

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 190**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/64** (2006.01)  
**C12N 1/14** (2006.01)  
**A61K 36/06** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C12R 1/645** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009 E 09721080 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2261317**

54 Título: **Microorganismo productor de un compuesto cíclico**

30 Prioridad:

**14.03.2008 JP 2008065201**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.06.2013**

73 Titular/es:

**ASTELLAS PHARMA INC. (33.3%)**  
**3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome Chuo-ku**  
**Tokyo 103-8411, JP;**  
**SIRIM BERHAD (33.3%) y**  
**TROPBIO RESEARCH SDN. BHD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, IKUKO;**  
**YOSHIKAWA, KOJI;**  
**MASAKI, TERUHISA;**  
**KANASAKI, RYUICHI y**  
**SHAHAB, NEELAM**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 408 190 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

Microorganismo productor de un compuesto cíclico

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con el hongo *Acremonium persicinum*, que produce compuestos cíclicos útiles como principio activo de una composición farmacéutica, tal como una composición farmacéutica para el tratamiento de las micosis, en particular de las micosis profundas.

10

**Técnica anterior**

Cuando se ha administrado un antibiótico durante un período prolongado de tiempo, se habrán eliminado las bacterias a las que se dirige, pero habrán aumentado los hongos resistentes a antibióticos. Se considera que tal situación provoca micosis profundas (se denomina al fenómeno por el cual aumentan notablemente los hongos que quedan sustitución microbiana). Alternativamente, un paciente de edad, un paciente posoperatorio o un paciente a quien se administra un fármaco antitumoral o un inmunosupresor está sujeto a infección fúngica debido a la biofilaxia suprimida. Se considera que el aumento de hongos en dicho paciente causa micosis profundas.

15

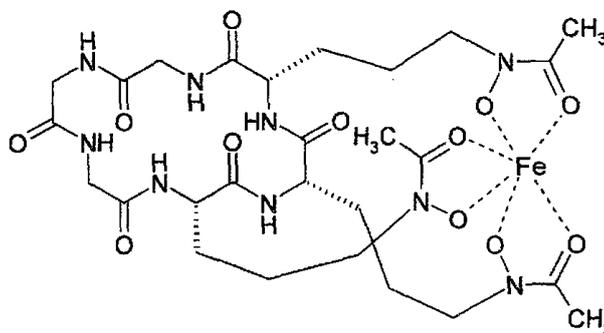
Como agentes terapéuticos para las micosis profundas, se incluyen fármacos antifúngicos, por ejemplo: 1) un fármaco de bases de ácidos nucleicos, la flucitosina, que se basa en la inhibición de la síntesis de ADN en hongos, y 2) un macrólido poliénico, la anfotericina B, un derivado de imidazol, el miconazol, y un derivado triazólico, el fluconazol, que se basan en la inhibición de la síntesis de la membrana celular en hongos.

20

El ferricromo, un hexapéptido cíclico que contiene tres ornitinas y que tiene la siguiente estructura química, es un compuesto conocido (literatura no de patente 1), pero esta referencia no dice que el ferricromo tenga actividad antifúngica.

25

[Quím. 1]



30

[0006]

[Literatura no de patente 1] Journal of American Chemical Society, 1980, vol. 102, pp. 4224-4231.

SHARMAN, G.J. et al.: "Structural elucidation of XR586, a peptaibol-like antibiotic from *Acremonium persicinum*.", BIOCHEM J, vol. 320, nº 3, 1996, páginas 723-728, describen *Acremonium persicinum*, que produce el antibiótico de tipo peptaibol XR586.

35

**Descripción de la invención**

40

**Problemas que la invención ha de resolver**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo que produce un compuesto útil como principio activo de una composición farmacéutica, tal como una composición farmacéutica para el tratamiento de las micosis, en particular de las micosis profundas.

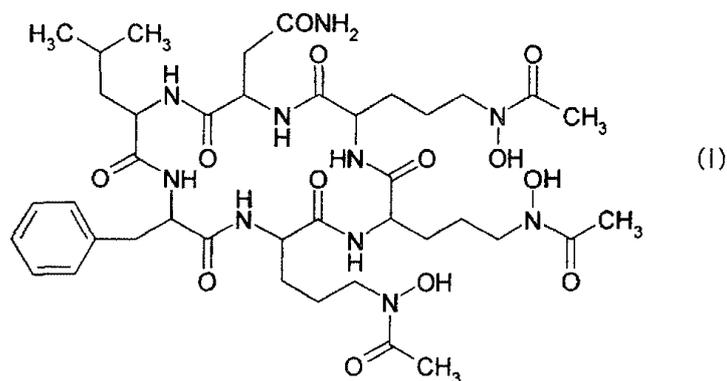
45

**Medios para solucionar los problemas**

Los presentes inventores han realizado estudios intensivos sobre microorganismos de origen natural como investigación de compuestos antifúngicos y han visto que una cepa del hongo *Acremonium persicinum*, denominada MF-347833, produce compuestos que tienen una potente actividad antifúngica. Además, los presentes inventores se centraron en el caldo de cultivo de la cepa y consiguieron aislar del caldo de cultivo compuestos cíclicos que tienen una potente actividad antifúngica, y de este modo se completó la presente invención.

La presente invención se relaciona con el hongo *Acremonium persicinum*, que produce un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo.

[Quím. 2]

**Efectos de la invención**

El hongo *Acremonium persicinum* puede producir un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo que puede ser utilizado como agente para la prevención y/o el tratamiento de las micosis, en particular de las micosis profundas o similares.

**Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1]

La Figura 1 es un gráfico que muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto A (solvente para la medición:  $\text{d}_6$ -DMSO).

[Figura 2]

La Figura 2 es un gráfico que muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto A (solvente para la medición:  $\text{d}_6$ -DMSO).

[Figura 3]

La Figura 3 es un gráfico que muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto B (solvente para la medición:  $\text{d}_6$ -DMSO).

