

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 529**

51 Int. Cl.:

C07D 493/08 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)
C12P 17/08 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2010** **PCT/NZ2010/000249**
87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011** **WO11071396**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2010** **E 10836262 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** **EP 2509984**

54 Título: **Compuestos fungicidas y métodos para su uso**

30 Prioridad:

09.12.2009 NZ 58184609
16.04.2010 NZ 58469410

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2018

73 Titular/es:

AUCKLAND UNISERVICES LIMITED (100.0%)
Level 10 70 Symonds Street
Auckland, NZ

72 Inventor/es:

VILLAS-BOAS, SILAS GRANATO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 692 529 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

Compuestos fungicidas y métodos para su uso

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos antifúngicos, un compuesto antifúngico extraído a partir de *Epicoccum purpurascens*, también conocido como *Epicoccum nigrum*. La invención también se refiere a métodos para producir los compuestos antifúngicos, aislados y composiciones que comprenden los compuestos antifúngicos y a métodos para usar los compuestos antifúngicos, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes

Los fungicidas sintéticos han sido usados como la herramienta principal para reprimir una infección fúngica en cultivos en crecimiento y recolectados. Se ha estimado que se usan más de 23 millones de kilogramos de estos fungicidas sintéticos anualmente en todo el mundo y se considera que la producción y comercialización de frutas y verduras no sería posible sin su uso (Tripathi and Dubey 2004).

El uso de estos productos químicos ha aumentado la preocupación de los consumidores y su uso se está haciendo cada vez más restringido debido a problemas de toxicidad y contaminación medioambiental. Por tanto, hay un creciente interés en encontrar alternativas útiles a los fungicidas químicos que sean seguras y con un riesgo insignificante para la salud humana y el medio ambiente.

Entre estas estrategias, los productos naturales con actividad antifúngica son atractivos porque son fácilmente biodegradables y por lo tanto, podrían ser menos tóxicos para el medio ambiente y los consumidores.

La publicación de Shu *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1997, vol. 7, nº 17, págs. 2295-2298 describe orevactaeno, un oxopolieno aislado a partir de *Epicoccum nigrum* WC47880.

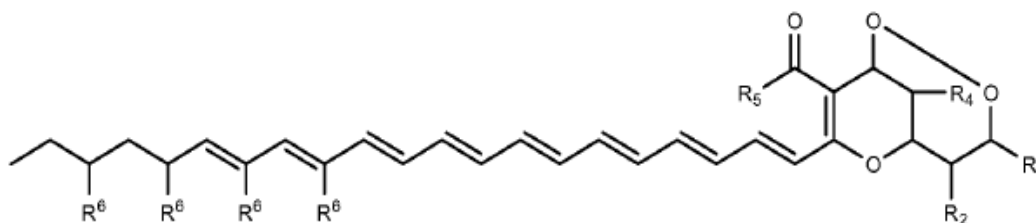
La publicación de Brown *et al.*, Soil Biol. Biochem., 1987, vol. 19, nº 6, págs. 657-664, describe compuestos antifúngicos producidos por medio de *Epicoccum purpurascens*.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un compuesto antifúngico mejorado o alternativo o al menos proporcionar al público una elección útil.

Sumario de la invención

Consecuentemente, un primer aspecto de la invención proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* depositada en la entidad National Measurement Institute, Australia (NMI) bajo el número de acceso V10/000331, depositado el 18 de marzo de 2010, o un exudado obtenido a partir del mismo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto aislado o sustancialmente puro de fórmula (IIIA) o una sal, solvato o hidrato del mismo.



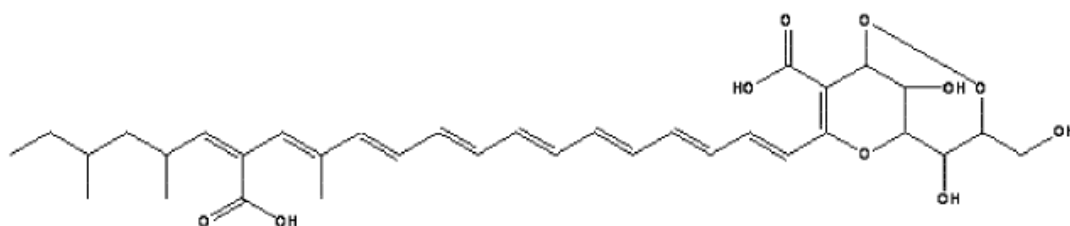
(IIIA)

en la cual

R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, metoxi e hidroxilo; y

en que cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, metoxi, hidroxilo y carboxilo.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto aislado o sustancialmente puro de fórmula (IV)



(IV)

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un aislado obtenido que puede ser obtenido de *Epicoccum purpurascens* que comprende al menos aproximadamente 1 a 99% en peso de un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal del mismo.

- 5 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende (a) un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal, solvato o hidrato del mismo, o (b) un aislado obtenido o que puede ser obtenido a partir de *Epicoccum purpurascens* que comprende al menos aproximadamente 1 a 99% en peso de un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal del mismo, o (c) la cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* depositada en la entidad National Measurement Institute, Australia (NMI) bajo el número de acceso V10/000331 o un exudado del mismo, y un portador aceptable en agricultura o farmacia.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un cultivo o exudado del primer aspecto, un compuesto de uno cualquiera del segundo y tercer aspecto, un aislado del cuarto aspecto, o una composición del quinto aspecto para su uso en un método para tratar o prevenir una infección fúngica filamentosa en un sujeto animal que lo necesite.

- 15 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una infección fúngica filamentosa que comprende la aplicación de

(a) un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal, solvato o hidrato del mismo; o

(b) un aislado obtenido o que puede ser obtenido a partir de *Epicoccum purpurascens* que comprende al menos aproximadamente 1 a 99% en peso de un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal del mismo;

- 20 (c) una composición que comprende un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal, solvato o hidrato del mismo o un aislado obtenido o que puede ser obtenido de *Epicoccum purpurascens* que comprende al menos aproximadamente 1 a 99% en peso del mismo o una sal del mismo y un portador aceptable en agricultura o farmacia; o

- 25 (d) una composición que comprende la cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* depositada en la entidad National Measurement Institute, Australia (NMI) bajo el número de acceso V10/000331 o un exudado de la misma, y un portador aceptable en agricultura o farmacia;

a una superficie diana que lo necesita, en el que dicho método no es un método de tratamiento de un cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

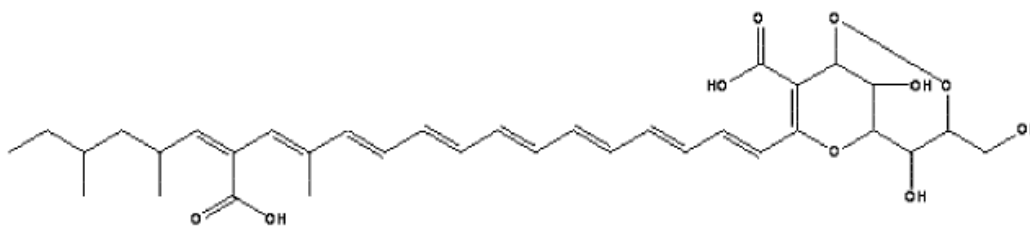
- 30 En algunas realizaciones del método del séptimo aspecto, la composición de (d) es formulada mezclando y/o triturando la cepa de *Epicoccum purpurascens* o un exudado de la misma con el portador aceptable en agricultura o farmacia.

En algunas realizaciones, la composición del apartado (d) es un polvo.

En algunas realizaciones, la composición del apartado (d) es formulada en forma de un polvo humectable, polvo soluble, polvo fino, gránulo o gránulo dispersable en agua.

- 35 En algunas realizaciones, el portador aceptable en agricultura o farmacia es talco.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un compuesto de fórmula (IV) o una sal del mismo



(IV)

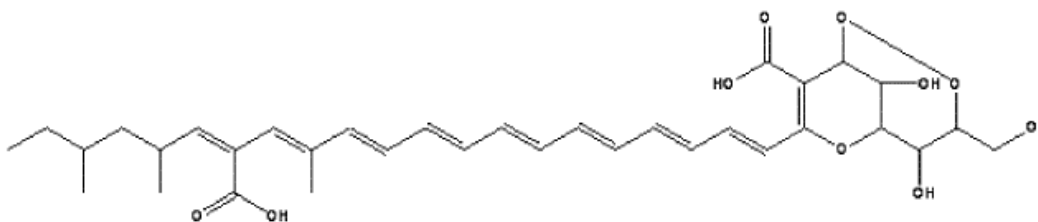
comprendiendo el método

(a) cultivar un organismo del género *Epicoccum*, preferiblemente *Epicoccum purpurascens* en un medio de cultivo para producir el compuesto de fórmula (IV) o una sal del mismo, y

5 (b) opcionalmente extraer el compuesto de fórmula (IV) o una sal del mismo del medio de cultivo.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto sorprendentemente que el *Epicoccum purpurascens* (también conocido como *Epicoccum nigrum*) produce un compuesto antifúngico que tiene la siguiente fórmula y que el compuesto es capaz de tratar o prevenir infecciones mediante hongos filamentosos.



