a vacío y se purifica adicionalmente.

- La purificación siguiente de uno o varios de los compuestos de acuerdo con la invención se realiza a través de cromatografía en materiales adecuados, por preferencia, por ejemplo, en tamices moleculares, en gel de sílice, óxido de aluminio, en intercambiadores de iones o en resinas adsorbentes o bien en fases de inversión (reversed phase, RP). Con la ayuda de esta cromatografía se separan los derivados de sustancia natural. La cromatografía de los compuestos de acuerdo con la invención se realiza con soluciones acuosas tamponadas o con mezclas de soluciones acuosas y orgánicas.
- Por mezclas de soluciones acuosas u orgánicas se entienden todos los disolventes orgánicos miscibles con agua, con preferencia metanol, 2-propanol y acetonitrilo, en una concentración de 0 a 100 % de disolvente o también todas las soluciones acuosas tamponadas que son miscibles con disolventes orgánicos. Los tampones a utilizar son los mismos que se han indicado anteriormente.
- La separación de los compuestos de acuerdo con la invención en virtud de sus diferente polaridad se realiza con la ayuda de Cromatografía de Fase Invertida, por ejemplo en MCI® /resina adsorbente, Mitsubishi, Japón) o Amberlite XAD® (TOSHAAS), o en otro material hidrófobo, como por ejemplo en fases RP-8 o EP-18.
- Además, la separación se puede realizar con la ayuda de la cromatografía de fases normales, por ejemplo en gel de sílice, óxido de aluminio.
- La cromatografía de los derivados de sustancia natural se realizó de acuerdo con métodos conocidos por el técnico, con preferencia con soluciones acuosas tamponadas, básicas o aciduladas o mezcla de soluciones acuosas con alcoholes y otros disolventes orgánicos miscibles con agua. Como disolvente orgánico se utiliza, con preferencia, acetonitrilo y/o metanol.
- Por soluciones acuosas tamponadas, básica so aciduladas se entiende, por ejemplo, agua, tampón de fosfato, acetato de amonio, formiato de amonio, tampón de citrato en una concentración de hasta 0,5 M así como ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoracético, amoniaco, trietilamina y todos los ácidos y bases conocidos por el técnico, de venta en el comercio, con preferencia en una concentración de hasta 1 %. En las soluciones acuosas tamponadas se prefiere especialmente 0,1 % de acetato de amonio.
- La cromatografía se realizó, por ejemplo, con un gradiente, que comenzó con 100 % de agua y terminó con 100 % de disolvente, con preferencia se realizó un gradiente lineal de 5 a 95 % de acetonitrilo.
- De manera alternativa, también se puede realizar una cromatografía en gel o la cromatografía en fases hidrófobas. La cromatografía en gel se realiza en geles de poliacrilamida o geles de copolímeros, como por ejemplo Biogel-P 2® (Biorad) o Fractogel TSK HW 40® (Merck, Alemania). La secuencia de las cromatografías mencionadas anteriormente es reversible.
- Si el compuesto de la fórmula (I) está presente como mezcla de estereoisómeros, se pueden separar los estereoisómeros a través de métodos conocidos, por ejemplo a través de separación por medio de una columna quiral.
- La derivación de los grupos OH en el aminoácido 3,5-dicloro-tirosina del compuesto de la fórmula (I) [R3 igual a H] en un grupo acilo [R3 igual a C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo]] y/o del grupo OH en el amino ácido 3-hidroxi-valina del compuesto de la fórmula (I) [R4 igual a H] en un grupo acilo [R4 igual a C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo]] se realiza de acuerdo con métodos conocidos en sí (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4ª edición, 1992), por ejemplo a través de reacción con un cloruro de ácido en presencia de una base o con un anhídrido de ácido.
- La alquilación del grupo OH en el aminoácido 3,5-dicloro-tirosina del compuesto de la fórmula (I) [R3 igual a H] con un grupo alquilo [R3 igual a (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo]] y/o del grupo-OH en el aminoácido 3-hidroxi-valina del compuesto de la fórmula (I) [R4 igual a H] con un grupo alquilo [R4 igual a (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo]] se realiza por medio de métodos conocidos en sí por el técnico (J. March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 4ª edición, 1992), por ejemplo a través de reacción con un bromuro de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo en presencia de una base o en el caso de una mutilación a través de reacción con yoduro de metilo o Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Una diferenciación selectiva entre el grupo-OH fenólico (R3 = H) y el grupo-OH alifático (R4 = H) se realiza por medio de métodos conocidos en sí por el técnico para la introducción de grupos de protección (T. W. Greene, P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 3ª edición, 1999). Por ejemplo, Pettus y col. (J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 6160 – 6168) describen una alquilación selectiva de un grupo-OH fenólico en presencia de un alcohol alifático terciario a través de reacción con bromuro de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en acetona o a través de reacción de (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo-OH en presencia de (CF<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O e hidrato de CuCl<sub>2</sub> en DBU. Otra posibilidad para la diferenciación entre el grupo OH fenólico y el grupo OH alifático se realiza por medio de métodos conocidos en sí por el técnico para la desprotección selectiva de un compuesto de la fórmula (I) bis-alquilado [R3 igual a 4 igual a (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo]] o bis-acilado [R3 igual a R4 igual a C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo]] (T. W. Greene, P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 3ª edición, 1999).
- Por ejemplo, Jones y col. (J. Org. Chem. 2001, 66, 3688-3695) describen la desprotección selectiva de un fenol

protegido con tert-butilisililo (TBS) en presencia de un alcohol terciario protegido con TBS a través de tert-butilamonio fluoruro (TBAF) a -20 °C. El grupo OH fenólico (R3 = H) se puede derivar, además, en un grupo -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilen-NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo a través de reacción con H<sub>2</sub>N-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo en presencia de Cl-[(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo]-Cl o Br-[(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo]-Br.