[Figura 4]

La Figura 4 es un gráfico que muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto B (solvente para la medición:  $\text{d}_6$ -DMSO).

**Mejor modo de realización de la invención**

La presente invención será explicada con detalle a continuación.

Se describirán a continuación las características micológicas de un microorganismo que produce el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo.

(1) Origen de la cepa productora

La cepa fúngica MF-347833 del género *Acremonium* fue aislada de hojarasca recogida en el parque nacional de Endau Rompin, Johore, Malasia. Esta cepa fue depositada en el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) como FERM BP-10916 (fecha de depósito: 10 de Octubre de 2007).

(2) Características morfológicas de la cepa productora

Se determinaron las características morfológicas de la cepa en base a observaciones sobre su forma en un medio de agar dextrosa de patata. El crecimiento de la cepa en un medio de agar dextrosa de patata (Difco 2010) era rápido. Las colonias crecieron hasta alcanzar un diámetro de 39-41 mm a 25°C en 2 semanas y se formaron conidios. Las superficies de las colonias eran flocosas y sus márgenes ondulados. Cada colonia estaba radialmente surcada desde el centro hasta el margen, pero era difícil identificar estas estrías surcadas desde la superficie. Las colonias eran blancas (1A1), pero de color blanco amarillento (4A2) en su centro. Los surcos que irradiaban desde el centro hasta el margen podían ser identificados por el reverso. Las colonias eran generalmente marfileñas (4A3), pero de color marrón mostaza (5E6) en el centro. Las colonias alcanzaron aproximadamente 24 mm de diámetro a 30°C al cabo de dos semanas y no se observó crecimiento a 5°C y a 37°C.

La cepa creció rápidamente en un medio de agar de harina de maíz (Difco 0386) y las colonias se extendieron hasta un diámetro de 39-40 mm a 25°C en 2 semanas. La superficie de cada colonia era afieltrada. Su margen era ondulado y las colonias no estaban surcadas. La superficie era blanca (1A1) y el reverso también era blanco (1A1). Las colonias alcanzaron un diámetro de 14 mm a 30°C en 2 semanas y no presentaban surcos. No se observó crecimiento a 5°C y a 37°C.

Las hifas vegetativas tenían una anchura de 1,8-2,7 µm y había ausencia de clamidosporas. Los conidióforos eran hialinos, no ramificados, y surgían aisladamente de una sola hifa vegetativa o hifa plectonematógena. Muchas verrugas sobre los conidióforos y su base presentaban septos. La ontogenia de los conidios era fialídico y la longitud desde la base de cada conidióforo hasta el ápex de las fiálides era de 33-40 µm. Los conidios eran hialinos, elipsoidales, de 3,7 a 4,5 x 2,8 a 3,2 µm (media: 4 x 3 µm) de tamaño, agregados en forma de una masa en el ápex de las fiálides, pero nunca en cadena. La superficie de los conidios aparecía lisa al observarla mediante un microscopio óptico (x400), pero se pudo observar un patrón más o menos cóncavo-convexo con un microscopio electrónico (x9.000).

Las características morfológicas indican la posibilidad de que la cepa pertenezca al género *Acremonium*. Se hizo una comparación basada en *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*/Walter Gams (1971) y, como resultado, las características morfológicas de la cepa concordaban con las de *Acremonium persicinum* en la sección *Gliomastix*. Además, como resultado de una búsqueda de homologías con respecto a un ADNr 28S y un ADNr 18S de la cepa, estos ADNr fueron incluidos en el clado de *Acremonium persicinum* en la sección *Gliomastix*. La conclusión a partir de las características morfológicas era consistente con la obtenida a partir de las características genéticas. Se identificó la cepa como *Acremonium persicinum* y se la designó como *Acremonium persicinum* cepa MF-347833.

(3) Características de cultivo

Se determinaron las características de cultivo de la cepa con medios comerciales y medios preparados según composiciones descritas en una referencia. Como medio de agar dextrosa de patata, medio de agar dextrosa de Sabouraud, medio de agar YpSs de Emerson, medio de agar de harina de maíz y medio de agar de harina de avena, se compraron Difco 2010, Difco 0109, Difco 0739, Difco 0386 y Difco 0552, respectivamente. Se prepararon un medio de agar con extracto de malta, un medio de agar con solución de Czapek y un medio de agar MY20 según las composiciones descritas en un catálogo JCM (Nakase, T. 6ª ed., p. 617, Japan Collection of Microorganisms, The Institute of Physical and Chemical Research, Saitama, 1995).

[Tabla 1] Características de cultivo de *Acremonium persicinum* cepa MF-347833

Medios	Características de cultivo
Agar con extracto de malta	Crecimiento: Rápido. 30-31 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen, flocosa, blanca (1A1). Reverso: De amarillo claro a naranja claro (5A3).
Agar dextrosa de patata (Difco 2010)	Crecimiento: Rápido. 39-41 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen, flocosa, de blanca (1A1) a blanca amarillenta (4A2). Reverso: Surcado, marfil (4A3). Marrón mostaza en el centro (5E6).
Agar con solución de Czapek	Crecimiento: Rápido. 57-59 mm de diámetro. Superficie: Circular, entera en el margen. Afieltrada, algo gris rojiza en el centro, generalmente blanca (1A1). Reverso: Naranja claro (5A2).
Agar dextrosa de Sabouraud (Difco 0109)	Crecimiento: Rápido. 32-33 mm de diámetro.

