

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 049**

51 Int. Cl.:

**C07D 498/02** (2006.01)

**A61K 31/4375** (2006.01)

**A61P 31/10** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 1/04** (2006.01)

**C12R 1/465** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2014 PCT/JP2014/072796**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15030197**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014 E 14840178 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 3040338**

54 Título: **Nuevo producto microbiano que tiene actividad antifúngica**

30 Prioridad:

**29.08.2013 JP 2013178707**

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

**16.02.2018**

73 Titular/es:

**SEED RESEARCH INSTITUTE CO., LTD. (50.0%)  
663-7, Aza-Ginoza, Kunigami-gun  
Okinawa 904-1302, JP y  
OP BIO FACTORY CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KATO, SACHI;  
MATSUMOTO, YOSHIMI;  
NAOKI, HIDEO y  
IWAMI, MORITA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 655 049 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**

Nuevo producto microbiano que tiene actividad antifúngica

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un compuesto que tiene un núcleo madre, a su uso como agente antifúngico, a uno de sus métodos de producción.

**Antecedentes de la técnica**

10 En los últimos años, junto con un incremento de personas mayores, el progreso de la medicina avanzada, la inmunodeficiencia de los pacientes de cáncer de las últimas etapas y similares, se han incrementado las infecciones con hongos. Estas infecciones producen graves efectos, provocando a menudo la muerte. Dado que no hay muchos tipos de agentes existentes, y su toxicidad es alta, se ha deseado el núcleo madre de un nuevo agente antifúngico, que sea diferente del de los medicamentos convencionales. Además, dado que el uso de agentes antifúngicos provoca la emergencia incrementada de bacterias resistentes, se ha deseado seriamente el desarrollo de un nuevo medicamento. Aunque los agentes fúngicos basados en candina muestran baja toxicidad, dado que su peso molecular es grande, la reactividad con suero presenta problemas. Los agentes antifúngicos basados en azol tienen un problema por el hecho de que la administración a una alta concentración es difícil en vista de su toxicidad. Por lo tanto, se ha deseado fuertemente un compuesto efectivo de bajo peso molecular que muestre baja reactividad con suero y baja toxicidad.

20 Convencionalmente, en la búsqueda de un compuesto semilla de producto farmacéutico a partir de metabolitos microbianos, se han cosechado principalmente y sometido a separación de microorganismos fuentes de separación terrestres. Los metabolitos microbianos encontrados hasta la fecha incluyen penicilina y adriamicina, y se encontraron varios antibióticos y agentes anticáncer y se utilizaron como fármacos terapéuticos para infección, cáncer y similares. Sin embargo, debido a la continua búsqueda durante un largo periodo, los metabolitos microbianos obtenidos de las áreas terrestres son compuestos conocidos en su mayoría, y un metabolito secundario para ser candidato para un nuevo medicamento es extremadamente difícil de obtener. Consecuentemente, el desarrollo de un nuevo medicamento por las corporaciones de descubrimiento de fármacos de sustancias naturales se redujo rápidamente. Para superar la situación, se ha realizado a escala global una búsqueda usando una librería química (sustancias naturales y compuestos sintetizados). Inesperadamente, sin embargo, un prometedor nuevo compuesto candidato a medicamento no se obtuvo de la librería química. En tales circunstancias, es extremadamente difícil obtener un nuevo compuesto candidato a medicamento.

**30 Sumario de la invención**

Problemas a resolver por la invención

35 La presente invención se ha realizado en vista de la anteriormente mencionada situación en el campo técnico, y tiene como objetivo proporcionar un compuesto que tiene un nuevo núcleo madre, que puede ser un prometedor compuesto semilla de descubrimiento de fármacos, su uso como un agente antifúngico, y uno de sus métodos de producción.