- 5 La derivación de compuestos de la fórmula (I), en la que X e Y forman un grupo -O-, hacia un compuesto de la fórmula (I), en la que X e Y son, independientes uno del otro, OH, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, NH<sub>2</sub> o NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, se realiza por medio de métodos conocidos en sí por el técnico (J. March, *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, 4ª edición, 1992), por ejemplo a través de reacción del grupo epóxido con un (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alcoholato [X igual a OH cuando Y es igual a O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, o E igual a OH cuando X es igual a O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, NH<sub>3</sub> [X igual a OH cuando Y es igual a NH<sub>2</sub>, o Y igual a OH cuando X es igual a NH<sub>2</sub>], o H<sub>2</sub>N-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo [X igual a OH cuando Y es igual a NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, o Y igual a OH cuando X es igual a NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo].

10 Un aislado de la cepa de microorganismos ST 201196 fue depositada en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Alemania, de acuerdo con las Reglas del Contrato de Budapest el 11.09.2003 bajo el número siguiente: Como número de depósito fue asignado el siguiente número: DSM 18870.

15 Las células vegetativas de la cepa ST 201196 (DSM 18870) tienen una forma de bastoncillo característica. Sobre suelos nutritivos sólidos, ST 201196 (DSM 18870) forma cuerpos de frutos amarillo-naranja, que contienen myxoesporas redondas. La taxonomía de la cepa ST 201196 se puede describir, por lo tanto, como Myxobacteria sp.

20 En lugar de la cepa ST 201196 (DSM 18870) se pueden emplear también sus mutantes y/o variantes, que sintetizan uno o varios de los compuestos de acuerdo con la invención.

Un mutante es un microorganismo, en el que uno varios genes del genoma han sido modificados, permaneciendo funcional(es) y transmisible(s) el gen o los genes, que son responsables de la capacidad del organismo para producir el compuesto de acuerdo con la invención.

25 Tales mutantes se pueden generar de manera conocida en sí a través de medios físicos, por ejemplo radiación, como con rayos ultravioleta o rayos X, o a través de una mutágenos químicos, como por ejemplo etilmetansulfonato (EMS); 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona (MOB) o N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), o como se describe por Brock y col. en "Biology of Microorganisms", Prentice Hall, páginas 238-247 (1984).

30 Una variante es un fenotipo del microorganismo. Los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a su entorno y, por lo tanto, muestran una flexibilidad fisiológica característica. En el caso de la adaptación fenotípica, todas las células del microorganismo están implicadas, no estando condicionado genéticamente el tipo de la modificación, y es reversible en condiciones modificadas (H. Stolp, *Microbial ecology: organismus, habitats, activities*. Cambridge University Press, Cambridge, GB, página 180, 1988).

La clasificación en mutantes y/o variantes, que sintetizan uno o varios de los compuestos de acuerdo con la invención, se realiza de acuerdo con el esquema siguiente:

- 35
- liofilización del medio de fermentación;
  - extracción del liofilizado con un disolvente orgánico;
  - extracción del compuesto a partir del filtrado de cultivo con fases sólidas;
  - analítica por medio de HPLC, DC o a través de ensayo de la actividad biológica.

40 Las condiciones de fermentación descritas se aplican para ST 201196 (SN 18870) así como para mutantes y/o variantes del mismo.

Para la verificación de la actividad antifúngica de agentes patógenos aeróbicos, que cambian rápidamente, se utiliza el método de dilución de Bouillon (microdilución) de acuerdo con una Especificación del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, M7-A7, (Vol. 26, Nº 2). Se determinó el valor IC<sub>50</sub>. Ésta es una concentración de una sustancia activa, que es necesaria para inhibir el crecimiento del organismo de ensayo *Candida albicans* en un 50%.

45 El compuesto de la fórmula (II) tiene contra *Candida Albicans* un valor IC<sub>50</sub> de 0,06 µg/ml. El compuesto de la fórmula (IV) tiene contra *Candida Albicans* un valor IC<sub>50</sub> de 0,41 µg/ml.

Además, objeto de la invención es la utilización del compuesto de la fórmula (I) o de una sal compatible fisiológicamente del mismo como medicamento en la medicina humana y animal, en particular para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades de hongos. Con preferencia, la invención se refiere a la utilización de un compuesto de la fórmula (I) o de una sal compatible fisiológicamente para el tratamiento de enfermedades de hongos locales y/o sistémicas.

Por lo demás, la presente invención se refiere a un medicamento con un contenido de al menos un compuesto de la fórmula (I), en el que el compuesto o los compuestos de la fórmula (I) se pueden administrar como tales en sustancia o con preferencia en mezcla con uno o varios vehículos o sustancias auxiliares habituales adecuadas desde el punto de vista farmacológico.