	Superficie: Circular, ondulada en el margen. Forma estrías. Flocosa, blanca (1A1). Reverso: Surcado, blanco amarillento (4A2).
Agar YpSs de Emerson (Difco 0739)	Crecimiento: Rápido. 36-38 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen. Afieltrada, generalmente blanca (1A1). Reverso: Naranja claro (5A2).
Agar de harina de maíz (Difco 0386)	Crecimiento: Rápido. 39-40 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen. Afieltrada, generalmente blanca (1A1). Reverso: Blanco (1A1).
Agar MY20	Crecimiento: Rápido. 34-35 mm de diámetro. Superficie: Circular, entera en el margen. Flocosa, generalmente blanca (1A1). Reverso: Amarillo claro (4A4).
Agar de harina de avena (Difco 0552)	Crecimiento: Rápido. 50-51 mm de diámetro. Superficie: Circular, entera en el margen. Flocosa, blanca amarillenta (4A2) en el centro, generalmente blanca (1A1). Reverso: Amarillo claro (4A4).

5 La cepa MF-347833 del hongo fue inoculada sobre cada uno de los medios de agar y se la observó tras cultivarla a 25°C durante 14 días. Se determinaron los colores según el Methuen Handbook of Colour (Kornerup, A. y J.H.Wanscher, 3ª ed., p. 252, Methuen, Londres, 1987). Se determinaron las temperaturas de crecimiento en el medio de agar dextrosa de patata (Difco 2010).

10 La cepa muestra a veces variaciones de origen artificial o natural. El hongo *Acremonium persicinum* cepa MF-347833 utilizado en la presente invención incluye no sólo la cepa originalmente aislada, sino también variaciones artificiales causadas por rayos ultravioleta, radiaciones, agentes químicos o similares y variaciones de origen natural.

15 El compuesto de fórmula (I) forma a veces una sal con una base. Como tal sal, se pueden mencionar, por ejemplo, sales con una base inorgánica, tal como sodio, potasio, magnesio, calcio o similares, o sales con una base orgánica, tal como metilamina, etilamina, etanolamina, lisina, ornitina o similares. Las sales aquí utilizadas incluyen una sal así llamada compleja y un compuesto quelato. El metal que forma dicha sal puede ser un metal divalente o trivalente, tal como hierro, aluminio o similares.

20 De aquí en adelante, se hará a veces referencia a la forma libre del compuesto de fórmula (I), a una sal de aluminio del compuesto de fórmula (I) y a una sal de hierro del compuesto de fórmula (I) como compuesto A, compuesto B y compuesto C, respectivamente.

El compuesto de fórmula (I) existe como varios isómeros geométricos. El compuesto de fórmula (I) es a veces mostrado solamente como un único isómero en esta memoria, pero la presente descripción incluye isómeros distintos del isómero único, y además incluye isómeros aislados y sus mezclas.

25 El compuesto de fórmula (I) tiene a veces uno o más átomos de carbono asimétricos, y puede haber varios isómeros ópticos en base a los átomos de carbono asimétricos. La presente descripción incluye los isómeros ópticos aislados y sus mezclas.

30 La presente descripción incluye diversos hidratos, solvatos y formas cristalinas del compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo, e incluye además diversos compuestos marcados con un radioisótopo o un no radioisótopo.

(Procedimiento de producción)

35 El compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo puede ser obtenido cultivando el microorganismo de la presente invención según los métodos generales de cultivo de microorganismos.

40 El medio que se ha de utilizar no está particularmente limitado, en la medida en que contenga fuentes de nutrientes capaces de ser utilizadas por el hongo *Acremonium persicinum* cepa MF-347833. Se puede usar un medio sintético, un medio semisintético o un medio natural. Con respecto a la composición del medio, se pueden usar como fuente de carbono L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, inositol, L-ramnosa, rafinosa, D-manitol, manosa, melibiosa, lactosa, D-galactosa, maltosa, trehalosa, salicina, xantina, quitina, almidón, glucosa, dextrina, glicerol, aceite vegetal o similares. Como fuente de nitrógeno, se pueden usar extracto de carne, peptona, harina de gluten, harina de semillas de algodón, polvo de soja, polvo de cacahuete, harina de pescado, licor de maíz macerado,

levadura seca, extracto de levadura, cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, ácido úrico u otras fuentes de nitrógeno orgánicas o inorgánicas. Si se desea, se pueden añadir sulfato, nitrato, carbonato, fosfato o similares de sodio, potasio, magnesio, calcio, zinc, hierro, cobalto o similares como sales metálicas. Además, se puede añadir, si se desea, un compuesto que promueva la generación o un agente antiespumante, tal como metionina, cisteína, cistina, tiosulfato, oleato de metilo, aceite de manteca, aceite de silicio, surfactantes o similares.

Con respecto a las condiciones de cultivo, generalmente se prefiere cultivar la cepa en condiciones aerobias, a una temperatura de 8,9 a 31,2°C, preferiblemente de aproximadamente 26,0 a 27,6°C. El período de cultivo puede ser apropiadamente seleccionado según la composición del medio o las condiciones de temperatura, pero es generalmente de aproximadamente 1 a 30 días, preferiblemente de aproximadamente 2 a 7 días.

El compuesto de fórmula (I) o su sal puede ser purificado y aislado de un cultivo según métodos convencionales de purificación y aislamiento de una sustancia fisiológicamente activa a partir de un cultivo de un microorganismo común. Más en particular, se extrae un cultivo con un solvente orgánico apropiado y se purifica y aísla una sustancia deseada del extracto resultante. Es decir, se llevan a cabo la separación y la purificación usando la actividad antifúngica como índice por métodos que emplean la diferencia en cuanto a solubilidad en un solvente apropiado o similar y que se usan en la preparación de una sustancia fisiológicamente activa común. Estos métodos pueden ser apropiadamente utilizados solos, en una combinación deseada de los mismos o repetidamente. Como otros métodos de purificación, se puede someter un cultivo *per se* o un sobrenadante preparado eliminando el hongo del cultivo por centrifugación o filtración a métodos que emplean la diferencia en cuanto a solubilidad en un solvente apropiado, la diferencia en cuanto a velocidad de precipitación a partir de una solución, la diferencia en cuanto a afinidad de adsorción por diversos adsorbentes, la diferencia en cuanto a distribución entre dos fases líquidas o similares. Por ejemplo, se puede poner en contacto un líquido de cultivo con un soporte apropiado y se puede eluir del soporte el compuesto adsorbido con un solvente apropiado para purificar el compuesto. Estos métodos pueden ser apropiadamente utilizados solos, en una combinación deseada de los mismos o repetidamente.