(IV)

10

1. Definiciones

La expresión "aceptable en agricultura" está previsto que incluya cualquier material, como un portador, que puede ser usado en agricultura y que preferentemente ayuda a la aplicación de un compuesto o composición de la invención a la superficie diana prevista o que ayuda al almacenamiento, transporte o manejo. Los portadores aceptables en agricultura usados en composiciones para la aplicación a plantas y materiales de plantas son preferentemente no fitotóxicos o solo levemente fitotóxicos. Un portador adecuado puede ser un sólido, líquido o gas dependiendo de la formulación deseada. En una realización preferida, los portadores incluyen portadores líquidos polares que incluyen, pero sin limitación, agua, alcohol, aceite mineral y aceite vegetal. Las sales aceptables en agricultura incluyen las que mantienen sustancialmente la actividad deseada de un compuesto de la invención al mismo tiempo que son también aceptables para ser usadas en agricultura y preferentemente, que son no fitotóxicas o solo levemente fitotóxicas.

El término "alqueno" significa un radical hidrocarbonado que tiene al menos un enlace doble que incluye, pero sin limitación, etenilo, propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo y similares.

El término "alcoxi" significa un grupo O-alquilo en el que "alquilo" es como se define en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, metoxi, etoxi y similares.

El término "alquilo" significa una cadena lineal o ramificada, un radical hidrocarbonado no cíclico o cíclico, que puede ser completamente saturado, mono- o poliinsaturado que incluye radicales di- y multivalentes, y puede tener el número de átomos de carbono indicado (para ejemplo, C₁-C₁₀ significa de uno a diez átomos de carbono). Ejemplos de alquilos de cadena lineal saturados incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares. Ejemplos de alquilos de cadena ramificada saturados incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo y similares. Alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o triples. Ejemplos de grupos alquilos de cadena lineal insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. El

término "alquilo", salvo que se establezca otra cosa, está previsto que incluya también los derivados de alquilo definidos más es detalle a continuación como "alquenilo", "alquinilo", "cicloalquilo" y "alquileno".

Los términos "alquilamino" y "dialquilamino" significan un grupo alquilo o dos grupos alquilo, respectivamente, unidos a través de un puente de nitrógeno (por ejemplo, -N-alquilo) como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino y similares.

El término "alquilcarbonilalquilo" significa un alquilo sustituido con un grupo alquilo -C(=O).

El término "alquilcarboniloxialquilo" significa un alquilo sustituido con un grupo alquilo -C(=O)O-alquilo o un grupo alquilo-CO(=O)alquilo.

El término "alquiloxialquilo" significa un alquilo sustituido con un grupo -O-alquilo.

10 El término "alquileno" significa un radical divalente de un alcano, como por ejemplo -CH₂CH₂CH₂CH₂-. Normalmente, un grupo alquileno tendrá de 1 a 24 átomos de carbono.

El término "alquilsulfonilo" significa un grupo alquilo unido a través de un puente de sulfonilo (es decir, -SO₂-alquilo) como metilsulfonilo, etilsulfonilo y similares.

15 El término "alquilsulfínilo" significa un grupo alquilo unido a través de un puente de sulfínilo (es decir, -S(O)-alquilo) como metilsulfínilo, etilsulfínilo, propilsulfínilo, butilsulfínilo y similares.

El término "alquiltioalquilo" significa un alquilo sustituido con un grupo -S-alquilo.

El término "alquinilo" significa un radical hidrocarbonado que tiene al menos un enlace triple que incluye, pero sin limitación, etinilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo y similares.

20 El término "antifúngico" significa una capacidad para antagonizar uno o más hongos evitando o reprimiendo una infección fúngica como se describe con posterioridad. Consecuentemente, un agente antifúngico, como un compuesto, aislado o composición antifúngica, es un agente que es un antagonista de uno o más hongos. Este agente se considera en la presente memoria descriptiva que tiene actividad antifúngica.

25 La expresión "que comprende", como se usa en memoria descriptiva, significa "que consiste al menos en parte en". Cuando se interpreta cada afirmación en esta memoria descriptiva que incluye la expresión "que comprende", pueden estar presentes también características distintas las previstas por el término. Los términos relacionados como "comprenden" y "comprende" se interpretan también de la misma manera.

El término "cicloalquilo" significa una versión cíclica de "alquilo", e incluye anillos di- y polihomocíclicos como decalina y adamantano. Ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptenilo y similares.

30 Los términos "halo" o "halógeno" significan un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Adicionalmente, términos como "fluoroalquilo" está previsto que incluyan monofluoroalquilo y polifluoroalquilo.

El término "haloalquilo" significa un grupo alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno sustituido con un halógeno, por ejemplo, trifluorometilo y similares.

35 El término "inferior" significa un grupo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, "alquilo inferior", "alquenilo inferior", "alquinilo inferior", "alquileno inferior" y "alcoxi inferior" significan un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno o alcoxi que tiene 1 a 8 átomos de carbono.

El término "hidroxialquilo" significa un alquilo sustituido con al menos un grupo hidroxilo.

El término "mono- o di(alquil)aminoalquilo" significa un alquilo sustituido con un mono- o di(alquil)amino.

40 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a vehículos, diluyentes, excipientes, compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación y similares, que están dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para ser usados en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, humanos) sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, compatible con una relación de riesgo/beneficio razonable. Cada vehículo, diluyente, excipiente y similares debe ser también "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación.

45 El término "planta" significa plantas completas e incluye las partes de las plantas, esquejes, así como productos de plantas que incluyen raíces, hojas, flores, semillas, tallos, callos, nueces y frutas, bulbos, tubérculos, cormos, granos, esquejes, patrón o injertos e incluye cualquier material de la planta ya sea antes de la plantación, durante el crecimiento y después de la recolección. Las plantas que se pueden aprovechar de la aplicación de la presente invención abarcan una amplia gama de cultivos agrícolas y hortícolas. Los compuestos, aislados y composiciones de

la invención son adecuados también para una aplicación en sistemas de producción orgánica.

Una "cepa que tiene las características identificadoras de [una cepa específica]", que incluye un homólogo o mutante de la cepa especificada, está estrechamente relacionada (es decir, comparte un ancestro común) o deriva de la cepa especificada, pero habitualmente difiere de la cepa especificada en una o más características genotípicas o fenotípicas. Los mutantes son generalmente identificables a través de la valoración de las diferencias genéticas. Los homólogos son identificables a través de la valoración del grado de diferencia genética, bioquímica y morfológica y el uso de métodos taxonómicos, incluidos, por ejemplo, análisis filogenéticos. Sin embargo, una cepa que tiene las características identificadoras de [una cepa específica], que incluye un homólogo o mutante de la cepa especificada, retendrá la eficacia antifúngica, será distinguible de otras cepas bacterianas y será identificable como un homólogo o mutante de la cepa parental usando las técnicas anteriormente descritas.

El término "sustituido" como se usa en la presente memoria descriptiva con referencia a cualquiera de los grupos definidos en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, alquilo, etc.) significa un grupo o compuesto en el que al menos un átomo de hidrógeno ha sido sustituido con un sustituyente químico. En el caso de un sustituyente ceto $-(C=O)-$ han sido sustituidos dos átomos de hidrógeno.

El término "sustituyente" incluye, pero sin limitación, halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, alquilo, alcoxi, alquiltio, haloalquilo, $-NR_aR_b$, $-NR_aC(=O)R_b$, $-NR_aC(=O)NR_aR_b$, $-NR_aC(=O)OR_b$, $-NR_aSO_2R_b$, $-OR_a$, $-C(=O)R_a$, $-C(=O)OR_a$, $-C(=O)NR_aR_b$, $-OC(=O)NR_aR_b$, $-SH$, $-SR_a$, $-SOR_a$, $-S(=O)_2R_a$, $-OS(=O)_2R_a$, $-S(=O)_2OR_a$, en donde R_a y R_b son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, o alquilo sustituido.

El término "sujeto" pretende incluir cualquier superficie de animal o diana que necesite el tratamiento o prevención de infección fúngica o la contaminación fúngica. Los sujetos animales incluyen mamíferos, particularmente seres humanos, animales de ganado como vacas, ovejas, cerdos y cabras, y animales de compañía como caballos, perros y gatos.