- 5 Los compuestos de acuerdo con la invención son estables en estado sólido o en soluciones en el intervalo de pH entre 2 y 9, en particular 5 y 7 y, por lo tanto, se pueden incorporar en preparaciones galénicas habituales.

Los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden administrar por vía oral o parenteral, pero, en principio, también es posible una aplicación rectal. Las formas de preparación galénicas sólidas o líquidas adecuadas son, por ejemplo, granulados, polvo, comprimidos, grageas, (micro)-cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, aerosoles, gotas o soluciones inyectables en forma de ampollas así como preparados con liberación retardada de la sustancia activa, en cuya preparación encuentran aplicación vehículos o sustancias auxiliares habituales adecuados desde el punto de vista farmacológico, como agentes explosivos, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de hinchamiento, agentes deslizantes y lubricantes, sustancias aromatizantes, agentes edulcorantes o disolventes, por ejemplo carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, lactoalbúmina, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales o vegetales, polietilenglicoles y disolventes, como por ejemplo agua estéril, alcoholes, glicerina y alcoholes polivalentes.

Dado el caso, las unidades de dosificación para la administración oral se pueden microencapsular, para retardar la cesión o dilatarla durante un periodo de tiempo prolongado, como por ejemplo a través de revestimiento o incrustación de la sustancia activa en forma de partículas en polímeros adecuados, ceras.

- 20 Con preferencia, los preparados farmacéuticos se preparan y administran en unidades de dosificación, conteniendo cada unidad como componente activo una dosis determinada de uno o varios compuestos de los derivados de sustancia natural de acuerdo con la invención. En el caso de unidades de dosificación sólidas como comprimidos, cápsulas y supositorios, esta dosis puede alcanzar hasta aproximadamente 500 mg, pero con preferencia desde aproximadamente 0,1 hasta 200 mg, y en las soluciones de inyección en forma de ampollas hasta aproximadamente 200 mg, pero con preferencia desde aproximadamente 0,5 hasta 100 mg al día.

La dosis diaria a administrar depende del peso corporal, la edad, el sexo y el estado del mamífero. No obstante, en determinadas circunstancias se pueden aplicar también dosis diarias más elevadas o más bajas. La administración de la dosis diaria se puede realizar tanto a través de una sola toma en forma de una unidad de dosificación individual o, en cambio, en varias unidades de dosificación más pequeñas como también a través de administración múltiple de dosis divididas a intervalos determinados.

Los medicamentos de acuerdo con la invención se preparan mezclando uno o varios compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con la invención opcionalmente con uno o varios de los vehículos o sustancias auxiliares habituales así como llevándolos a una forma de administración adecuada.

Los siguientes ejemplos deben servir para la explicación más detallada de la invención.

- 35 Las indicaciones porcentuales se refieren al peso. Las relaciones de mezcla en líquidos se refieren al volumen, si no se indica otra cosa.

**Ejemplo 1:** Almacenamiento a -135°C de ST 201196 (DSM 18870)

Una placa de Agar (1 % levadura de Bäcker fresca, 1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,477 % HEPES (20 mM); 0,00005 % cianocobalamina; 1,8 % Agar; pH 7,2) fue vacunada con la cepa ST 201196 (DSM 18870) y fue incubada en el transcurso de 7 a 10 días a 30 °C. Las células de este cultivo superficial fueron rascadas con una espátula estéril desde la superficie de Agar, suspendidas en 1 mL de medio de casitona (1 % Casitone (Disco); 0,15 %  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,0) en criotubitos y almacenadas a -135 °C

**Ejemplo 2:** Almacenamiento a -196°C de ST 201196 (DSM 18870)

Una placa de Agar (levadura de Bäcker fresca al 1 %, 1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,477 % HEPES (20 mM); 0,00005 % cianocobalamina; 1,8 % Agar; pH 7,2) fue vacunada con la cepa ST 201196 (DSM 18870) y fue incubada en el transcurso de 7 a 10 días a 30 °C. Las células de este cultivo superficial fueron rascadas con una espátula estéril desde la superficie de Agar, suspendidas en 1 mL de medio de casitona (1 % Casitone (Disco); 0,15 %  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,0) en criotubitos y almacenadas a -196 °C

**Ejemplo 3:** Preparación de un pre-cultivo en el matraz de Erlenmeyer de ST 201196 (DSM 18870)

- 50 100 mL de solución nutritiva (1 % levadura de Bäcker fresca, 1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,477 % HEPES (20 mM); 0,00005 % cianocobalamina; 1,8 % Agar; pH 7,2) en un matraz de Erlenmeyer estéril de 200 mL fueron vacunados con la cepa ST 201196 (DSM 18870) y fueron incubados en el transcurso de 7 días a 30 °C y a 180 rpm sobre una máquina vibratoria giratoria. Respectivamente, 10 mL (10 %) de este pre-cultivo fueron utilizados a continuación



para la preparación de los cultivos principales.