Se puede obtener el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo cultivando el microorganismo de la presente invención en un medio nutriente y separando el compuesto del cultivo resultante según un método convencional. El microorganismo utilizado en la producción del compuesto de fórmula (I) o de una sal del mismo no está particularmente limitado, en la medida en que pertenezca al género *Acremonium*, capaz de producir el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo.

Se puede preparar la composición farmacéutica que contiene uno o dos o más del compuesto de fórmula (I) o sus sales como principio activo según métodos comúnmente utilizados, utilizando excipientes generalmente empleados en este campo, tales como excipientes farmacéuticos, soportes farmacéuticos o similares.

Como ejemplos de administración, se incluyen la administración oral mediante tabletas, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, líquidos y similares, y la administración parenteral mediante inyecciones (*v.g.*, intraarticulares, intravenosas, intramusculares o similares), supositorios, soluciones oftálmicas, ungüentos oftálmicos, líquidos transdérmicos, ungüentos, uniones transdérmicas, líquidos transmucosales, apósitos transmucosales, agentes inhalatorios y similares.

Para una formulación sólida para administración oral, se pueden usar tabletas, polvos, gránulos o similares. Dicha formulación sólida puede ser preparada mezclando uno o dos o más de los principios activos con al menos un excipiente inerte, tal como lactosa, manitol, glucosa, hidroxipropilcelulosa, celulosa microcristalina, almidón, polivinilpirrolidona, aluminato metasilicato de magnesio y/o similares. La composición puede contener aditivos inertes, por ejemplo lubricantes, tales como estearato de magnesio, desintegrantes, tales como carboximetilalmidón sodio o similares, estabilizadores o agentes auxiliares de disolución, según métodos convencionales. Las tabletas o píldoras pueden ir revestidas de un revestimiento de azúcar o de una película de una sustancia gástrica o entérica, si se desea.

La composición líquida para administración oral incluye emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires o similares farmacéuticamente aceptables y contiene solventes inertes de uso común, tales como agua destilada o etanol. Además de los solventes inertes, la composición líquida puede contener agentes auxiliares (tales como solubilizadores, agentes humectantes o agentes suspensores), edulcorantes, saborizantes, agentes aromáticos o conservantes.

Las inyecciones para administración parenteral incluyen líquidos, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. El solvente acuoso incluye, por ejemplo, agua destilada para inyección y suero fisiológico. El solvente no acuoso incluye, por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva, alcoholes, tales como etanol, polisorbato 80 (nombre de la Farmacopea) y similares. Dichas composiciones pueden contener además agentes isotónicos, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsores, dispersantes, estabilizadores o agentes auxiliares de disolución. Estas composiciones pueden ser esterilizadas, por ejemplo, por

filtración a través de un filtro de retención de bacterias, mezcla de un germicida o irradiación. Alternativamente, pueden ser utilizadas convirtiéndolas primeramente en composiciones sólidas estériles y disolviéndolas o suspendiéndolas en agua estéril u otro solvente estéril para uso en inyección con anterioridad a su empleo.

5 Como preparaciones externas, se incluyen ungüentos, apósitos, cremas, gelatinas, emplastos, sprays, lociones, soluciones oftálmicas, ungüentos oftálmicos y similares. Dichas preparaciones contienen bases de ungüentos, bases de lociones, líquidos acuosos o no acuosos, suspensiones, emulsiones o similares comúnmente empleados. Son ejemplos de las bases de ungüentos o de lociones polietilenglicol, propilenglicol, vaselina blanca, cera de abejas  
10 blanca, aceite de ricino hidrogenado y polioxietilenglicol, monoestearato de glicerilo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, lauromacrogol, sesquioleato de sorbitán y similares.

Se pueden usar agentes transmucosales, tales como agentes inhalatorios y agentes transnasales, en forma sólida, líquida o semisólida, y éstos pueden ser preparados por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden añadir, si se desea, excipientes conocidos, ajustadores del pH, conservantes, surfactantes, lubricantes, estabilizadores, espesantes o similares. Para la administración, se pueden usar dispositivos apropiados para inhalación o insuflación.  
15 Por ejemplo, utilizando dispositivos conocidos (tales como un dispositivo de inhalación para administración calibrada) o pulverizadores, el compuesto puede ser administrado solo o puede ser administrado en forma de polvo de una mezcla formulada o como una solución o suspensión con un soporte farmacéuticamente aceptable. Un dispositivo de inhalación para polvo seco o similar puede ser un dispositivo para administración única o para  
20 múltiples administraciones, y se puede usar un polvo seco o una cápsula que contenga polvo. Alternativamente, el compuesto puede ser administrado en forma de un spray aerosol bajo presión o similar, usando un agente para eyección apropiado, por ejemplo un gas apropiado, tal como un clorofluoroalcano, un hidrofuroalcano, dióxido de carbono o similares.

25 En el caso de la administración oral, la dosificación habitual es de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,1 a 10 mg/kg, al día, que se administran en una porción o en dos a cuatro porciones. En el caso de la administración intravenosa, la dosificación habitual es de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg al día, que se administran una o varias veces al día. La dosis es determinada aproximadamente considerando cada caso, por ejemplo, los síntomas, la edad, el sexo o similares de cada paciente al que se ha de administrar.

30 El compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo puede ser utilizado junto con diversos agentes para el tratamiento o la prevención de enfermedades para las que se considera que el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo es efectivo. Se puede realizar la administración simultánea o sucesivamente sin intervalo o con un intervalo apropiado. Se puede realizar la administración simultánea en forma de una formulación única o en forma de formulaciones  
35 discretas.