El término "contornos", cuando se usa en referencia con un sujeto de planta incluye el terreno, agua, residuos de hojas o medios de crecimiento adyacentes o alrededor de la planta o las raíces, tubérculos o similares de la misma, plantas contiguas, esquejes de dicha planta, soportes, agua que va a ser administrada a la planta y revestimientos que incluyen revestimientos de semillas. Incluye adicionalmente materiales en almacenamiento, de envase o tratamiento, como revestimientos protectores, cajas y envolturas e instalaciones de plantación, mantenimiento o recolección.

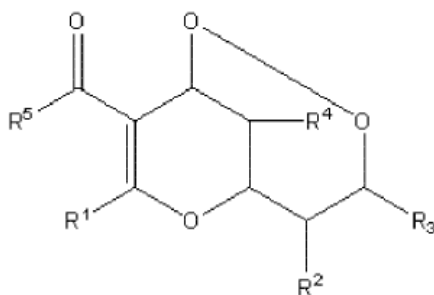
La expresión "superficie diana", a la que puede ser aplicada un compuesto o composición de la invención, incluye, pero sin limitación, plantas o contornos de plantas, material de plantas que incluye, pero sin limitación, raíces, bulbos, tubérculos, cormos, hojas y flores, semillas, tallos, callos, frutos secos, granos, frutas, esquejes, patrones, injertos, cultivos recolectados que incluyen, pero sin limitación, raíces, bulbos, tubérculos, cormos, hojas, flores, semillas, tallos, callos, frutos secos, granos, fruta, esquejes, patrones, injertos o cualquier superficie que pueda estar en contacto con los cultivos recolectados que incluyen, pero sin limitación, una instalación, envasado o instalación de recolección y un material de envasado.

La expresión "tratar o prevenir una infección fúngica" está previsto que incluya la prevención o represión de una infección fúngica y "represión" está previsto que signifique al menos mantener, preferentemente mantener o reducir, y, más preferentemente, reducir el grado de infección de cualquier agente patógeno fúngico que incluye, pero sin limitación, los agentes patógenos citados en la presente memoria descriptiva. En una realización, "reprimir una infección fúngica" significa que el compuesto, aislado o composición es capaz de erradicar sustancialmente una infección fúngica existente.

El término "tioalquilo" significa un grupo alquilo unido a través de un puente de azufre (es decir, $-S-$ alquilo) como metiltio, etiltio y similares.

2. Compuestos que se pueden obtener a partir de *Epicoccum purpurascens*

Los inventores creen que los compuestos que están estructuralmente relacionados con el compuesto de fórmula (IV) es probable que tengan una actividad antifúngica similar, que incluye una actividad antifúngica contra hongos filamentosos, que incluyen hongos que son fitopatógenos o agentes patógenos de animales. Consecuentemente, la descripción se refiere a un compuesto de Fórmula (I) o una sal, solvato o hidrato del mismo.



(I)

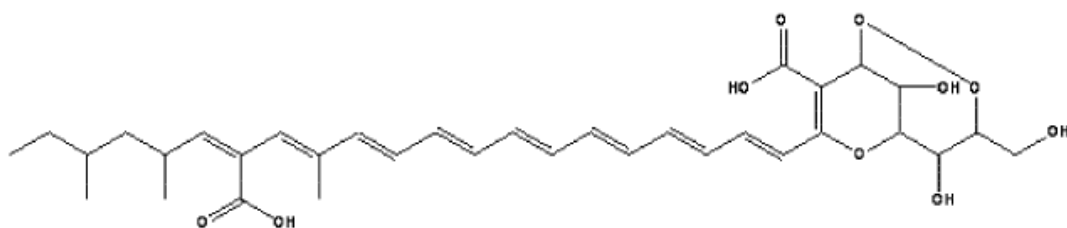
en la cual

R¹ es hidrógeno o un grupo alquilo de C₁ a C₃₀ que comprende opcionalmente uno o más enlaces dobles, que comprende opcionalmente uno o más enlaces triples y opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados entre hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, alquilo, alcoxi, alquiltio, haloalquilo, -NR_aR_b, -NR_aC(=O)R_b, -NR_aC(=O)NR_aR_b, -NR_aC(=O)OR_b, -NR_aSO₂R_b, -OR_a, -C(=O)R_a, -C(=O)OR_a, -C(=O)NR_aR_b, -OC(=O)NR_aR_b, -SH, -SR_a, -SOR_a, -S(=O)₂R_a, -OS(=O)₂R_a, -S(=O)₂OR_a, en donde R_a y R_b son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que comprende hidrógeno, halógeno, hidroxilo, halógeno, alquilo, haloalquilo, tioalquilo y alquilo sustituido; y

R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, haloalquilo, haloalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, -NR_aR_b, -NR_aC(=O)R_b, -NR_aC(=O)NR_aR_b, -NR_aC(=O)OR_b, -NR_aSO₂R_b, OR_a, -C(=O)R_a, -C(=O)OR_a, -C(=O)NR_aR_b, -OC(=O)NR_aR_b, -SH, -SR_a, -SOR_a, -S(=O)₂R_a, -OS(=O)₂R_a, -S(=O)₂OR_a, en que R_a y R_b son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, tioalquilo y alquilo sustituido.

La descripción se refiere a compuestos de fórmula (II) y (III), y la invención se refiere a compuestos de fórmula (IIIA) descritos anteriormente.

En una realización, el compuesto de la invención es el compuesto de fórmula (IV).



(IV)

Debe entenderse que puede existir un cierto compuesto en una o más formas particulares geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereómeras, epímeras, estereoisómeras, tautómeras, conformacionales o anómeras, que incluyen, pero sin limitación, formas cis y trans, formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D- y L-; formas (+) y (-); formas cetónicas, enólicas y enolato; formas α y β; formas axiales y ecuatoriales; formas de barco, silla, torcedura, sobre y semisilla; y sus combinaciones, denominados colectivamente en lo que sigue como "isómeros" (o "formas isómeras").

Algunos compuestos de fórmula (I) a (IV) tienen al menos un átomo de carbono asimétrico y por lo tanto, todos los isómeros, incluidos los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros y racematos de los compuestos se considera que son parte de esta invención. La invención incluye los isómeros D y L en forma pura y en mezcla, incluidas mezclas racémicas. Los isómeros pueden ser preparados usando técnicas convencionales, haciendo reaccionar materiales de partida ópticamente puros o ópticamente enriquecidos o separando los isómeros de un compuesto de la invención. Los isómeros pueden incluir también isómeros geométricos, por ejemplo, cuando está presente un doble enlace.

Debe apreciarse que, excepto como se expone con posterioridad para las formas tautómeras, específicamente

excluidas del término "isómeros", como se usa en la presente memoria descriptiva, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre átomos en lugar de meramente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, $-\text{OCH}_3$, no se interpreta como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir formas estructuralmente isómeras que caen dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo C_{1-7} incluye n-propilo e isopropilo; butilo incluye n-, iso-, sec-, y terc-butilo).

La exclusión anterior no se refiere a formas tautómeras, por ejemplo, formas cetónicas, enólicas y enolato como, por ejemplo, los siguientes pares tautómeros: ceto/enol, imina/enamina, alcohol amido/imino, nitroso/oxima amidina/amidina, tiocetona/enetiolo, N-nitroso/hidroxiazolo y nitro/aci-nitro.

Debe apreciarse que están específicamente incluidos en el término "isómero" los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular incluye todas estas formas isómeras, que incluyen sus mezclas racémicas u otras. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y la separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de estas formas isómeras son bien conocidas en la técnica o son fácilmente obtenidas adaptando de los métodos expuestos en la presente memoria descriptiva de una manera conocida.

Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular incluye también formas iónicas, de sales, solvatos, hidratos y protegidas del compuesto.

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, $-\text{NH}-$ puede ser $-\text{NH}_3^+$), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso. Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, aniones de los siguientes ácidos orgánicos: acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico y valérico.

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar o manejar un correspondiente solvato del compuesto activo. El término "solvato" se usa en la presente memoria descriptiva en el sentido convencional para hacer referencia a un complejo o soluto (por ejemplo, compuesto activo o sal de compuesto activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede ser convenientemente denominado un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar o manejar el compuesto activo en una forma químicamente protegida. La expresión "forma químicamente protegida", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un compuesto en el que uno o más grupos funcionales reactivos están protegidos de reacciones químicas no deseadas, es decir, están en la forma de un grupo protegido o protector (también conocido como grupo enmascarado o enmascarante). Protegiendo un grupo funcional reactivo, se pueden realizar reacciones que implican otros grupos funcionales reactivos no protegidos, sin afectar al grupo protegido; el grupo protector puede ser separado, habitualmente en una etapa posterior, sin afectar sustancialmente al resto de la molécula. Véase, por ejemplo, la publicación *Protective Groups in Organic Synthesis* (T. Green and P. Wuts, Wiley, 1991).