**Ejemplo 4:** Preparación de un cultivo principal líquido ST 201196 (DSM 18870) con Medium 1.

5 Un matraz de Erlenmeyer estéril de 300 mL con 100 mL de la siguiente solución nutritiva (1 % Procion F; 0,1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 %  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ); 0,00005 % cianocobalamina; 2 % de la resina adsorbente XAD-16, pH 8,4) fue vacunada con 10 mL (10 %) de un pre-cultivo (ver ejemplo 3) o con cultivo crecido sobre una placa de Agar fresca (1 % una levadura de Bäcker fresca; 1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,477 % HEPES (20 mM); 0,00005 % cianocobalamina; 1,8 % Agar; pH 7,2) y fue incubada en una máquina vibratoria a 180 rpm y a 30 °C. La producción máxima de las sustancias según la invención al alcanzó al cabo de 144 a 216 horas. Para la vacunación de instalaciones de fermentación de 10 a 200 L fue suficiente un cultivo Submers de 144-196 horas de antigüedad (Inokulum 10 %) a partir de la misma solución nutritiva que se describe en el ejemplo 3.

**Ejemplo 5:** Preparación de un cultivo principal líquido ST 201196 (DSM 18870) con Medium 2

15 Un matraz de Erlenmeyer estéril de 300 mL con 100 mL de la siguiente solución nutritiva (1 % de harina de avena; 0,5 % de glicerina; 0,1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 %  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ); 0,00005 % cianocobalamina; 2 % de la resina adsorbente XAD-16, pH 9,0) fue vacunada con 10 mL (10 %) de un pre-cultivo (ver ejemplo 3) o con cultivo crecido sobre una placa de Agar fresca (1 % una levadura de Bäcker fresca; 1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,477 % HEPES (20 mM); 0,00005 % cianocobalamina; 1,8 % Agar; pH 7,2) y fue incubada en una máquina vibratoria a 180 rpm y a 30 °C. La producción máxima de las sustancias según la invención al alcanzó al cabo de 144 a 216 horas. Para la vacunación de instalaciones de fermentación de 10 a 200 L fue suficiente un cultivo Submers de 144-196 horas de antigüedad (Inokulum 10 %) a partir de la misma solución nutritiva que se describe en el ejemplo 3.

20 **Ejemplo 6:** Preparación de las sustancias según la invención en la instalación de fermentación

Las instalaciones de fermentación de 1 L y 50 L fueron accionadas en las siguientes condiciones:

Inóculo:	20 %
Medio nutritivo:	1 % de harina de avena; 0,5 % glicerina, 0,1 % extracto de levadura; 0,1 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,00005 % cianocobalamina, 2 % de la resina adsorbente XAD-16
Temperatura de incubación:	30 °C
Velocidad del agitador:	200 rpm
Ventilación:	0,6 m <sup>3</sup> /h
Regulación de pH:	Ninguna, antes de la esterilización pH 7,6 ± 0,3 por medio de KOH
30 Regulación de pO <sub>2</sub> :	Ninguna
Adición de anti-espuma:	0,05 % Desmophen (Bayer)
Tiempo de ejecución:	155 h

La regulación de pH se realizó con 10 % KOH bien 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

35 **Ejemplo 7:** Aislamiento de los compuestos (II) y (III) a partir de los cultivos vibratorios de la cepa de microorganismos ST201196 (DSM 18870).

40 Al término de la fermentación de la cepa de microorganismos ST201196 (DSM 18870) se filtró el caldo de cultivo del ejemplo 4 (60 L de caldo de cultivo). La biomasa con la XAD fue liofilizada y a continuación fue extraída con metanol (4 x 5 L). El extracto de metanol fue reducido en vacío a 8 L y a continuación fue aplicado sobre una columna preparada, que estaba llena con aproximadamente 3,0 litros de material CHP-20P (gel MCI®, 75 - 150µ, Mitsubishi Chemical Corporation). Fue eluido con un gradiente de metanol de 10 % a 95 %. El caudal de la columna (120 ml/min) fue recogido en fracciones (1 L fracciones). Las fracciones 11 a 14 fueron reunidas, el disolvente en el Rotavapor fue eliminado y a continuación el conjunto de fracciones fue liofilizado (rendimiento ◇ 0,9 g).

**Ejemplo 8:** Separación previa de los compuestos (II) y (III) a través de cromatografía RP-18

45 El conjunto de fracciones 11 – 14 del ejemplo 7 fue disuelto en 100 ml de metanol y fue aplicado sobre una columna Phenomenex Luna® 10µ C18 (2) (dimensión: 250 mm x 50 mm) con columna previa Luna® 10µ C18 (2) (dimensión: 60 mm x 21,2 mm) y fue aplicado con un gradiente de 5 % a 95 % de acetonitrilo en agua en el transcurso de 40 min. (0,1 % acetato de amonio, pH 4,6 ajustado con ácido acético). El caudal era 190 ml/min., el tamaño de la fracción

era 190 ml. Las fracciones 28 -29 y 31 fueron procesadas a continuación.

**Ejemplo 9:** Purificación del compuesto (II)

5 La fracción 31 del ejemplo 8 fue liofilizada en primer lugar (rendimiento  $\diamond$  98 mg), a continuación fue disuelta en 50 ml de metanol y de nuevo fue purificada por medio de HPLC en una columna Phenomenex Luna® Axia 5 $\mu$  C18 (2) (dimensión: 100 mm x 30 mm) con columna previa XTerra® Prep MS C18 10 $\mu$ m (Waters, dimensión: 19 x 10 mm). Fue eluida con un gradiente de 5 % a 95 % de acetonitrilo en agua en el transcurso de 40 min. (con adición de 0,1 % acetato de amonio, pH 4,6 ajustado con ácido acético). El caudal de la columna (50 ml/min) fue recogido en fracciones después de UV. Las fracciones 4 a 14 contenían el compuesto de la fórmula (II) y después de la liofilización resultaron 38 mg (pureza > 95 %).