**Ejemplos**

40 Se ilustrará además el procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo mediante los siguientes Ejemplos, pero la presente descripción no se limita a los compuestos descritos a continuación. Además, el procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo no se limita a los procedimientos específicos descritos en los siguientes ejemplos operativos, y el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo puede ser preparado mediante la combinación de estos procedimientos o mediante un método convencional obvio para el experto en la técnica.

45 Las abreviaturas mostradas en la Tabla 2 serán usadas en los siguientes Ejemplos, Ejemplos de Preparación y Tablas.

[Tabla 2]

50

Abreviaturas	Nombres completos
AlK(SO <sub>4</sub> )·12H <sub>2</sub> O	Sulfato de aluminio y de potasio dodecahidrato
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Cloruro de hierro(III) hexahidrato
KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihidrógeno fosfato de potasio
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidrato
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sodio
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amonio
TFA	Ácido trifluoroacético
HR ESI MS	MS de ionización por electroaspersión de alta resolución

**Ejemplo 1**

(Producción por cultivo del compuesto A)

- 5 Se vertió un medio de siembra 1 (véase la Tabla 3, 30 ml) en un matraz Erlenmeyer (tamaño: 100 ml) y se esterilizó por autoclavado (121°C, 30 minutos). Se inoculó asépticamente el contenido de un asa de siembra de la cepa fúngica MF-347833 a partir de un cultivo inclinado en el medio de siembra 1 y se cultivó a 25°C durante 4 días, agitando mientras tanto en un agitador rotatorio (220 rpm). A continuación, se vertió un medio de producción 1 (véase la Tabla 4, 100 ml) en un matraz Erlenmeyer (tamaño: 500 ml) y se esterilizó por autoclavado (121°C, 30 minutos). Se inoculó asépticamente el cultivo de siembra (2 ml) en este matraz y se cultivó a 25°C durante 7 días, agitando mientras tanto en un agitador rotatorio (220 rpm). Se monitorizó el cultivo por HPLC (HPLC1 analítica; con respecto a las condiciones, véase la Tabla 5).

[Tabla 3]

Medio de siembra 1	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Almidón de maíz	2
Glicerol	1
Sacarosa	1
Medio Farma	1
Harina de gluten	1
Tween 80	0,2

[Tabla 4]

Medio de producción 1	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Glucosa	0,5
Almidón soluble (Nacalai Tesque)	1,5
Extracto de levadura (Wako Pure Chemical Industries)	0,5
KCl	0,02
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
NaNO <sub>3</sub>	0,2

[Tabla 5]

Condiciones de la HPLC1 analítica	
Columna	Mightysil RP-18 GP 150-4,6 (5 µm), Kanto Chemical
Fase móvil	MeCN:agua=28:72(v/v) (con un contenido del 0,5% en NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Velocidad de flujo	1 ml/min.
Longitud de onda de detección	210 nm
Tiempo de retención	Aproximadamente 4,2 min.

(Aislamiento y purificación del compuesto A)

- 25 Al cultivo (2,6 l) obtenido mediante el anterior método de cultivo, se le añadió igual volumen de acetona. Se agitó esta mezcla durante 1 hora y se filtró, para obtener un extracto de cultivo. Se mezcló el líquido del extracto de cultivo resultante con doble volumen de agua y se aplicó a una columna Diaion SP 850 (tamaño: 400 ml, Mitsubishi Chemical). Se llevó a cabo la elución usando un solvente mixto [acetona:agua = 30:70 (v/v), 1,9 l].
- 30 Se mezcló el eluato resultante con agua (2,1 l). Se aplicó la totalidad a una columna Daisogel SP-120-ODS-B (tamaño: 350 ml, 15/30 µm; DAISO) y se eluyó con un solvente mixto [MeCN:agua = 25:75 (v/v), 340 ml].
- Se añadió agua (350 ml) a este eluato y se aplicó a un cartucho OASIS HLB (tamaño: 6 g, Waters), y se eluyó con MeOH (150 ml). Se concentró el eluato obtenido a presión reducida y se añadió acetona al concentrado, para obtener un precipitado. Se secó este precipitado, para obtener un polvo amarillo (100 mg).

35 Se disolvió una porción (15 mg) de este polvo amarillo en una pequeña cantidad de MeOH y se purificó por HPLC1 preparatoria (con respecto a las condiciones, véase la Tabla 6). Se recogió un pico en el tiempo de elución de aproximadamente 22 minutos. Se mezcló la fracción recogida con igual volumen de agua y se aplicó a un cartucho

OASIS HLB (tamaño: 500 mg). Se pasó agua (50 ml) a través del cartucho y se llevó a cabo la elución usando MeOH (50 ml). Se concentró este eluato a presión reducida y se añadió acetona al concentrado, para obtener un precipitado. Se secó este precipitado, para obtener el compuesto A (13 mg) como un polvo blanco.

5 [Tabla 6]

Condiciones de la HPLC1 preparatoria	
Columna	Columna C18 Symmetry 7 $\mu\text{m}$ , 19x300 mm, Waters
Fase móvil	MeCN:agua = 27:73 (v/v) (con un contenido del 0,05% en TFA)
Velocidad de flujo	7 ml/min.

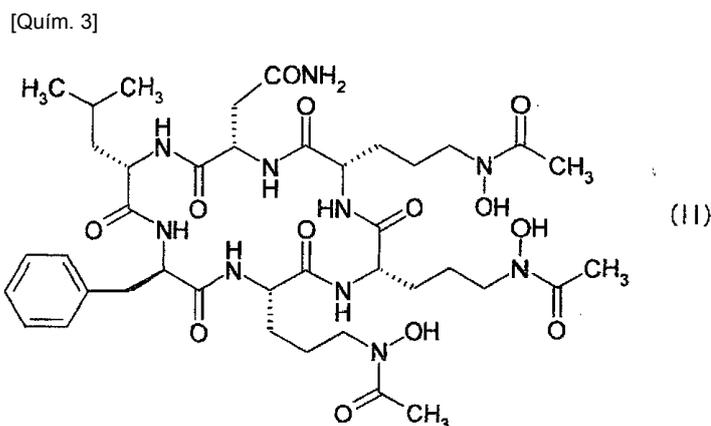
(Propiedades fisicoquímicas del compuesto A)

10 El compuesto A, purificado y aislado mediante el anterior procedimiento, mostró las propiedades fisicoquímicas mostradas en la Tabla 7.