3. Aislamiento de compuestos de fórmula (IV) a partir de *Epicoccum purpurascens*

El compuesto de fórmula (IV) puede ser aislado a partir de *Epicoccum purpurascens* (también conocido como *Epicoccum nigrum*) cultivando el organismo y seguidamente extrayendo los compuestos hasta el grado de pureza deseado.

Consecuentemente, en una realización, el compuesto de fórmula (I) a (IV) es obtenido o puede ser obtenido a partir de un organismo del género *Epicoccum*. En otra realización, el compuesto de fórmula (I) a (IV) es obtenido o puede ser obtenido a partir de *Epicoccum purpurascens*. En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) a (IV) es obtenido o puede ser obtenido a partir de las cepas SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* (V10/000331), ICMP2048, ICMP2931, ICMP10458, ICMP10459, ICMP10460, ICMP11503, ICMP15700, ICMP15816 o ICMP16305. Como se muestra en ejemplo siguientes, cada una de estas cepas produce el compuesto de fórmula (IV). La cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* está depositada bajo el número de acceso V10/000331 en la entidad National Measurement Institute, Australia, depositada el 18 de marzo de 2010. Las cepas de ICMP están disponibles en la entidad International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP) administrada por Landcare Research, Nueva Zelanda (véase http://nzfungi.landcareresearch.co.nz/icmp/search_cultures.asp - último acceso de 23 de noviembre de 2009). Las cepas de *Epicoccum purpurascens* están disponibles también en la entidad American Type Culture Collection (ATCC), incluidas, pero sin limitación, las cepas. ATCC 10999, ATCC 32948, ATCC 34417, ATCC 34547, ATCC 34929, ATCC 44336, ATCC 46473, ATCC 46878, ATCC 46880, ATCC 46881, ATCC 58875, ATCC 62191, y ATCC 66091. Estas cepas anteriormente expuestas pueden ser usadas también en los métodos para cultivar

organismos del género *Epicoccum* descritos en la presente memoria descriptiva.

El compuesto de fórmula (IV) puede ser aislado a partir de *Epicoccum purpurascens* cultivando el organismo bajo condiciones sumergidas en biorreactores industriales conocidos en la técnica y extrayendo seguidamente los compuestos hasta el grado de pureza deseado usando centrifugación o filtración con membrana, o ambos, para separar sólidos suspendidos, biomasa, esporas fúngicas y proteínas solubles (como enzimas). Alternativamente, el compuesto de fórmula (IV) puede ser aislado a partir de *Epicoccum purpurascens* cultivando el organismo en un sustrato sólido usando técnicas de fermentación sólida conocidas en la técnica y extrayendo seguidamente con un disolvente adecuado para el medio ambiente y no tóxico (incluido, pero sin limitación, metanol, etanol, acetato de etilo, por ejemplo) y extrayendo adicionalmente hasta el grado de pureza deseado mediante centrifugación o filtración con membrana, o ambos, para separar sólidos en suspensión, biomasa, esporas fúngicas y proteínas solubles (como enzimas). En ambas alternativas, el producto de centrifugación o el filtrado pueden ser adicionalmente purificados, si es necesario, mediante cromatografía de columna usando sílice ácida o cualquier otra matriz sólida polar apropiada. Otras alternativas conocidas adecuadas para aislar los compuestos serán evidentes para los expertos en la técnica.

Los inventores han encontrado que los compuestos de fórmula (IV) pueden producirse de forma útil cultivando un organismo del género *Epicoccum* en un medio de cultivo que comprende nitrato, proteína o histidina (datos no mostrados). Consecuentemente, en una realización, el medio de cultivo comprende una fuente de nitrato, una fuente de proteína, una fuente de histidina, una fuente de proteína que comprende histidina o cualquier combinación de dos cualquiera o más de los mismos. Ejemplos de fuentes útiles de nitrato incluyen, pero sin limitación, sales de nitrato, cualquier fuente aceptable en agricultura o farmacia de nitrato, nitrato de sodio, nitrato de magnesio, nitrato de potasio y nitrato de calcio, o cualquier combinación de dos o más de los mismos y otras fuentes de nitratos útiles serán evidentes para los expertos en la técnica. Ejemplo de fuentes útiles de proteínas incluyen, pero sin limitación, peptona, extracto de levadura y extracto de patata, o cualquier combinación de dos cualesquiera o más de las mismas, y otras fuentes de proteínas útiles serán evidentes para los expertos en la técnica. Ejemplos de fuentes útiles de histidina incluyen, pero sin limitación, histidina en forma de aminoácido libre y dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos o polipéptidos que comprenden histidina, o cualquier combinación de dos cualesquiera de los mismos y otras fuentes de histidina útiles serán evidentes para los expertos en la técnica.

4. Agentes patógenos agrícolas dianas

Los compuestos aislados y composiciones de la invención son útiles para tratar o prevenir infecciones provocadas por hongos filamentosos. En una realización, el hongo comprende un hongo filamentoso y la infección fúngica comprende una infección fúngica filamentosa.

En una realización, el hongo es de la familia *Gnomoniaceae* (por ejemplo, *Apiognomonina supraseptata*), *Cortiaceae* (por ejemplo, *Rhizoctonia solani*), *Magnaportheaceae* (por ejemplo, *Magnaporthe grisea*), *Mycosphaerellaceae*, *Pleosporaceae* (por ejemplo, *Alternaciones*), (por ejemplo, *Botrytis cinerea* o *Sclerotinia sclerotiorum*), *Typhulaceae* (por ejemplo, *Sclerotium cepivorum*), *Valsaceae* (por ejemplo, *Phomopsis viticola*) o *Venturiaceae* (por ejemplo, *Venturia inaequalis*).

En otra forma de realización, el hongo es del género *Apiognomonina* (por ejemplo, *Apiognomonina supraseptata*), *Alternaria* (por ejemplo, *Alternaria alternata*), *Botrytis* (por ejemplo, *Botrytis cinerea*), *Botryotinia*, *Magnaporthe* (por ejemplo, *Magnaporthe grisea*) (por ejemplo, *Phomopsis viticola*), *Rhizoctonia* (por ejemplo, *Rhizoctonia solani*), *Sclerotinia* (por ejemplo, *Sclerotinia sclerotiorum*), *Sclerotium* (por ejemplo, *Sclerotium cepivorum*), o *Venturiaceae* (por ejemplo, *Venturia inaequalis*).

Todavía, en otra realización, el hongo es *Apiognomonina supraseptata*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Botryotiniasspp.*, *Magnaporthe grisea*, *Phomopsis viticola*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* o *Ventaria inaequalis*.

Las especies de las familias y géneros anteriores son responsables de muchas enfermedades de plantas agrícolas. Por ejemplo, *Botrytis cinera* es responsable de tizón de las floraciones y podredumbre de las frutas y el *Rhizoctonia Solani* es responsable de "tallo de alambre". Otras especies de las familias y géneros citados son responsables de enfermedades como la "enfermedad de picaduras", la "tizón del raigras" y la "tizón del sur".

Otras infecciones fúngicas que pueden ser tratadas o prevenidas usando los compuestos, aislados, composiciones y métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, antracnosis (por ejemplo, antracnosis del roble), cancro (por ejemplo, cancro del tallo de tomate), enfermedad de manchas anulares (por ejemplo, enfermedad de manchas anulares de la pera), tizón y lesiones de verduras (por ejemplo, tizón de la hoja del perejil), podredumbre de frutas (por ejemplo, podredumbre gris y podredumbre noble de las uvas), enfermedad de perforación o enfermedad de brillos (por ejemplo, cuello podrido del arroz, tizón de semilla de arroz, perforación del arroz, mancha hoja oval de gramíneas, enfermedad de picaduras, tizón de raigras y mancha de Johnson), mancha de la caña y las hojas (por ejemplo, mancha de hojas y granos de uva), marchitamiento fúngico (por ejemplo, muerte de semillas en agricultura), tallo de alambre (por ejemplo, enfermedad del repollo, coliflor y plantas relacionadas), moho blanco (por ejemplo, moho blanco en granos de soja y granos secos comestibles), marchitez o putrefacción de tallos (por

ejemplo, putrefacción de vapor en la colza), tizón del sur (tizón del trigo y el tomate) y lesiones de costras (por ejemplo, sarna del manzano).