10 **Ejemplo 10:** Caracterización del compuesto de la fórmula (II)

Sustancia sólida incolora, cristales de acetonitrilo / agua

UV: 208, 232, 286 nm

ESI-MS: MW = 815.3312

Fórmula de suma: C<sub>42</sub>H<sub>55</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>g</sub>

15 Valor de giro (MeOH): -0,19°,  $\alpha_D = -38^\circ$

Tabla 1: Desplazamientos químicos – RMN de la macrolactona (II); c = 3 mg/ml en d<sub>6</sub>-DMSO a 300 K.

Posición	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$
1	126.87	7.251
2 (2C)	127.71	7.322
3	125.890	7.566
4	139,90	-
5	78.78	5.898
6	41.82	2.635
6-Me	9.50	0.961
7	138.29	6.175
8	124.58	6.379
9	128.83	6.116
10	133.27	-
10-Me	10.62	1.696
11	83.90	3.619
11-OMe	55.08	3.094
12		2.115
	30.50	1.456
13	57.97	2.633
14	61.26	-
14-Me	14.81	1.427
15	169.23	-

16 N-Me	29.59	2.979
17 $\alpha$	59.11	4.474
$\beta$	30.94	1.704
$\beta$ -Me	14.14	0.348 d
$\gamma$	24.15	1.218 0.863
$\delta$	9.99	0.770 t
18 CO	168.59	-
19 NH		8.014
20 $\alpha$	52.67	4.686
$\beta$	37.02	2.806 2.483
$\gamma$	(136.8)	-
$\delta$	129.55	7.345
$\epsilon$	121.50	-
$\varphi$	147.65	-
$\varphi$ -OH		9.88 br
21 CO	170.43	-
22 NH		8.596
23 $\alpha$	59.11	4.677
$\beta$	71.84	-
$\beta$ -OH		5.110
$\gamma$	24.36	1.037
$\gamma'$	28.145	1.142
24 CO	170.55	-

**Ejemplo 11:** Purificación del compuesto (III)

5 La fracción 28-29 (380 ml) del ejemplo 8 fue purificada de nuevo por medio de HPLC en una columna Waters XTerra® 10  $\mu$ m C18 (dimensión: 100 mm x 30 mm) con pre-columna XTerra® Prep MS C18 10  $\mu$ m (Waters, dimensión: 19 x 10 mm): Fue eluida con un gradiente de 10 % a 95 % de acetonitrilo en agua en el transcurso de 40 minutos (con adición del 10 % de ácido fórmico, pH = 2.0). El caudal de la columna (70 ml/min) fue recodito en fracciones después de UV. La fracción 45 a 47 contenía el compuesto de la fórmula (II) y resultaron después de la liofilización ~ 5,4 mg (pureza > 50 %).

**Ejemplo 12:** Caracterización del compuesto (III)

Sustancia sólida incolora

10 UV: 204, 232, 286 nm

ESI-MS: MW = 799.3002

Fórmula de suma:  $C_{42}H_{56}ClN_3Og$

Tabla 2: Desplazamientos químicos – RMN de la macrolactona (III); c = 5 mg/ml en  $d_6$ -DMSO a 300 K.

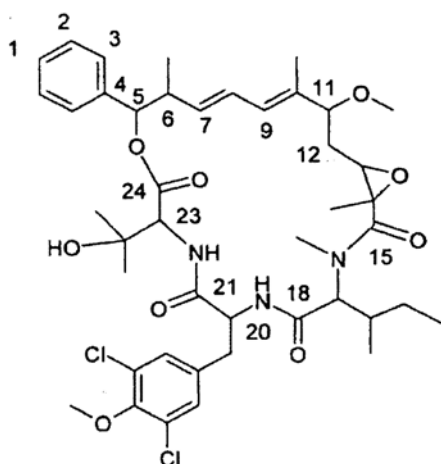
Posición	$\delta(^{13}C)$	$\delta(^1H)$
1	126.88	7.252
2 (2C)	127,71	7.331
3	125.93	7.566
4	139,91	-
5	78.76	5.896
6	41.84	2.659 br.
6-Me	9.59	0.958
7	138.25	6.171
8	124.64	6.375
9	128.79	6.114
10	133.29	-
10-Me	10.68	1.692
11	83.86	3.620
11-OMe	55.09	3.090
12		2.113
	30.52	1.470
13	57.98	2.642
14	61.23	-
14-Me	14.81	1.431
15	169.27	-
16 N-Me	29.63	2.981
17 $\alpha$	59.08	4.471
$\beta$	31.04	1.693
$\beta$ -Me	14.80	0.315 d
$\gamma$	24.16	1.221
		0.862
$\delta$	9.99	0.7731
18 CO	168.57	-
19 NH		7.995
20 $\alpha$	52.68	4.716