[Tabla 7]

Propiedades fisicoquímicas del compuesto A	
Color y forma	Polvo blanco
Rotación óptica	$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -57^{\circ}$ (c 0,01, MeOH)
Fórmula molecular	$\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$
HR ESI-MS	Encontrado 891,4592 (M+H) <sup>+</sup> , Calculado 891,4576
IR (KBr) $\text{cm}^{-1}$	3300, 2950, 1680, 1650, 1640, 1540, 1460, 1420, 1240, 1210, 1160, 1040, 970
Espectro de $^1\text{H}$ -RMN	Mostrado en la Figura 1
Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN	Mostrado en la Figura 2

15 Se concluyó por las propiedades fisicoquímicas que el compuesto A tiene una estructura química de la siguiente fórmula (II). Además, se concluyó que las configuraciones de los aminoácidos constitutivos eran D-Phe, L-Leu y L-Asn de acuerdo con el método de Marfey modificado. Con respecto a la porción de ornitina, comparamos el compuesto A con un análogo natural, el Ferricromo (literatura no de patente 1) y supusimos que era L-ornitina, ya  
20 que un análisis de aminoácidos mostró que tres aminoácidos eran idénticos.



## Ejemplo 2

25 (Producción por cultivo de los compuestos B y C)

Se vertió un cultivo de siembra 2 (véase la Tabla 8, 30 ml) en un matraz Erlenmeyer (tamaño: 100 ml) y se esterilizó por autoclavado (121°C, 30 minutos). Se inoculó asépticamente el contenido de un asa de siembra de la cepa fúngica MF-347833 a partir de un cultivo inclinado en el medio de siembra y se cultivó a 25°C durante 4 días, agitando mientras tanto en un agitador rotatorio (220 rpm).  
30

Se vertió el mismo medio de siembra (160 ml) en un matraz Erlenmeyer (tamaño: 500 ml) y se esterilizó por autoclavado (121°C, 30 minutos). Se inoculó asépticamente el cultivo de siembra (3,2 ml) en este medio de siembra

## ES 2 408 190 T3

y se cultivó a 25°C durante 3 días, agitando mientras tanto en un agitador rotatorio (220 rpm).

5 A continuación, se vertió un medio de producción 2 previamente preparado (véase la Tabla 9, 20 l) en un fermentador de jarra (tamaño: 30 l) y se esterilizó (121°C, 30 minutos). Se inoculó asepticamente el cultivo de siembra (480 ml) en el fermentador de jarra y se cultivó a 25°C durante 7 días bajo aireación a 20 l/min. y agitación a 200 rpm. Se monitorizó el cultivo por HPLC (HPLC2 analítica; con respecto a las condiciones, véase la Tabla 11).

10 Cuando se usó un medio de producción 3 en lugar del medio de producción 2, se pudo llevar a cabo la anterior producción por cultivo en las mismas condiciones de cultivo.

[Tabla 8]

Medio de siembra 2	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Almidón de maíz	2
Glicerol	1
Sacarosa	1
Medio farma	1
Harina de gluten	1
Tween 80	0,2

[Tabla 9]

15

Medio de producción 2	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Glucosa	0,5
Almidón soluble (Nacalai Tesque)	1,5
Extracto de levadura (Wako Pure Chemical Industries)	0,5
Adekanol LG-109 (ADEKA)	0,05
Silicone KM-70 (Shin-Etsu Chemical)	0,05
KCl	0,02
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
NaNO <sub>3</sub>	0,2

[Tabla 10]

Medio de producción 3	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Sacarosa	4
Levadura seca (Asahi Food and Healthcare)	1,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
Carbonato de calcio	0,5

20 [Tabla 11]

Condiciones de la HPLC2 preparatoria	
Columna	Mightysil RP-18 GP 150-4,6 (5 μm), Kanto Chemical
Fase móvil	MeCN:H <sub>2</sub> O=28:72(v/v) (con un contenido del 0,5% en NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Velocidad de flujo	1 ml/min.
Longitud de onda de detección	210 nm
Tiempo de retención	Compuesto B (aproximadamente 8,7 min.), Compuesto C (aproximadamente 10 min.)

(Aislamiento y purificación de los Compuestos B y C)

25 Se añadió al cultivo (medio de producción 2: 90 l) obtenido mediante el anterior método de cultivo igual volumen de acetona. Se agitó esta mezcla durante 1 hora y se filtró, para obtener un extracto de cultivo. Se mezcló el líquido del extracto de cultivo resultante con igual volumen de agua y se aplicó a una columna Diaion SP 850 (10 l, Mitsubishi Chemical). Se llevó a cabo la elución usando un solvente mixto [acetona:agua = 40:60 (v/v), 40 l].

## ES 2 408 190 T3

Se añadió al eluato resultante igual volumen de agua. Se aplicó la totalidad a una columna Daisogel SP-120-ODS-B (15/30  $\mu\text{m}$ , tamaño: 2 l; DAISO) y se eluyó con un solvente mixto [MeCN:agua = 25:75 (v/v), 7 l].

5 Se añadió a este eluato igual volumen de agua. Se aplicó la totalidad a la columna Daisogel SP-120-ODS-B (tamaño: 2 l) de nuevo y se eluyó con un solvente mixto [MeCN:agua = 27,5:72,5 (con un contenido del 0,05% en TFA) (v/v)].