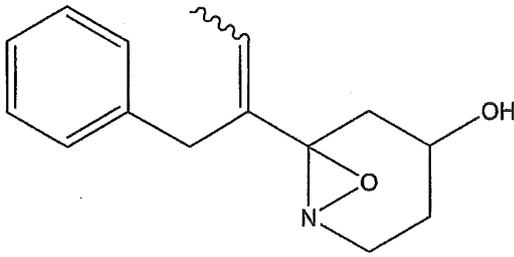
Medios de resolver los problemas

40 En vista de la anteriormente mencionada actual situación en la búsqueda de un nuevo compuesto candidato a medicamento, los presentes inventores tomaron nota de los recursos de microorganismos marinos. Los recursos de microorganismos marinos apenas se han utilizado, y tienen una alta posibilidad de dar un nuevo metabolito secundario. Sin embargo, es necesaria una técnica especial para cosechar fuentes de separación, y la técnica de cultivo para ello no se ha establecido suficientemente. Los presentes inventores han realizado intensos estudios de un método de recogida de muestras del océano, un método de cultivo y un método de evaluación de microorganismos, y tuvieron éxito al aislar una prometedora cepa de microorganismo para el desarrollo de un agente antifúngico. El análisis de la secuencia de base del ribosoma 16S ha revelado que la cepa de microorganismo es actinomyces del género *Streptomyces*. Además, han aislado con éxito y purificado un compuesto que muestra actividad de un medio de cultivo del microorganismo. El compuesto tenía un pequeño peso molecular, baja reactividad con suero, y una fuerte acción antifúngica. Como resultado de análisis estructurales, además, se encontró que el compuesto tiene un núcleo madre, y que es prometedor como un compuesto semilla para el desarrollo de un medicamento. Los presentes inventores realizaron más estudios basados en estos hallazgos y completaron la presente invención.

50

Por consiguiente, la presente invención es como se describe a continuación.

[1] Un compuesto representado por la siguiente fórmula:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

5 [2] un compuesto que muestra los siguientes espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN medidos usando metanol deuterado como disolvente de medida:

Tabla 1

	C ppm	H ppm	
1	47,8	3,22, 3,48	CH <sub>2</sub>
2	28,8	1,22, 1,68	CH <sub>2</sub>
3	62,5	3,80	CH
4	36,5	2,00, 2,35	CH <sub>2</sub>
5	84,7		C
6	139,3		C
7	33,1	3,43, 3,54	CH <sub>2</sub>
8	140,9		C
9	129,7	7,19	CH
10	129,3	7,24	CH
11	127,0	7,14	CH
12	129,3	7,24	CH
13	129,7	7,19	CH
14	126,3	5,91	CH
15	13,7	1,69	CH <sub>3</sub>
16		4,59	OH

o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

10 [3] Un medicamento o pesticida que comprende el compuesto del anteriormente mencionado [1] o [2], o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

[4] El medicamento o pesticida del anteriormente mencionado [3], fue es un agente antifúngico.

[5] El medicamento o pesticida del anteriormente mencionado [4], que tiene como objetivo un hongo del género seleccionado del grupo que consiste en el género *Candida* y el género *Aspergillus*.

5 [6] Un método de producción del compuesto del anteriormente mencionado [1] o [2] o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, que comprende cultivar una bacteria del género *Streptomyces* con el No. de acceso NITE BP-01677 o una de sus variantes en un medio que contiene una fuente de carbono para producir el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptable en el medio, y recuperar el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptable del cultivo.

[7] Una bacteria del género *Streptomyces* con el No. de acceso NITE BP-01677.

La presente descripción también proporciona lo siguiente.

10 [8] Un método para la profilaxis o tratamiento de micosis en un mamífero, que comprende administrar una cantidad efectiva del compuesto del anteriormente mencionado [1] o [2], o una de sus sales farmacéuticamente aceptable al mamífero que lo necesite.

La presente invención también proporciona lo siguiente:

15 [9] Un método para controlar una enfermedad de la planta, que comprende tratar el cultivo objetivo y/o una semilla del cultivo objetivo con una cantidad efectiva del compuesto del anteriormente mencionado [1] o [2] o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

[10] El compuesto del anteriormente mencionado [1] o [2] o una de sus sales farmacéuticamente aceptable para uso para la profilaxis o el tratamiento de micosis en un mamífero.