$\beta$		2.824
	37.26	2.488
$\gamma$	129.25	-
$\delta$	129.12	7.069
$\delta'$	130.67	7.335
$\varepsilon$	115.83	6.767
$\varepsilon'$	118.85	-
$\varphi$	151.40	-
$\varphi$ -OH		n.d.
21 CO	170.73	-
22 NH		8.636
23 $\alpha$	59.20	4.674
$\beta$	71.85	-
$\beta$ -OH		n.d.
$\gamma$	24.41	1.035
$\gamma'$	28.15	1.142
24 CO	170.54	-

## Ejemplo 13: Síntesis del compuesto (IV)

El compuesto (II) (80 mg, 0.098 mmol) fue disuelto en 5 ml de acetonitrilo y fue mezclado a temperatura ambiente con carbonato potásico (27 mg, 0.196 mmol) y yoduro de metilo (70 mg, 0.490 mmol). La mezcla fue agitada a continuación en el transcurso de 12 horas a 50 °C. La solución fue filtrada y fue purificada por medio de HPLC en una columna Phenomenex Luna® Axia 5  $\mu$ m C18 (2) (dimensión: 100 mm x 30 mm) con precolumna XTerra® Prep MS C10 10  $\mu$ m (Waters, dimensión: 19 x 10 mm). Fue eluido con un gradiente de 5 % a 95 % de acetonitrilo en agua en el transcurso de 40 minutos (con adición de 0,1 % de acetato de amonio, pH 4,6, ajustado con ácido acético). El caudal de la columna (50 ml/min) fue recogido en fracciones después de UV. La fracción 4 y 5 contenía el compuesto deseado de la fórmula (IV) y resultaron después de liofilización 50 mg (rendimiento: 61 %, pureza > 95 %).

## Ejemplo 14. Caracterización de compuesto de la fórmula (IV)



Sustancia sólida incolora, cristales de acetónitrilo / agua

UV: 235, 286 nm

MW = 830.85

5 Fórmula de suma:  $C_{43}H_{57}Cl_2N_3O_8$

Tabla 3: Desplazamientos químicos – RMN del compuesto de la fórmula (IV); c = 3 mg/ml en  $d_6$ -DMSO a 300 K.

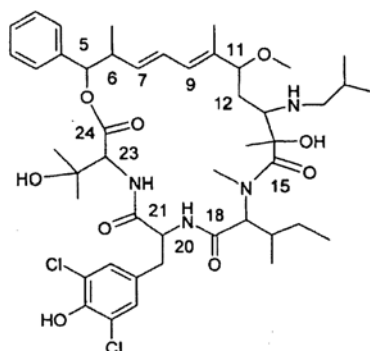
Posición	$\delta(^{13}C)$	$\delta(^1H)$
1	126.88	7.267
2 (2C)	127.72	7.332
3 (2C)	125.88	7.568
4	139.87	-
5	78.78	5.903
6	41.81	2.650
6-Me	9.593	0.060
7	138.23	6.192
8	124.60	6.385
9	128.78	6.124
10	133.27	-
10-Me	10.65	1.700
11	83.88	3.624
11-OMe	55.08	3.103
12	30.46	2.130
13	57.94	2.638
14	61.26	-

14-Me	14.82	1.437
15	169.23	-
16 N-Me	29.55	2.984
17 $\alpha$	59.04	4.471
$\beta$	30.87	1.715
$\beta$ -Me	14.20	0.284
$\gamma$		1.216
	24.10	0.884
$\delta$	9,95	0.775
18 CO	168,53	-
19 NH		8.103
20 $\alpha$	52.37	4.771
$\beta$		2.889
	37.19	2.569
$\gamma$	136.23	-
$\delta$	130.29	7.511
$\varepsilon$	127.33	-
$\varphi$	149.79	-
$\varphi$ -OMe	60.29	3.742
21 CO	170.19	-
22 NH		8.620
23 $\alpha$	59.13	4.691
$\beta$	71.80	-
$\beta$ -OH		5.161
$\gamma$	24.38	1.047
$\gamma'$	28.12	1.153
24 CO	170.55	-

**Ejemplo 15:** Síntesis de los compuestos (V) y (VI)

El compuesto (II) (30 mg, 0.037 mmol) fue disuelto en 10ml de 1,2-dicloroetano y se mezcló a temperatura ambiente con isobutilamina (500  $\mu$ m, 5.03 mmol). La mezcla fue agitada en el transcurso de 48 horas a 70 °C, a continuación fue filtrada y fue purificada por medio de HPLC en una columna Phenomenex Luna® Axia 5  $\mu$ m C18 (2) (dimensión: 100 mm x 30 mm) con precolumna XTerra® Prep MS C10 10  $\mu$ m (Waters, dimensión: 19 x 10 mm). Fue eluido con un gradiente de 5 % a 95 % de acetonitrilo en agua en el transcurso de 40 minutos (con adición de 0,1 % de acetato de amonio, pH 4,6, ajustado con ácido acético). El caudal de la columna (50 ml/min) fue recogido en fracciones después de UV. La fracción 70 contenía los dos compuestos de las fórmulas (V) y (VI) y resultaron después de la liofilización 3 mg de los dos compuestos en la relación 55:45.