Debe entenderse que los hongos filamentosos son fácilmente identificables como tales por los expertos en la técnica y que los compuestos, aislados, composiciones y métodos de la invención son igualmente útiles para tratar o prevenir infecciones fúngicas provocadas por otros hongos filamentosos. Igualmente, los compuestos, aislados y composiciones de la invención pueden ser valorados en cuanto a la actividad contra cualquier especie fúngica según los métodos descritos en los ejemplos con posterioridad.

5. Agentes patógenos de animales dianas

En otras realizaciones, el hongo comprende un hongo filamentoso que es un agente patógeno de animales y la infección fúngica comprende una infección fúngica filamentosa de animales.

En una realización, el hongo es de la familia *Dothioraceae* (por ejemplo, *Hortaea werneckii*, syn. *Phaeoannellomyces werneckii*), *Trichosporonaceae* (por ejemplo, *Trichosporon beigeli*), *Piedraiaceae* (por ejemplo, *Piedraia hortae*) *Arthrodermataceae* (por ejemplo, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* o *Epidermophyton floccosum*), *Sphaeropsidaceae* (por ejemplo, *Scytalidium dimidiatum*, syn. *Hendersonula toruloidea* o *Scytalidium hyalinum*), o *Microascaceae* (por ejemplo, *Scopulariopsis brevicaulis*).

En una realización, el hongo es del género *Hortaea* (por ejemplo, *Hortaea werneckii*, syn. *Phaeoannellomyces werneckii*), *Trichosporon* (por ejemplo, *Trichosporon beigeli*, *Piedraia*, por ejemplo, *Piedraia hortae*), por ejemplo, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum* (por ejemplo, *Microsporum gypseum*), *Epidermophyton* (por ejemplo, *Epidermophyton floccosum*), *Hendersonula* (por ejemplo, *Hendersonula toruloidea*), *Scytalidium* (por ejemplo, *Scytalidium hyalinum*), o *Scopulariopsis* (por ejemplo, *Scopulariopsis brevicaulis*).

Debe entenderse que los compuestos, aislados y composiciones de la invención pueden ser valorados en cuanto a la actividad contra cualquier especie fúngica que sea patógena para animales, particularmente seres humanos, según los métodos descritos en los ejemplos con posterioridad.

6. Composiciones agrícolas de la invención.

Las composiciones útiles en la presente invención incluyen cualquier composición aceptable en agricultura o farmacia que pueda llevar un compuesto de fórmula (I) a (IV) o una sal, solvato o hidrato del mismo, o un aislado de la invención, así como composiciones adecuadas para mantener la viabilidad de SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* o una cepa que tenga las características identificadoras de SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens*. Las composiciones de la invención, en diversas realizaciones, son pulverizables y pueden ser pulverizadas sobre un sujeto que lo necesite, o ser formuladas como un concentrado que es pulverizable por adición de portadores aceptables en agricultura y/o adyuvantes de pulverización. Las composiciones de la presente invención pueden ser también sólidas, como un polvo, que es colocado sobre la superficie diana. Las composiciones preferidas de la invención son estables en almacenamiento. La expresión "estable en almacenamiento" está previsto que indique que una composición de la invención no se separa en fases separadas, ni desarrolla olores desagradables y/o desarrolla un crecimiento microbiano.

Las composiciones de la invención pueden ser formuladas como, por ejemplo, en forma de concentrados, soluciones, pulverizadores, aerosoles, baños de inmersión, aderezos, emulsiones, polvos humectables, polvos solubles, concentrados en suspensión, polvos finos, gránulos, gránulos dispersables en agua, microcápsulas, pastas, geles y otros tipos de formulaciones mediante procedimientos bien establecidos. Estos procedimientos incluyen mezclar y/o triturar los ingredientes activos con materias portadoras aceptables en agricultura, como materiales de carga, solventes, excipientes, tensioactivos, agentes suspensores, esparcidores/adhesivos (adhesivos), agentes antiespumantes, dispersantes, agentes humectantes, agentes reductores de la fluidez, materias auxiliares y adyuvantes. Dependiendo del formato escogido, las composiciones pueden ser formuladas para métodos de aplicación como inyección, frotamiento o cepillado, como es conocido en la técnica. Las aplicaciones indirectas de la composición a los contornos o el entorno de la planta como el terreno, agua o como revestimientos de semillas son potencialmente posibles.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender adicionalmente componentes como portadores líquidos o sólidos, aglutinantes, materiales de carga y otros aditivos adecuados en agricultura o farmacia.

En una realización, los portadores aceptables en agricultura se pueden seleccionar entre el grupo que comprende materiales de carga, disolventes, excipientes, tensioactivos, agentes suspensores, esparcidores/adhesivos (adhesivos), agentes antiespumantes, dispersantes, agentes humectantes, agentes reductores de la fluidez, materias auxiliares, adyuvantes o una mezcla de los mismos.

En una realización, los portadores sólidos incluyen, pero sin limitación, tierras minerales como ácidos silícicos, geles de sílice, silicatos, talco, caolín, arcilla de atapulgita, piedra caliza, cal, tiza, bole, loess, arcilla, dolomita, tierra de diatomeas, alúminas, sulfato de calcio, sulfato de magnesio, óxido de magnesio, plásticos triturados, fertilizantes como sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio y ureas y productos vegetales como sémolas de

cereales, cortezas de corcho, serrín y harina de cáscaras de nuez, polvos celulósicos y similares. Como portadores sólidos para los gránulos son adecuados los siguientes: rocas naturales trituradas o fraccionadas, como calcita, mármol, piedra pómez, sepiolita y dolomita; gránulos sintéticos de harinas trituradas u orgánicas; gránulos de materiales orgánicos como serrín, cortezas de coco, mazorcas de maíz, hojas de maíz o tallos de tabaco; tierra infusoria, fosfato de tricalcio, corcho en polvo o negro de carbón absorbente; polímeros, resinas y ceras solubles en agua o fertilizantes sólidos. Estas composiciones sólidas pueden contener, si se desea, uno o más agentes humectantes, dispersantes, emulsionantes o colorantes compatibles que, cuando son sólidos, también pueden servir como un diluyente.

En una realización, el portador puede ser también líquido, por ejemplo, agua; soluciones de azúcares; alcoholes, particularmente butanol o glicol así como sus éteres o ésteres, particularmente acetato de metilglicol; cetonas, particularmente acetona, ciclohexanona, metiletilcetona, metilisobutilcetona o isoforona; fracciones del petróleo como hidrocarburos parafínicos o aromáticos, particularmente xilenos o alquil-naftalenos; aceites minerales o vegetales; hidrocarburos clorados alifáticos, particularmente tricloroetano o cloruro de metileno; hidrocarburos clorados aromáticos, particularmente clorobenzenos; disolventes solubles en agua o fuertemente polares, como dimetilformamida, dimetilsulfóxido o N-metilpirrolidona; gases licuados; o similares o una mezcla de los mismos.

En una realización, los tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos y/o tensioactivos anfóteros y favorecen la capacidad de los agregados a permanecer en solución durante la pulverización.

Los esparcidores y adhesivos favorecen la capacidad de las composiciones de la invención a adherirse a las superficies de plantas. Ejemplos de tensioactivos, esparcidores y adhesivos incluyen, pero sin limitación, Tween y Triton (Rhom and Hass Company), Fortune®, Pulse, C. Daxoil, aceite Codacide®, talco D-C, aceite Supamet, Bond®, Penetrant, Glowelt® y Freeway, sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos y amonio de ácidos sulfónicos aromáticos, por ejemplo, ácido lignosulfónico, ácido fenolsulfónico, ácido naftalenosulfónico y ácido dibutilnaftalenosulfónico y de ácidos grasos, sulfonatos de alquilo y alquilarilo y sulfatos de alquilo, lauril-éter y alcoholes grasos y sales de hexadecanoles, heptadecanoles y octadecanoles sulfatados, sales de alcohol graso-glicol éteres, productos de condensación de naftaleno sulfonado y derivados de naftaleno con formaldehído, productos de condensación de naftaleno o ácidos naftalenosulfónicos con fenol y formaldehído, polioxietileno-octilfenol-éteres, isoocitilfenol etoxilado, octilfenoletoxilado y nonilfenol etoxilado, alquilfenol-poliglicol-éteres, tributilfenil-poliglicol-éteres, alquilaril-poliéter-alcoholes, alcohol isotridecílico, condensados de alcohol graso y óxido de etileno, aceite de ricino etoxilado, polioxietileno-alquil-éteres, polioxipropileno etoxilado, alcohol laurílico-poliglicol-éter-acetal, ésteres de sorbitol, líquidos residuales de sulfato de lignina-sulfito y metilcelulosa.