#### Efecto de la invención

20 Dado que el compuesto de la presente invención tiene un peso molecular pequeño, baja reactividad con suero y una fuerte acción antifúngica, es útil como agente antifúngico. Además, dado que el compuesto de la presente invención tiene un núcleo madre, es prometedor como un compuesto semilla para el desarrollo de un medicamento. La presente invención también proporciona un método de producción del compuesto de la presente invención.

#### Breve descripción de los dibujos

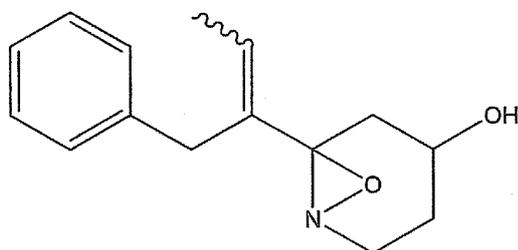
25 La Fig. 1 muestra los resultados del análisis de RMN del compuesto de la presente invención.

La Fig. 2 muestra los resultados (MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )) del ensayo de sensibilidad del agente antifúngico, en el que KKRM es el compuesto de la presente invención, MCFG es Micafungina, AMPH es anfotericina B, 5-FC es flucitosina, FLCZ es fluconazol, ITCZ itraconazol, VRCZ es Voriconazol y MCZ es miconazol.

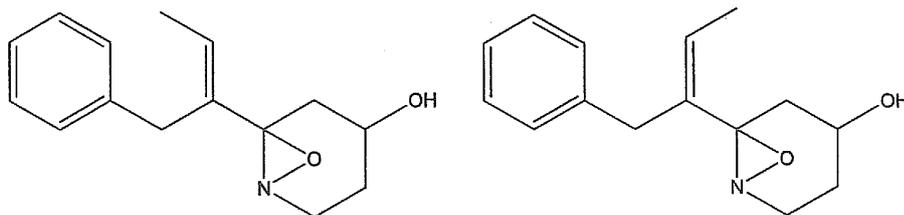
#### Descripción de realizaciones

30 La presente invención se explica en detalle a continuación.

La presente invención proporciona un compuesto representado por la siguiente fórmula:



35 o una de sus sales farmacéuticamente aceptable (de aquí en adelante, estas se van a denominar genéricamente el compuesto de la presente invención). Aunque el compuesto de la presente invención pueden contener uno o más tipos de isómeros tales como un isómero óptico basado en un átomo de carbono asimétrico, un isómero geométrico basado en un doble enlace y similares, todos estos isómeros y sus mezclas están incluidos en el alcance de la presente invención. En la fórmula mencionada anteriormente, una línea ondulada adyacente al doble enlace pretende incluir ambos de los siguientes dos tipos de isómeros geométricos.



Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y sales con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y similares.

El compuesto de la presente invención se pueden producir usando una bacteria del género *Streptomyces* aislada por los presentes inventores de la arena de mar en Kakeroma Island, Kagoshima Prefecture (de aquí en adelante se denominará también bacteria de la presente invención) o una de sus variantes. La bacteria se depositó en el National Institute of Technology and Evaluación (NITE) Patent Microorganisms Depositary, Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba 2-5-8, Japón (No. de acceso: NITE P-1677, fecha de depósito: 1 de agosto de 2013), se presentó una solicitud de transferencia de NITE P-01677 al depósito basado en el Tratado de Budapest, y la petición se recibió el 30 de julio de 2014 (fecha de la transferencia), y la bacteria está depositada internacionalmente con el No. de acceso: NITE BP-01677.

La bacteria tiene una hifa aérea de un color grisáceo, y una cadena de esporas con una forma helicoidal más corta. El colorante soluble produce un pigmento amarillento. El color de la parte trasera es de color crema a amarillo pálido. Las esporas maduras forman una masa de esporas.