10 Se añadió a este eluato igual volumen de agua. Se aplicó la totalidad a la columna Daisogel SP-120-ODS-B (tamaño: 180 ml) de nuevo y se eluyó con MeOH. Se concentró el eluato obtenido a presión reducida.

Se disolvió el residuo resultante en una pequeña cantidad de MeOH y se purificó por HPLC2 preparatoria (con respecto a las condiciones, véase la Tabla 12).

15 Se mezcló la fracción en el tiempo de elución de aproximadamente 24 a 25 minutos con igual volumen de agua y se aplicó a un cartucho OASIS HLB (tamaño: 6 g, Waters). Se pasó agua (100 ml) a través del cartucho y se llevó a cabo la elución usando MeOH (100 ml). Se concentró este eluato a presión reducida, se substituyó con agua y se liofilizó, para obtener el compuesto C (130 mg) como un polvo. Se cristalizó este polvo usando solventes (MeOH, acetato de etilo y n-hexano), para obtener el compuesto C como cristales de color naranja.

20 Se repitió el anterior procedimiento, excepto por la utilización de otra fracción en el tiempo de elución de aproximadamente 19 a 21 minutos, para obtener un polvo. Se disolvió este polvo en  $\text{CHCl}_3$  y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Spherical 60N, neutra, 40-100  $\mu\text{m}$ , Kanto Chemical;  $\text{CHCl}_3$ :MeOH = 10:1). Se concentró el eluato resultante a presión reducida, se substituyó con agua y se liofilizó, para obtener el compuesto B (150 mg) como un polvo blanco. Se cristalizó este polvo blanco (109 mg) usando solventes (MeOH, acetato de etilo y n-hexano), para obtener el compuesto B (90,1 mg) como cristales incoloros.

[Tabla 12]

Condiciones de la HPLC2 preparatoria	
Columna	Columna Mightysil RP-18 GP, 250x20 mm DI, Kanto Chemical
Fase móvil	MeCN:agua = 30:70 (v/v) (con un contenido del 0,05% en TFA)
Velocidad de flujo	10 ml/min.

30 (Propiedades fisicoquímicas del compuesto B)

El compuesto B, purificado y aislado mediante el procedimiento anterior, mostró las propiedades fisicoquímicas mostradas en la Tabla 13, y, por lo tanto, supusimos que era un compuesto en el que la razón de compuesto a aluminio era 1:1.

35

[Tabla 13]

Propiedades fisicoquímicas del compuesto B	
Color y forma	Cristales incoloros
Rotación óptica	$[\alpha]_D^{25} +210^\circ$ (c 0,01, MeOH)
Fórmula molecular	$\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{AlN}_{10}\text{O}_{13}$
HR ESI-MS	Encontrado 915,4191 (M+H) <sup>+</sup> , Calculado 915,4157
IR (KBr) $\text{cm}^{-1}$	3300, 2930, 1680, 1650, 1620, 1520, 1370, 1240, 1140, 990
Punto de fusión	295°C
Espectro de $^1\text{H}$ -RMN	Mostrado en la Figura 3
Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN	Mostrado en la Figura 4

(Propiedades fisicoquímicas del compuesto C)

40

Por el análisis estructural de rayos X del cristal simple y por el hecho de que el compuesto C purificado y aislado mediante el anterior procedimiento mostrara las propiedades fisicoquímicas mostradas en la Tabla 14, determinamos que éste era un compuesto en el que la razón de compuesto a hierro era de 1:1.

45

[Tabla 14]

Propiedades fisicoquímicas del compuesto C	
Color y forma	Cristales de color naranja
Rotación óptica	$[\alpha]_D^{25} +256^\circ$ (c 0,01, MeOH)

Fórmula molecular	C <sub>40</sub> H <sub>59</sub> FeN <sub>10</sub> O <sub>13</sub>
HR ESI-MS	Encontrado 944,3693 (M+H) <sup>+</sup> , Calculado 944,3691
Análisis estructural de rayos X del cristal simple	a = 13,850 (1) Å, b = 15,135 (1) Å, c = 29,290 (2) Å, V = 5091,6 (0) Å <sup>3</sup>

### Ejemplo 3

(Ensayo de actividad antifúngica)

Se determinaron las actividades antifúngicas para los hongos de ensayo mostrados en la Tabla 15 mediante un método de microdilución en caldo (Hikaru Kume y Toshikazu Yamazaki, *Clinical Microbiology*, Vol. 21, Nº 5, pp. 573-580, 1994). En la Tabla 15 se muestra el resultado del ensayo para las actividades antifúngicas del compuesto B frente a los hongos de ensayo.

[Tabla 15]

Concentraciones mínimas efectivas (CME) del compuesto B	
Hongos de ensayo	CME (µg/ml)
<i>Candida krusei</i> FP1979	0,31
<i>Candida glabrata</i> FP1944	0,31
<i>Candida guilliermondii</i> FP2086	0,31
<i>Candida parapsilosis</i> FP1980	0,39
<i>Cryptococcus neoformans</i> FP1739	0,2
<i>Aspergillus fumigatus</i> FP1305	0,31
<i>Aspergillus terreus</i> SR0174	0,31
<i>Aspergillus niger</i> ATCC6275	0,78
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC9643	0,2
<i>Trichosporon asahi</i> FP2044	0,2
<i>Fusarium solani</i> FP1930	0,2
<i>Pseudallescheria boydii</i> FP1987	0,2
<i>Rhizopus oryzae</i> FP1988	25
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FP2103	0,78
<i>Trichophyton rubrum</i> FP596	1,25
<i>Alternaria alternata</i> AHU9258	0,1

Como resultado, se confirmó que el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo tiene una actividad antifúngica. El compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo puede ser usado en el tratamiento o similar de las micosis, en particular de las micosis profundas o similares, tales como la sinusitis micótica.