Los agentes humectantes reducen la tensión superficial del agua en la composición y por lo tanto, aumentan el área superficial sobre la que puede ser aplicada una cantidad dada de la composición. Ejemplo de agentes humectantes incluyen, pero sin limitación, sales de poli(ácidos acrílicos), sales de ácidos lignosulfónicos, sales de ácidos fenolsulfónicos o naftalenosulfónicos, policondensados de óxido de etileno con alcoholes grasos o ácidos grasos o ésteres grasos o aminas grasas, fenoles sustituidos (particularmente alquilfenoles o arilfenoles), sales de ésteres de ácidos sulfosuccínicos, derivados de taurina (particularmente alquil-tauratos), ésteres fosfóricos de alcoholes o de policondensados de óxido de etileno con fenoles, ésteres de ácidos grasos con polioles o derivados funcionales de sulfatos, sulfonatos o fosfonatos de los compuestos anteriores.

En una realización, el método preferido para aplicar el compuesto o la composición de la invención es pulverizar o diluir una solución concentrada mediante pistola o aire comprimido comercial.

Se puede incluir también un portador que proporcione una liberación lenta o retardada de un compuesto de la invención en una composición de la invención.

Las composiciones de la presente invención se pueden usar solas o en combinación con uno o más de agentes agrícolas, que incluyen plaquicidas, insecticidas, acaricidas, fungicidas adicionales, bactericidas, herbicidas, antibióticos, antimicrobianos, nematocidas, rodenticidas, entomopatógenos, feromonas, productos atrayentes, reguladores del crecimiento de plantas, hormonas de plantas, reguladores del crecimiento de insectos, quimioesterilizantes, agentes para reprimir plagas microbianas, repelentes, virus, fagoestimulantes, nutrientes de plantas, fertilizantes de plantas y reguladores biológicos. Cuando se usan en combinación con otros agentes agrícolas, la administración de los dos agentes puede ser separada, simultánea o secuencial. Ejemplos específicos de estos agentes agrícolas son conocidos por los expertos en la técnica, y muchos están fácilmente disponibles en el comercio.

Ejemplos de nutrientes de plantas incluyen, pero sin limitación, nitrógeno, magnesio, calcio, boro, potasio, cobre, hierro, fósforo, manganeso, molibdeno, cobalto, boro, cobre, silicio, selenio, níquel, aluminio, cromo y zinc.

Ejemplos de antibióticos incluyen, pero sin limitación, oxitetraciclina y estreptomicina.

Ejemplos de fungicidas incluyen, pero sin limitación, las siguientes clases de fungicidas: carboxamidas, bencimidazoles, triazoles, hidroxipiridinas, dicarboxamidas, fenilamidas, tiadiazoles, carbamatos, ciano-oximas, derivados de ácido cinámico, morfolin, imidazoles, beta-metoxi-acrilatos y piridinas/pirimidinas.

Ejemplos adicionales de fungicidas incluyen, pero sin limitación, fungicidas naturales, fungicidas orgánicos, fungicidas basado en azufre, fungicidas de cobre/calcio y activadores de las defensas de hospedantes de plantas.

Ejemplo de fungicidas naturales incluyen, pero sin limitación, leche entera, suero lácteo, ácidos grasos o ácidos grasos esterificados.

- 5 Ejemplo de fungicidas orgánicos incluyen, pero sin limitación, cualquier fungicida que supere una norma de certificación orgánica, como agentes de biocontrol, productos naturales, activadores (algunos de ellos también pueden clasificarse como productos naturales) y fungicidas de azufre y cobre (limitados a un uso restringido). Un ejemplo de fungicida basado en azufre es Kumulus® DF (BASF, Alemania). Un ejemplo de fungicida de cobre es Kocide® 2000 DF (Griffin Corporation, EE.UU.). Ejemplos de activadores incluyen, pero sin limitación, quitosano, Bion®, BABA (ácido DL-3-amino-n-butanoico, ácido β-aminobutírico) y Milsana® (Western Farm Service, Inc., EE.UU.).

- 15 En algunas realizaciones se pueden emplear fungicidas no orgánicos. Ejemplos de fungicidas no orgánicos incluyen, pero sin limitación, Bravo® (para la represión de PM en cucurbitáceas); Supershield® (Yates, Nueva Zelanda) (para la represión de botritis y PM en rosas); Topas® 200EW (para la represión de PM en uvas y cucurbitáceas); Flint® (para la represión de PM en manzanas y cucurbitáceas); Amistar® WG (para la represión de la podredumbre y PM en cereales); y Captan®, Dithane®, Euparen®, Rovral®, Scala®, Shirlan®, Switch® y Teldor® (para la represión de botritis en uvas).

- 20 Ejemplos de pesticidas incluyen, pero sin limitación, azoxiestrobina, bitertanol, carboxina, Cu₂O, cimoxanilo, ciproconazol, ciprodinilo, diclofluamid, difenoconazol, diniconazol, epoxiconazol, fenpiclonilo, fludioxonilo, fluquiconazol, flusilazol, flutriafol, furalaxilo, guazatin, hexaconazol, himexazol, imazalilo, imibenconazol, ipconazol, cresoxim-metilo, mancozeb, metalaxilo, R-metalaxilo, metoconazolo, oxadixilo, pefurazoato, penconazol, pencicuron, procloraz, propiconazol, piroquilona, SSF-109, espiroxamina, tebuconazol, tiabendazol, tolfuamid, triazóxido, triadimefon, triadimenol, triflumizol, triticonazol y uniconazol.

- 25 Un ejemplo de un regulador biológico es el agente de regulación biológica BotryZen® que comprende *Ulocladium oudemansii*.

La confirmación de la capacidad de las composiciones de la invención para tratar el crecimiento fúngico puede ser obtenida inoculando un material de planta con un organismo diana y aplicando seguidamente un compuesto, aislado o composición de la invención. La eficacia se confirma mediante una reducción en el grado de crecimiento o la desaparición del organismo diana en comparación con un testigo sin tratar.

- 30 7. Composiciones terapéuticas de la invención.

- Una composición útil en la presente invención puede ser formulada como un alimento, bebida, aditivo alimenticio, aditivo para bebidas, complemento dietético, producto nutricional, alimento médico, producto de alimentación enteral o parenteral, sustitutivo de comidas, cosmeceútico, nutracéutico o farmacéutico o como un revestimiento u otro componente de un dispositivo médico. Las formulaciones apropiadas se pueden preparar por un trabajador especializado considerando los conocimientos especializados y enseñanzas de esta memoria descriptiva. Las composiciones útiles en la presente invención incluyen cualquier composición que sea capaz de portar un compuesto de fórmula (I) a (IV) o un aislado de la invención.

- 40 En una realización, la composición está en la forma de un polvo, un comprimido, una capsulilla, una píldora, una cápsula blanda o dura o una pastilla. En otra realización, la composición está en la forma de un sello, un polvo suministrable, gránulos, una suspensión, un elixir, un líquido, una bebida o cualquier otra forma que pueda ser añadida a un alimento o bebida que incluye, por ejemplo, agua o zumo de frutas. En una realización adicional, la composición es un producto enteral, un producto enteral sólido o un producto enteral líquido. Todavía en otra realización, la composición está en la forma de crema, ungüento, pasta, solución de gotas que incluye gotas oculares o gotas para los oídos, inhalador, composición inhalable, apósito, paño o pulverización.

- 45 Las composiciones útiles en la presente invención pueden ser formuladas para permitir la administración a un sujeto mediante cualquier vía elegida, que incluye, pero sin limitación, una administración oral o nasal (incluida por inhalación), vaginal, rectal o parenteral (incluida tópica, subcutánea, intramuscular e intravenosa). Los expertos en la materia apreciarán que la vía de administración a un sujeto normalmente tendrá en cuenta la finalidad para la que está siendo administrada la composición, por ejemplo, cuando una composición farmacéutica de la invención está siendo administrada para tratar una enfermedad o trastorno, la vía de administración se escogerá normalmente teniendo en cuenta la naturaleza de la enfermedad o trastorno. Consecuentemente, pueden ser formuladas composiciones ilustrativas para el tratamiento de infecciones de la piel o infecciones de membranas mucosas para una administración tópica.