La variante es una cepa derivada de la bacteria de la presente invención, y no está particularmente limitada con tal de que pueda producir el compuesto de la presente invención. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del gen rARN 16S de la variante es la misma que la secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S de la bacteria de la presente invención (es decir, 100% idéntica) o sustancialmente la misma (por ejemplo, cuando se producen por mutación en presencia de una sustancia mutagénica y similares, como se menciona a continuación). La variante también muestra características morfológicas, fisiológicas similares a las de la bacteria de la presente invención.

Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, una secuencia de nucleótidos "sustancialmente igual que la secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S de la bacteria de la presente invención" quiere decir que la secuencia de nucleótidos a comparar tiene por lo menos 99%, preferentemente no menos de 99,1%, más preferentemente no menos de 99,2%, adicional y preferentemente no menos de alrededor de 99,5% de identidad de la secuencia de nucleótidos. La identidad de la secuencia de nucleótidos se puede determinar mediante un método conocido per se, por ejemplo, calculado usando el algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) en las siguientes condiciones (esperanza = 10; hueco permitido; filtrado = ON; valor de coincidencia = 1; valor de discordancia = -3).

La variante se puede producir, por ejemplo, por una operación de modificación de la bacteria de la presente invención. Los ejemplos de la operación de modificación incluyen mutación en presencia de una sustancia mutagénica y similares, introducción de un gen capaz de aumentar la utilidad de la bacteria de la presente invención (por ejemplo, gen que aumenta la producibilidad del compuesto de la presente invención), y destrucción del gen llevada a cabo por la bacteria de la presente invención, y una combinación de estas operaciones y similares.

La bacteria de la presente invención o una de sus variantes se puede mantener y cultivar por cultivo en un medio de nutrición que contiene una fuente de carbono. Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen sacáridos (por ejemplo, monosacáridos tales como glucosa, galactosa y similares, disacáridos tales como sacarosa y similares, polisacáridos tales como almidón y similares), glicerol y similares, preferentemente almidón. El medio de nutrición también contiene preferentemente una fuente de nitrógeno, y los ejemplos de la fuente de nitrógeno incluyen casitona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta y similares. La adición de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  al medio puede promover la producción temprana del compuesto de la presente invención. Además, el medio contiene preferentemente agua de mar, y su concentración es de alrededor de 10% -40% de la concentración de agua de mar general (es decir, agua de mar artificial 38,4 g/l). Por lo tanto, la concentración de agua de mar artificial del medio es, por ejemplo, 0,384 g/l - 38,4 g/l, preferentemente 1,92 g/l - 13,04 g/l, más preferentemente 3,84 g/l - 15,36 g/l. Los ejemplos del contenido de sal incluyen cloruro de sodio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, sulfato de calcio, cloruro de potasio y similares. Una composición ejemplar del medio puede ser 4% de almidón, 0,4% de extracto de carne, 0,45 de casitona, 0,1% de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , y puede ser un medio líquido con 10% de la concentración de agua de mar general. Otras condiciones de cultivo son: agitar el cultivo a pH 6,8 - 7,5 (por ejemplo, 7,0), 25 - 35°C (por ejemplo, 28°C).

El compuesto de la presente invención se puede producir en un caldo de cultivo obtenido cultivando la bacteria de la presente invención o una de sus variantes en las condiciones de cultivo antes mencionadas durante, por ejemplo, 2 -

14 días. El compuesto de la presente invención se puede recuperar del cultivo, y preferentemente aislar y purificar. El aislamiento y la purificación se pueden realizar por un método bien conocido en el campo técnico. Por ejemplo, se pueden usar concentración, extracción, cromatografía, reprecipitación, recristalización y similares.

5 Como se muestra en los Ejemplos mencionados a continuación, el compuesto de la presente invención tiene una fuerte actividad antifúngica contra una amplia gama de hongos. Por lo tanto, el compuesto de la presente invención es útil como, por ejemplo, un agente antifúngico. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un agente antifúngico que contiene el compuesto de la presente invención como un ingrediente activo (de aquí en adelante denominado también el agente antifúngico de la presente invención). El agente antifúngico de la presente invención se puede usar como un medicamento o pesticida.