Como se ha descrito anteriormente, se confirmó que el hongo *Acremonium persicinum* cepa MF-347833 es un microorganismo que produce el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo, que es útil y puede ser usado en el tratamiento o similar de las micosis, en particular de las micosis profundas o similares, tales como la sinusitis micótica.

### Aplicabilidad industrial

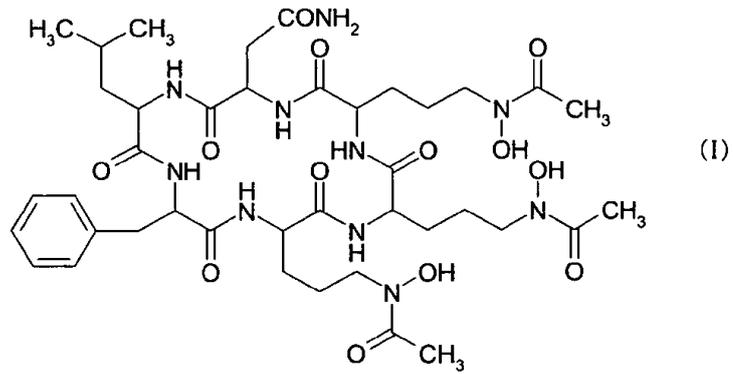
El microorganismo de la presente invención, la cepa de *Acremonium persicinum* designada como MF-347833, produce el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo, que tiene una potente actividad antifúngica. El compuesto obtenido de fórmula (I) o una sal del mismo puede ser usado como agente para prevenir y/o tratar micosis, en particular micosis profundas o similares.

Aunque la presente invención ha sido descrita haciendo referencia a realizaciones específicas, son posibles diversos cambios y modificaciones que resulten obvios para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo perteneciente al género *Acremonium* y que produce un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo, donde el microorganismo es *Acremonium persicinum* cepa MF-347833, con N° de Depósito FERM BP-10916.

[Quím. 1]



- 10 2. Una cepa MF-347833 de *Acremonium persicinum* con N° de Depósito FERM BP-10916.

Figura 1

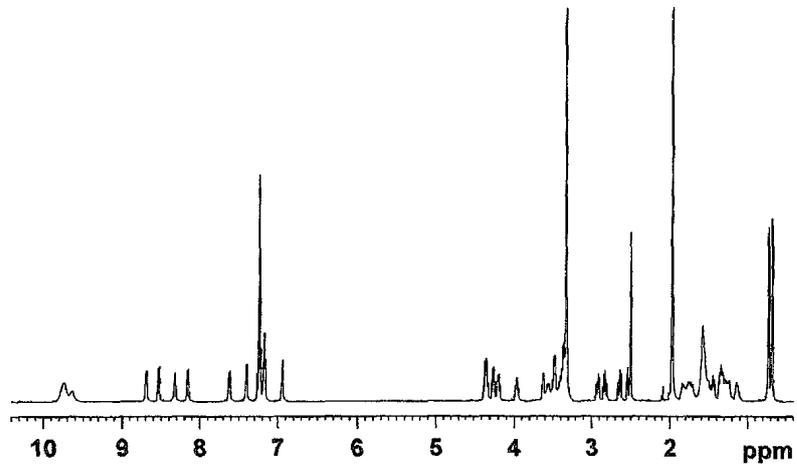


Figura 2

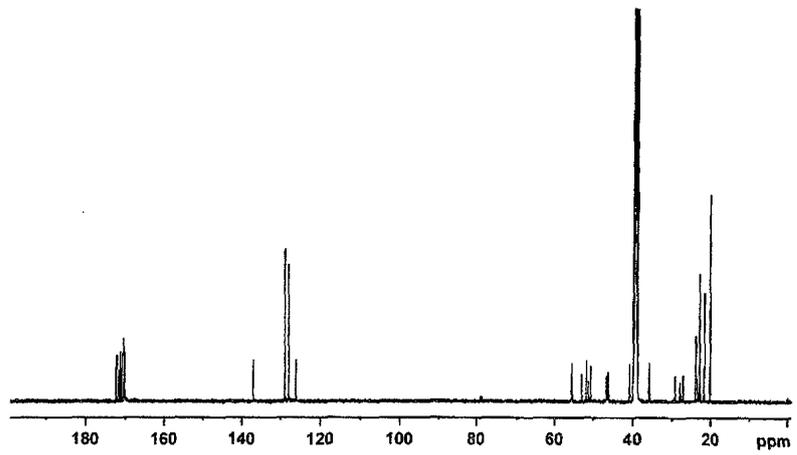


Figura 3

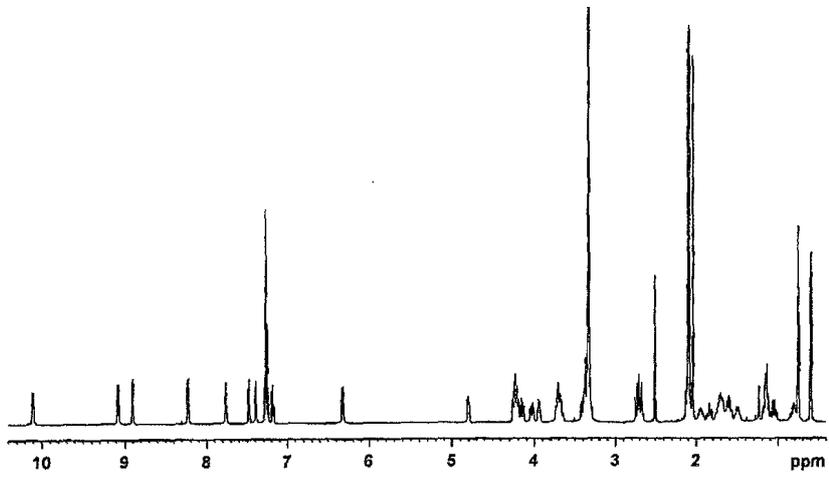


Figura 4