10 **Ejemplo 16:** Caracterización del compuesto de la fórmula (V)



MW = 889.97

Fórmula se suma: C<sub>46</sub>H<sub>66</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>Og

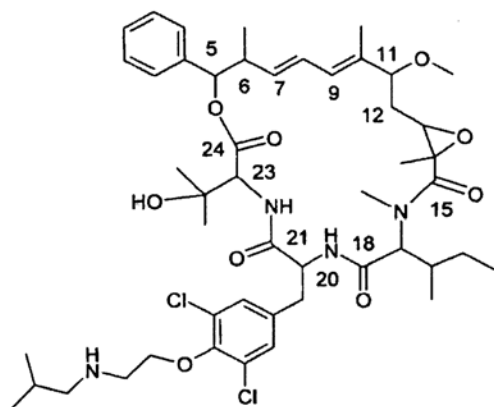
5 Tabla 4: Desplazamientos químicos – RMN del compuesto de la fórmula (V); c = 3 mg/ml en d<sub>6</sub>-DMSO a 300 K.

Posición	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$
1	126.94	7.244
2 (2C)	127.86	7.340
3 (2C)	125.82	7.507
4	139,29	-
5	78.48	5.768
6	41.63	2.679
6-Me	12.06	0.880
7	134.90	5.776
8	126.58	6.483
9	124.04	5.901
10	137.71	-
10-Me	13.72	1.690
11	82.17	3.679
11-OMe	55.06	3.083
12		1.379
	37.38	1.265
13	61-04	2.927
13-NH		n.d.
13-iBu-1		2.435
	58.81	2.460
13-iBu-2	28.98	1.624



13-iBu-3	20.66	0.903
13-iBu-3	20.66	0.896
14	61.28	-
14-Me		n.d.
15	174.64	-
16	-	-
16 N-Me	28.98	3.190
17 $\alpha$	59.71	4.750
$\beta$	32.15	1.678
$\beta$ -Me	14.15	0.208
$\gamma$		0.814
	23.70	1.207
$\delta$	10.17	0.724
18 CO	168.46	-
19 NH		8.242
20 $\alpha$	52.74	4.927
$\beta$		2.646
	37.96	2.843
$\gamma$	122.4	-
$\delta$	129.59	7.358
$\epsilon$	121.57	-
$\varphi$	147.54	-
$\varphi$ -OH		n.d.br
21 CO	170.72	-
22 NH		8.451
23 $\alpha$	59.99	4.598
$\beta$	71.16	-
$\beta$ -OH		5.120
$\gamma$	25.13	1.092
$\gamma'$	28.09	1.191
24 CO	170.72	-

Ejemplo 17: Caracterización del compuesto de la fórmula (VI)



MW = 916.00

Fórmula se suma:  $C_{48}H_{68}Cl_2N_4Og$

Tabla 5: Desplazamientos químicos – RMN del compuesto de la fórmula (VI); c = 3 mg/ml en  $d_6$ -DMSO a 300 K.

Posición	$\delta(^{13}C)$	$\delta(^1H)$
1	127.00	7.267
2 (2C)	127.72	7.330
3 (2C)	125.89	7.564
4	139.88	-
5	78.79	5.900
6	41.82	2.660
6-Me	9.53	0.968
7	138.35	6.186
8	124.61	6.383
9	128.82	6.123
10	133.28	-
10-Me	10.67	1.700
11	83.89	3.626
11-OMe	54.09	3.097
12	30.47	2.125 1.463
13	57.95	2.631
14	61.27	-
14-Me	14.83	1.436
15	169.25	-
16	-	-
16 N-Me	29.36	4.467

17 $\alpha$	59.06	4.467
$\beta$	30.89	1.701
$\beta$ -Me	14.26	0.274
$\gamma$	24.13	0.864 1.217
$\delta$	9.97	0.773
18 CO	168,55	-
19 NH		8.104
20 $\alpha$	52.37	4.758
$\beta$	37.10	2.555 2.887
$\gamma$	136.04	-
$\delta$	13.32	7.506
$\epsilon$	127.34	-
$\varphi$	148.96	-
$\varphi$ -1	72.94	3.952
$\varphi$ -2	48.79	2.864
NH		n.d.br
13-iBu-1	57.13	2.379
13-iBu-2	27.94	1.662
13-iBu-3	20.52	0.872
13-iBu-3	20.52	0.852
21 CO	170.21	-
22 NH		8.612
23 $\alpha$	59.14	4.680
$\beta$	71.81	-
$\beta$ -OH		5.161
$\gamma$	24.38	1.042
$\gamma'$	28.13	1.149
24 CO	170.56	-

Ejemplo 18: Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans*

Se preparó una solución de la cepa de 1000  $\mu\text{m}/\text{ml}$  de sustancia activa (por ejemplo del compuesto de la fórmula (II) y del compuesto de la fórmula (IV) en metanol. La cepa de ensayo (*Candida albicans* FH 2173) fue almacenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El inóculo fue preparado a partir de un pre-cultivo líquido fresco. El pre-cultivo fue preparado a parte de una bolita del material almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 30 ml de medio nutritivo (Sabourad-Dextrose Broth, Difco) y fue incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 180 rpm en el transcurso de 24 horas. El inóculo se ajustó de tal manera que después de la inoculación del

recipiente de ensayo, se alcanzó el número necesario de unidades que forman colonias. A tal fin se ajustó el inóculo por medio de un fotómetro a una longitud de onda de 590 nm a un valor de  $10^7$  CFU/ml (CFU: unidades que forman colonia). Después del ajuste del inóculo se diluyó la suspensión con solución nutritiva (Mueller Hinton Broth, Difco) 1:100. En el transcurso de 15 minutos después de la preparación del inóculo se vacunó la placa de microtitulación.