10 Los ejemplos de los hongos objetivo del agente antifúngico de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, hongos tales como el género *Candida* (por ejemplo, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida quilliermondii*, *Candida lusitaniae* etc.), el género *Aspergillus* (por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* etc.), el género *Trichophyton* (por ejemplo, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *M. canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton verrucosum* etc.) y similares. La micosis no está particularmente limitada, y se pueden mencionar la micosis profunda de la piel, micosis profunda, micetoma, y fungemia.

20 Cuando el agente antifúngico de la presente invención se usa como pesticida, el cultivo objetivo no está particularmente limitado y, por ejemplo, se pueden mencionar plantas tales como cereales (por ejemplo, arroz, cebada, trigo, centeno, avena, maíz, kaoliang, etc.), legumbres (soja, judía adzuki, haba, guisantes, cacahuete, etc.), frutas de árboles frutales (manzana, cítricos, pera, uva, melocotón, ume (ciruela japonesa), cereza, nuez, almendra, plátano, fresa, etc.), verduras (repollo, tomate, espinacas, brécol, lechuga, cebolla, cebolleta, pimienta, etc.), hortalizas de raíz (zanahoria, patata, batata, rábano, raíz de loto, nabo, etc.), cultivos para procesado (algodón, cáñamo, kozo (morera para papel), planta mitsumata, semilla de colza, remolacha, lúpulo, caña de azúcar, remolacha azucarera, aceituna, caucho, café, tabaco, té, etc.), calabazas (calabaza, pepino, sandía, melón, etc.), hierbas (pasto ovillo, sorgo, hierba timotea, trébol, alfalfa, etc.), césped (césped de Corea, agrostis etc.), cultivos para sabor (lavanda, romero, tomillo, perejil, pimienta, jengibre, etc.), plantas con flores (crisantemo, rosa, orquídea, etc.) y similares. El agente antifúngico de la presente invención se puede usar para controlar las enfermedades relacionadas con los hongos mencionados anteriormente en los cultivos, tratando el cultivo objetivo y/o semilla del cultivo objetivo con una cantidad efectiva del mismo.

30 El pesticida se puede usar de la forma siguiente, y se usa generalmente junto con un adyuvante usado convencionalmente en los campos farmacéuticos. El compuesto de la presente invención se formula por un método conocido en, por ejemplo, disolución patrón de emulsión, pasta pulverizable, disolución pulverizable o diluible, emulsión diluible, agente humectable, polvo soluble en agua, polvo, gránulos, pesticida fluido, pesticida fluido seco, agente antihumedad, fumigante y, por ejemplo, cápsula hecha de una sustancia polimérica.

35 Como aditivo y vehículo cuando el objetivo es un agente sólido, se puede usar polvo derivado de plantas tal como harina de soja, harina de trigo y similares, polvo mineral fino, tal como tierra de diatomeas, apatita, yeso, talco, bentonita, arcilla y similares, y compuestos orgánicos e inorgánicos tales como benzoato de sodio, urea, torta de sal y similares.

40 Cuando se desea una forma de dosificación líquida, se usan como disolventes hidrocarburos aromáticos tales como aceite vegetal, aceite mineral, queroseno, xileno y tolueno, amidas tales como formamida y dimetilformamida, sulfóxidos tales como sulfóxido de dimetilo, cetonas tales como metilisobutilcetona y acetona, tricloroetileno, agua y similares. Para conseguir estas preparaciones en una forma estable y uniforme, se puede añadir también un agente tensioactivo cuando se considere necesario. El agente humectable, emulsión, disolución acuosa, pesticida fluido, y pesticida fluido seco obtenidos de este modo se diluyen con agua hasta una concentración dada y se usan en forma de una suspensión o emulsión, y se usan polvos y gránulos por pulverización directamente sobre el suelo o planta.

45 El contenido y la dosificación del ingrediente activo en un pesticida que contiene el compuesto de la presente invención se pueden modificar en un amplio intervalo dependiendo de la forma de dosificación, del tipo de hongos a ser el objetivo de la aplicación, cultivo objetivo y similares.