- 55 En general, una administración oral, una composición dietética (un alimento, aditivo alimentario o complemento alimenticio, por ejemplo), nutracéutica o farmacéutica útil en la presente invención, puede ser formulada por un trabajador especializado según técnicas de formulación conocidas. Por tanto, una composición farmacéutica útil según la invención puede ser formulada con un vehículo apropiado farmacéuticamente aceptable (que incluye

excipientes, diluyentes, materias auxiliares y sus combinaciones) seleccionado considerando a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed., Mack Publishing Co., 1980.

Está contemplada la administración de un compuesto o composición de la invención mediante una primera vía de administración acompañada por una administración separada, simultánea o secuencial de uno o más agentes adicionales, incluidos uno o más de otros agentes antifúngicos, mediante la misma o una segunda vía de administración; por ejemplo, la administración oral o tópica de un compuesto o composición de la invención acompañada de administración oral o tópica de al menos un agente adicional.

También, los compuestos útiles en la presente invención pueden contener uno o más agentes adicionales en la medida necesaria, incluidos uno o más agentes antifúngicos adicionales o agentes emulsionantes, antioxidantes, para dar sabor o colorantes o tener un revestimiento entérico. Son conocidos revestimientos entéricos adecuados. Los revestimientos entéricos rodean los ingredientes activos y evitan la liberación de los ingredientes activos en el estómago, pero permiten su liberación después de que la forma de dosificación ha salido del estómago. Las composiciones útiles en la presente invención pueden estar adaptadas para una liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, por impulsos o controlada de un compuesto de la invención.

Las cápsulas pueden contener cualesquiera materiales farmacéuticamente aceptables estándar, como gelatina o celulosa. Los comprimidos pueden ser formulados de acuerdo con procedimientos convencionales comprimiendo mezclas de los ingredientes activos con un vehículo sólido y un lubricante. Ejemplos de vehículos sólidos incluyen almidón y bentonita de azúcar. Los ingredientes activos pueden ser administrados también en forma de comprimido o cápsula de envoltura dura que contiene un aglutinante, por ejemplo, lactosa o manitol, un material de carga convencional y un agente para formar comprimidos. Las formas de dosificación parenteral incluyen soluciones acuosas, solución salina isotónica o soluciones de glucosa que comprenden el ingrediente activo u otros vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos. Los agentes solubilizantes bien conocidos por los expertos en la técnica pueden ser usados como excipientes farmacéuticos. Las formas de dosificación inyectables pueden ser formuladas en forma de soluciones o suspensiones líquidas. Pueden ser preparadas también formas sólidas adecuadas para una solución o suspensión en un líquido antes de la inyección.

Pueden ser preparadas preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen los agentes antifúngicos deseados. Las matrices pueden estar en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplo de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (véase el documento US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable y copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide).

Las formulaciones tópicas pueden ser preparadas en forma de lociones, cremas, ungüentos, pastas o pomadas usando portadores conocidos para estas aplicaciones. Estas aplicaciones pueden ser administradas directamente, por ejemplo, aplicadas directamente a un sitio de infección, una herida, pulverizadas sobre un sitio quirúrgico, etc., o pueden ser aplicadas indirectamente, como mediante impregnación en una venda o apósito o pulverizadas sobre un la instalación quirúrgica, apósitos y similares.

En diversas realizaciones, el un agente adicional al menos único es un agente antifúngico, como un antifúngico de polieno, como natamicina, rimocidina, filipina, nistatina, anfotericina B, candicina; imidazoles, como miconazol, cetoconazol, clotrimazol, econazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol o tioconazol; triazoles, como fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol o terconazol; tiazoles como abafungina; alilaminas, como terbinafina, amorolfina, naftifina o butenafina; equinocandinas, como anidulafungina, caspofungina o micafungina; otros agentes antifúngicos como ácido benzoico, ciclopirox, tolnaftato, ácido undecilénico, flucitosina o 5-fluorocitosina, griseofulvina, haloprogina, bicarbonato de sodio, alicina, uno o más aceites esenciales, aceite de árbol de té, aceite de citronela, yodo, lomoncillo, hoja de olivo, aceite de naranja, aceite de palmarosa, pachulí, mirto limón, aceite de semilla de neem, aceite de coco, zinc o selenio.

La eficacia de una composición útil en la presente invención puede evaluarse tanto *in vitro* como *in vivo*. Véanse, por ejemplo, los ejemplos posteriores. Brevemente, en una realización, la composición puede ser ensayada en cuanto a su capacidad, por ejemplo, para inhibir el crecimiento fúngico *in vitro*. Para estudios *in vivo*, la composición puede ser administrada a un animal (por ejemplo, un ratón) y sus efectos sobre una infección fúngica, o son seguidamente valorados uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno fúngico. Basándose en los resultados, se puede determinar un intervalo de dosificación apropiado, frecuencia y vía de administración.

Debe entenderse que los agentes adicionales anteriormente citados también pueden ser empleados en un método de la invención cuando son administrados de forma separada, simultánea o secuencial con un compuesto, aislado o composición útil en la presente invención.

Como se apreciará, la dosis de la composición administrada, el período de administración y el régimen de administración general pueden diferir entre sujetos dependiendo de variables como la gravedad de los síntomas de un sujeto, el tipo de trastorno que va a ser tratado, el modo de administración escogido y la edad, el sexo y/o estado general de salud de un sujeto. Sin embargo, a modo de ejemplo general, se administran de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5.000 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 4.000 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 3.000 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2.000 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1.000 mg por kg de peso corporal o aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal de un compuesto útil en la presente invención, por administración o por día, preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.000 mg por kg, preferentemente por día. La administración puede incluir una dosis única, como una dosis diaria única, o la administración de un cierto número de dosis divididas discretas en la medida apropiada. Un experto en la técnica será capaz de determinar sin experimentación excesiva, teniendo en cuenta los conocimientos específicos y esta descripción, un régimen de dosificación eficaz (que incluye la dosis y los tiempos de la administración) para un estado dada.

Cuando se usa en combinación con un agente adicional, la administración de un compuesto útil en la presente invención y el otro agente puede ser separada, simultánea o secuencial. La administración simultánea incluye la administración de una forma de dosificación única que comprende todos los componentes o la administración de formas de dosificación separadas sustancialmente al mismo tiempo. La administración separada o secuencial incluye una administración según esquemas diferentes, preferentemente de forma que haya una solapación en los períodos durante los cuales se proporcionan la composición útil de la presente memoria descriptiva y otros agentes terapéuticos.

Adicionalmente, está contemplado que una composición de acuerdo con la invención pueda ser formulada con ingredientes activos adicionales que pueden ser beneficiosos para un sujeto en casos particulares. Por ejemplo, se pueden usar agentes terapéuticos que dirigen a diana aspectos o diferentes del procedimiento de la enfermedad.

Los compuestos o composiciones de la invención pueden ser incorporados en dispositivos médicos y suministros médicos. Los dispositivos o suministros médicos pueden estar revestidos o impregnados con composiciones de la invención mediante métodos conocidos.

Se ilustrarán seguidamente diversos aspectos de la invención en formas no limitativas mediante referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

1. Materiales y métodos.

(a) Cepas fúngicas

Se aisló una cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* en un entorno de laboratorio como un contaminante de otros cultivos. Se identificó basándose en sus características morfológicas, en su fuerte actividad antifúngica contra diferentes hongos filamentosos y en la secuencia de su 18S r ADN (región ITS) (datos no mostrados). El compuesto de fórmula (IV) se identificó y aisló a partir del exudado de esta cepa. Se obtuvieron otras cepas de *Epicoccum purpurascens* posteriormente y las ensayadas fueron ICMP1732, ICMP2048, ICMP2931, ICMP10458, ICMP10459, ICMP10460, ICMP11503, ICMP13352, ICMP15700, ICMP15816 e ICMP16305, todas disponibles en la entidad Landcare Research, Nueva Zelanda. La suspensión de esporas activas y micelios en cultivos inclinados de agar se mantuvieron conservadas en solución salina de glicerol a -80 °C.

El hongo fitopatógeno SVB-F2 de *Apiognomonina supraseptata* se aisló a partir de material vegetal y se identificó basado en la secuencia de su 18S r ADN (región ITS).

Los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* ICMP16621, *Sclerotinia sclerotiorum* ICMP13844, *Alternaria alternata* ICMP1099-96, *Phomopsis viticola* ICMP5537, *Mycosphaerella graminicola* ICMP12504-95, *Rhizoctonia solani* ICMP11620, *Magnaporthe grisea* ICMP14481, *Sclerotium cepivorum* ICMP10916-91, y *Venturia inaequalis* ICMP4095-96 se obtuvieron todos de la entidad Landcare Research, Nueva Zelanda.