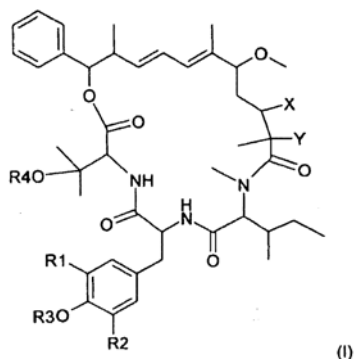
5 El número exacto de colonias se determinó por medio de cultivo superficial. Con la solución de la cepa de la sustancia activa y el medio nutritivo (Mueller Hinton Broth, Difco) se creó en primer lugar sobre la placa de microtitulación una serie de dilución. La sustancia activa estaba presente en un volumen de 20  $\mu$ l y se mezcló con 20  $\mu$ l de inóculo, de manera que se obtuvo un volumen de ensayo total de 40  $\mu$ l. Las placas de microtitulación vacunadas fueron cerradas a continuación con una tapa y fueron incubadas a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de

10 humedad del aire en el transcurso de 20 horas. Para cada ensayo se ensayó al mismo tiempo sobre una placa de 384 microtitulaciones un control libre de sustancia activa, un control estéril y como sustancias de referencia Ciprofloxacina y Nystatin. La lectura de las placas de microtitulación se realizó con la ayuda de un fotómetro a una longitud de onda de 590 nm a través de medición de la absorción. Los valores IC<sub>50</sub> como concentración de la sustancia activa, que es necesaria para inhibir el crecimiento del organismo de ensayo *Candida albicans* en un 50

15 %, se calcularon a continuación de acuerdo con un procedimiento estándar a partir de los valores de la serie de dilución.

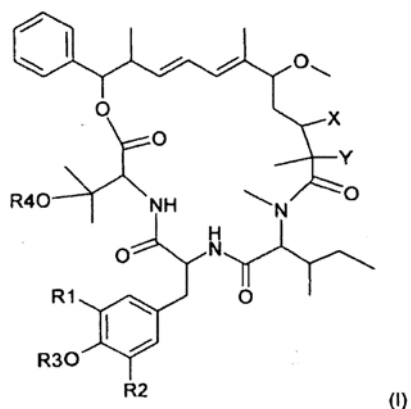
## REIVINDICACIONES

1.- Compuesto de la fórmula (I)



en la que

- 5 X e Y, independientes uno del otro, son OH, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, NH<sub>2</sub> o NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, o X e Y forman juntos un grupo -O-,
- R1 y R2 son, independientes uno del otro, Cl o H,
- R3 significa H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquileno-NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, y
- R4 significa H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo,
- 10 o una sal compatible fisiológicamente de un compuesto de la fórmula (I).
- 2.- Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en la que X e Y juntos forman un grupo -O-.
- 3.- Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, en la que R3 y R4 son, independientes uno del otro, H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo.
- 15 4.- Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que X e Y forman juntos un grupo -O-, R1 y R2 son, independientes uno del otro, Cl o H, y R3 y R4 son, independientes uno del otro, H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo.
- 5.- Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que R1 y R2 son igual a Cl.
- 6.- Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que R1 y R2 son igual a Cl y R2 es igual a H.
- 20 7.- Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que R3 y R4 son igual a H.
- 8.- Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, en la que R1, R2, R3 y R4 son igual a H.
- 9.- Utilización de un compuesto de la fórmula (I) o de una sal compatible fisiológicamente del mismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de un medicamento.
- 25 10.- Utilización de un compuesto de la fórmula (I) o de una sal compatible fisiológicamente del mismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades de hongos.
- 11.- Medicamento con un contenido de al menos un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 12.- Procedimiento para la fabricación de un compuesto de la fórmula (I),



en la que

X e Y, independientes uno del otro, son OH, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, NH<sub>2</sub> o NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, o X e Y forman juntos un grupo -O-,

5 R1 y R2 son, independientes uno del otro, Cl o H,

R3 significa H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilen-NH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo, y

R4 significa H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo,

o una sal compatible fisiológicamente de un compuesto de la fórmula (I)

caracterizado porque

- 10
1. la cepa ST 201196 (DSM 18870) o una de sus variantes y/o mutantes es fermentada, en condiciones adecuadas, en un medio de cultivo, que contiene una fuente de Cl, hasta que se acumulan uno o varios de los compuestos de la fórmula (I) en el medio de cultivo y
  2. un compuesto de la fórmula (I) es aislado del medio de cultivo, y
  3. dado el caso, se deriva el compuesto de la fórmula (I) y/o se transforma en una sal compatible fisiológicamente.
- 15

13.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que en el compuesto de la fórmula (I), X e Y forman juntos un grupo -O-, R1 y R2, independientes uno del otro, Cl o H, y R3 y R4, independientes uno del otro, son H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo.

14.- Cepa de microorganismos ST 201196 (DSM 18870).