50 Por otra parte, cuando se usa el agente antifúngico de la presente invención como un medicamento, se puede administrar a un objetivo de tratamiento, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, ser humano, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, oveja, mono, etc.) por una vía de administración oral o parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, inyección intramuscular, administración subcutánea, administración rectal, administración transdérmica).

55 Cuando el agente antifúngico de la presente invención se administra transdérmicamente, puede contener, además del anteriormente mencionado ingrediente activo, base aceitosa, emulsionante y estabilizador de la emulsión, agentes solubilizantes, componente en polvo, componente polimérico, mejorador de adherencia, agente formador de película, ajuste de pH, antioxidante, agente antiséptico, conservante, agente de retención de la forma, hidratante, protector de la piel, alfeaciante, sabor, colorante, agente de quelación, lubricante, promotor de la circulación

sanguínea, astringente, promotor de la reparación de tejidos, adiaforético, componente de extracción de plantas, componente de extracción de animales, agente antiinflamatorio, agente antiprurítico y similares según sea necesario. Como estos aditivos, se pueden usar aquellos generalmente usados para preparaciones.

5 El agente antifúngico de la presente invención se puede usar formulando los anteriormente mencionados componentes distintos del ingrediente activo y similares en fármacos externos tales como crema, líquido, loción, emulsión, tintura, pomada, gel acuoso, gel aceitoso, aerosol, polvo, champú, jabón, agente de esmalte para la aplicación a la uña y similares, mediante un método convencionalmente usado en el campo de las preparaciones farmacéuticas.

10 Cuando el agente antifúngico de la presente invención se administra por oralmente, se puede preparar en una forma de dosificación apropiada para administración oral tal como cápsula, comprimido, gránulo, polvo, píldora, gránulos finos, trocisco y similares. Estas preparaciones se pueden producir usando aditivos usados generalmente para las preparaciones orales, tales como excipiente, carga, aglomerante, agente humectante, disgregante, tensioactivo, lubricante, agente dispersante, agente tampón, conservante, agente solubilizante, agente antiséptico, agente aromatizante, agente calmante, estabilizante y similares por un método convencional.

15 La presente invención se explica en más detalle a continuación por referencia a los Ejemplos.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento y análisis de la cepa *Streptomyces* sp. A84

20 Una fuente de separación se recogió de arena de mar de Kakeroma Island, Kagoshima Prefecture. La cepa se aisló de la muestra recogida, y la cepa del microorganismo aislado se aplicó para el examen de evaluación usando la actividad antifúngica como índice. Como resultado, se obtuvo una cepa prometedora, que se examinó adicionalmente cuidadosamente.

25 La cepa se analizó mediante el método de clasificación filogenética de rARN 16S para encontrar que el microorganismo producido es actinomicetes del género *Streptomyces* y las especies relacionadas son *Streptomyces nodosus* (98,8% de homología) y *Streptomyces glomeratus* (99,0% de homología). La homología de la secuencia base con la más relacionada *Streptomyces glomeratus* era 99,0%, lo que sugiere la posibilidad de una nueva especie. Esta cepa se denominó cepa de *Streptomyces* sp. A84. La cepa *Streptomyces* sp. A84 se depositó en el National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Patent Microorganisms Depositary, Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba 2-5-8, Japón (No. de acceso: P-01677, fecha de depósito: 1 Agosto, 2013), se presentó una solicitud de transferencia de NITE P-01677 al depósito basado en el Tratado de Budapest, y la solicitud se recibió el 30 de julio, 2014 (fecha de la transferencia), y la bacteria está depositada internacionalmente con el No. de acceso: NITE BP-01677.

30

Ejemplo 2: Estudio de medio de producción para la cepa A84.

Se estudió un medio de producción para la cepa A84.

Como resultado del estudio del medio, el siguiente medio mostró buena productividad.

35 Composición del medio:

4% de almidón

0,1% de casitona

0,1% de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

40 0,0384% de agua de mar artificial (MARINE ART SUPER FORMULA 1, fabricada por Tomita Pharmaceutical Co., Ltd.)

pH 7,0.

En condiciones de cultivo, el medio (100 ml) se cargó en un matraz Erlenmeyer de 300 ml y la cepa se cultivó a 28°C, 200 rpm durante 2-4 días.

Ejemplo 3: Separación, purificación y análisis del ingrediente activo.

45 La cepa A84 se inoculó a un medio (100 ml) que tiene la composición descrita en el Ejemplo 2 en un matraz Erlenmeyer de 300 ml, y se cultivó a 28°C, 200 rpm (agitador rotatorio) durante 3 días. El disolvente se extrajo del medio de cultivo usando una cantidad igual de acetato de etilo, y el acetato de etilo se evaporó. La muestra seca se disolvió en una pequeña cantidad de metanol y se separó por cromatografía en columna (HPLC) usando una columna ODS (pureza no inferior a 95%, 100 µg / 1 l).

50 Se realizaron análisis de LC/MS, análisis de RMN y medida de rotación óptica del ingrediente activo. Las

condiciones de medida eran como se describe a continuación.

LC/MS:

aparato: Agilent modelo número 6540:

fuelle de iones: AJS-ESI, ESI, APC1

5 RMN:

aparato: ECA-600 (fabricado por JEOL Ltd.)

imán: SCM 14.01T

diámetro del orificio: 54 mm

sonda: 3 mm, 5 mm, 10 mm

10 disolvente de medida: metanol deuterado

rotación óptica:

polarímetro: P-1030 (fabricado por JASCO Corporation)

disolvente: metanol (para HPLC)

concentración de la muestra: 4 mg/ml

15 Temperatura: 28

celda: 3,5 mm X 10,0 mmΦ , celda de vidrio cilíndrica (mod. CG3-10)

λ: 589 nm

20 Como resultado, se determinó que la fórmula molecular era  $C_{15}H_{19}NO_2$ , y el peso molecular era 245,1416, y se determinó que el espectro de RMN era como se muestra en la FIG. 1. La rotación óptica específica era -3,25000 grados (media), y la rotación óptica era -0,0013 grados (media).

Ejemplo experimental 1: medida de la actividad antifúngica

Se midió la concentración inhibidora mínima (MIC) mediante el método de dilución del líquido de trazas. La medida se realizó usando hongos de tipo levadura FP 'Eiken' (Eiken Chemical Co., Ltd.) y según el manual del producto.

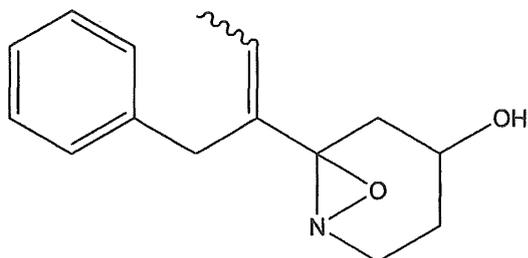
25 La MIC (µg/ml) de diversos medicamentos para cada especie se muestra en la Fig. 2. El ingrediente activo de la presente invención mostró buena actividad en *Candida* spp. y *Aspergillus* spp.

### Aplicabilidad industrial

30 Dado que el compuesto de la presente invención tiene un peso molecular pequeño, baja reactividad con suero, y una fuerte acción antifúngica, es útil como agente antifúngico. Además, dado que el compuesto de la presente invención tiene un núcleo madre, es prometedor como compuesto de siembra para el desarrollo de un medicamento. La presente invención también proporciona un método de producción del compuesto de la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula:



- 5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

2. Un compuesto según la reivindicación 1 que muestra los siguientes espectros  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN medidos usando metanol deuterado como disolvente de medida:

	C ppm	H ppm	
1	47.8	3.22, 3.48	CH <sub>2</sub>
2	28.8	1.22, 1.68	CH <sub>2</sub>
3	62.5	3.80	CH
4	36.5	2.00, 2.35	CH <sub>2</sub>
5	84.7		C
6	139.3		C
7	33.1	3.43, 3.54	CH <sub>2</sub>
8	140.9		C
9	129.7	7.19	CH
10	129.3	7.24	CH
11	127.0	7.14	CH
12	129.3	7.24	CH
13	129.7	7.19	CH
14	126.3	5.91	CH
15	13.7	1.69	CH <sub>3</sub>
16		4.59	OH

- o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

- 10 3. Un medicamento o pesticida que comprende el compuesto según la reivindicación 1 o 2, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.
4. El medicamento o pesticida según la reivindicación 3, que es un agente antifúngico.
5. El medicamento o pesticida según la reivindicación 4, que tiene como objetivo un hongo del género seleccionado del grupo que consiste en el género *Candida* y el género *Aspergillus*.
- 15 6. Un método de producción del compuesto según la reivindicación 1 o 2 o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, que comprende cultivar una bacteria del género *Streptomyces* con No. de acceso NITE BP-01677 o una de sus variantes en un medio que contiene una fuente de carbono para producir el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptable en el medio, y recuperar el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptable del cultivo.
- 20 7. Una bacteria del género *Streptomyces* con No. de acceso NITE BP-01677.

Fig.1

	C ppm	H ppm	
1	47.8	3.22, 3.48	CH <sub>2</sub>
2	28.8	1.22, 1.68	CH <sub>2</sub>
3	62.5	3.80	CH
4	36.5	2.00, 2.35	CH <sub>2</sub>
5	84.7		C
6	139.3		C
7	33.1	3.43, 3.54	CH <sub>2</sub>
8	140.9		C
9	129.7	7.19	CH
10	129.3	7.24	CH
11	127.0	7.14	CH
12	129.3	7.24	CH
13	129.7	7.19	CH
14	126.3	5.91	CH
15	13.7	1.69	CH <sub>3</sub>
16		4.59	OH

Fig. 2

	nombre de la cepa		KKRM	MCEG	AMPH	5-FC	FLCZ	ITCZ	VRCZ	MCZ	tiempo de cultivo
1	<i>Candida albicans</i>	ATCC24433	0,5	≤0,015	1	0,25	0,25	≤0,015	≤0,015	≤0,03	24 h
2	<i>Candida albicans</i>	ATCC90028	0,125	≤0,015	0,25	≤0,125	≤0,125	≤0,015	≤0,015	≤0,03	24 h
3	<i>Candida albicans</i>	ATCC90029	0,125	≤0,015	0,125	>64	0,25	≤0,015	≤0,015	≤0,03	24 h
4	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC22019	0,015	0,5	0,25	≤0,125	0,25	≤0,015	≤0,015	0,06	24 h
5	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC90018	0,5	≤0,015	0,125	≤0,125	0,5	≤0,015	≤0,015	≤0,03	24 h
6	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC750	>8	≤0,015	0,25	≤0,125	1	0,06	0,03	0,5	24 h
7	<i>Candida krusei</i>	ATCC6258	0,125	0,06	0,5	4	32	1	0,25	1	24 h
8	<i>Candida glabrata</i>	ATCC90030	1	0,03	0,5	≤0,125	8	1	0,25	0,125	24 h
9	<i>Candida guilliermondii</i>	aislado clinico	0,5	1	0,25	1	4	0,25	0,06	0,25	24 h
10	<i>Candida lusitanae</i>	aislado clinico	0,5	0,125	1	0,25	0,25	0,06	≤0,015	0,06	24 h
11	<i>Aspergillus fumigatus</i>	aislado clinico	2	≤0,015	1	64	>64	0,125	0,25	0,5	48 h
12	<i>Aspergillus flavus</i>	aislado clinico	4	≤0,015	1	4	32	0,125	0,25	2	48 h
13	<i>Aspergillus niger</i>	aislado clinico	8	≤0,015	0,5	0,5	>64	0,25	0,125	1	48 h
14	<i>Aspergillus terreus</i>	aislado clinico	0,25	≤0,015	0,5	0,25	16	≤0,015	0,03	0,06	48 h