(b) Cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* (V10/000331)

La cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* está en depósito bajo el número de acceso V10/000331 en la entidad National Measurement Institute, Australia, depositada el 18 de marzo de 2010. La *E. purpurascens* (syn. *E. nigrum*, Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomyceta; Pezizomycotina; Leotiomyceta; Dothideomyceta; Dothideomycetes; *Epicoccum*) es un hongo filamentosamente saprófito habitualmente aislado de tejidos vegetales senescentes y terreno. Crece lentamente para formar biomasa micelial blanca.

Morfología

La cepa SVB-F1 crece rápidamente y produce colonias lanosas a algodonosas o vellosas sobre agar de dextrosa de

patata a 25 °C. Desde la parte delantera, las colonias son de color amarillo a naranja, naranja a rojo o rosa inicialmente y se vuelven de color verdosas marrón a negro por envejecimiento. Desde el lado inverso, se observa el mismo color, pero habitualmente es más intenso que en la orientación delantera. El *Epicoccum* puede producir un pigmento difusible que cambia el color del medio inoculado a amarillo, naranja, rojo o marrón. Se pueden observar puntos negros (100-2.000 µm de diámetro) macroscópicamente sobre la superficie de la colonia. Estos son los mechones de hifas que tienen conidióforos sobre su superficie. Estos mechones de hifas tienen forma de almohadillas y no están envueltos y se denominan esporodocias.

Metabolismo

La cepa SVB-F1 crece en una amplia gama de sustratos y es capaz de crecer en un medio mineral mínimo con cualquier hidrato de carbono como fuente de carbono y amoníaco o nitrato como fuente de nitrógeno. La temperatura de crecimiento óptima es de 25 °C y el organismo puede tolerar un intervalo amplio de pH (3-10).

(c) Otros organismos

Se obtuvieron *Candida albicans* SC5614, *Candida utilis* 02/DO0981, *Saccharomyces cerevisiae* BM45, *Staphylococcus epidermis* SVB-B12, *Escherichia coli* SVB-B11 y *Seudomonas aeruginosa* SVB-B10 a partir de colecciones de cultivos mantenidas en la Universidad de Auckland, Auckland, Nueva Zelanda.

(d) Medios de crecimiento.

Se usaron los siguientes medios de cultivo basados en agar. Agar de extracto de levadura en solución de Czapek (CYA) que contiene por litro: sacarosa (30 g), nitrato de sodio (2 g), fosfato de dipotasio (1 g), sulfato de magnesio (0,5 g), cloruro de potasio (0,5 g), sulfato ferroso (0,01 g), extracto de levadura (6 g) y agar (15 g); pH 7,3. Agar de peptona-dextrosa en extracto de levadura (YPD) que contiene por litro: extracto de levadura (6 g), peptona (6 g), D-glucosa (10 g) y agar (15 g); pH 5,5. Agar de dextrosa (PDA) de patata que contiene por litro: suspensión de infusión procedente de patatas sin pelar troceadas (400 g) en ebullición durante 40 minutos en agua destilada, D-glucosa (10 g), agar (15 g); pH 5,5. Medio de agar mineral mínimo (MM) que contiene por litro: D-glucosa (10 g), sulfato de amonio (6 g), hidrógeno-fosfato de monopotasio (3 g), sulfato-heptahidrato de magnesio (0,5 g), vitaminas y elementos residuales según Verduyn *et al.*; pH 5,5/7,0.

(e) Condiciones de crecimiento.

La producción de pigmento antifúngico por la cepa SVB-F1 de *E. purpurascens* se ensayó sobre tres medios de cultivo complejos diferentes (CYA, YPD y PDA), así como sobre medio mineral mínimo (MM) a pH 7 complementado o no con aminoácidos individuales (5 g/l). Todos los cultivos se llevaron a cabo utilizando placas de Petri incubadas a 25 °C durante 10 días.

(f) Extracción y purificación del compuesto biológicamente activo.

Se trocearon cultivos de SVB-F1 de *E. purpurascens* de diez días de antigüedad sobre placas de agar y se transfirieron a una botella de Schott de 250 ml que contenía 50 ml de metanol. Los frascos se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Los extractos de metanol se separaron de la biomasa fúngica mediante filtración usando algodón-lana seguido de filtración usando una membrana de nitrocelulosa (0,22 µm).

Los compuestos pigmentados se purificaron previamente a partir del extracto de metanol mediante extracción en fase sólida usando cartuchos de 5 g de sílice SPE DSC-Si (Discovery®, Supelco, Bellefonte, EE.UU.). Los cartuchos se cebaron con 3 volúmenes (20 ml) de agua desionizada, seguidos de 3 volúmenes (20 ml) de metanol, 3 volúmenes (20 ml) de acetonitrilo y 1 volumen (20 ml) de una mezcla de acetonitrilo/metanol (1: 1). La muestra se disolvió en una mezcla de acetonitrilo/metanol (1:1) se eluyó con la misma mezcla disolvente y la fracción pigmentada se recogió y se secó bajo un flujo de aire en la oscuridad.

Los residuos pigmentados secados con aire se lavaron con hexano para separar compuestos no polares. El hexano residual se separó seguidamente mediante evaporación y el precipitado se volvió a poner en suspensión en agua desionizada a pH 10. Los compuestos pigmentados seguidamente se purificaron adicionalmente a partir de los extractos previamente purificados mediante HPLC (Beckmann, EE.UU.) usando detección UV a 360 nm. Los pigmentos se separaron en una columna Gemini-NX C18 (Phenomenex) a temperatura ambiente. Se usaron dos disolventes, (A) agua desionizada a pH 10 (NH₄OH) y (B) metanol/isopropanol (4:1) en combinación como la fase móvil a un flujo de 1 ml/min. Un gradiente a partir de 0-12 minutos comprendía de 25% a 100% de (B), que se mantuvo durante 1 minuto y se hizo volver a 25% durante los siguientes 7 minutos. Las fracciones pigmentadas que se eluyeron de la columna se recogieron y se registró su tiempo de retención.

(g) Ensayos de estabilidad.

La estabilidad se determinó volviendo a poner en suspensión entre 0,3 y 0,5 mg/ml de compuesto pigmentado purificado de fórmula (IV) en diferentes soluciones según la Tabla 1, y midiendo la absorbancia a 428 nm cada 24 horas durante quince días. Las muestras de ensayo se mantuvieron en viales de vidrio bajo luz incandescente

constante (excepto para el ensayo de estabilidad con la temperatura).

Tabla 1 - Estabilidad del compuesto de fórmula (IV)

Condición	Condición específica	Absorbancia inicial (428 nm)	Absorbancia final (428 nm)
Estabilidad con el pH	3	1,46	1,45
	5	1,67	1,67
	7	2,05	2,05
	8	2,09	2,08
	10	2,09	2,09
Estabilidad en algunos ácidos comunes	Ácido cítrico	1,53	0,51
	Ácido acético	1,61	0,66
	Ácido málico	1,53	0,38
	Ácido láctico	1,52	0,68
Estabilidad en álcalis comunes *	NaHCO ₃	2,08	2,08
	Na ₂ CO ₃	2,13	2,12
	NaOH	2,05	2,04
Estabilidad a la presencia de azúcares *	Dextrosa	2,08	2,08
	Sacarosa	2,08	2,07
	Fructosa	2,02	2,03
Estabilidad a la luz	En agua	2,05	1,82
	En metanol	2,04	2,04
	En etanol 5% v/v	2,04	2,04
Estabilidad a temperatura	-20 °C en agua	2,08	2,07
	-20 °C en metanol	2,05	2,06
	4 °C en agua	2,08	2,06
	4 °C en metanol	2,05	2,03
	60 °C en agua	2,08	2,06
	60 °C en metanol	2,05	2,04
	100 °C en agua	2,08	2,07
Estabilidad a la radiación microondas	5 min, microondas doméstico (1.000 W)	2,05	2,04

* 10% p/p; después de 10 días (excepto para los ensayos de temperatura y radiación microondas)

(h) Ensayos de actividad biológica-antagonismo mediante *E. purpurascens* SVB-F1

- 5 Las propiedades antagonistas de *E. purpurascens* SVB-F1 frente a otros hongos filamentosos se valoraron mediante cultivo conjunto en placas de YPD incubadas a 25 °C durante 7 días en la oscuridad. Los hongos ensayados fueron *Apiognomonia supraseptata* SVB-F2, *Botrytis cinera* ICMP16621 (Landcare Research, Nueva Zelanda) y *Sclerotinia sclerotiorum* ICMP13844 (Landcare Research, Nueva Zelanda).

(i) Ensayo de actividad biológica-inhibición del crecimiento micelial.

- 10 La actividad de los compuestos de fórmula (IV) purificados mediante HPLC se ensayando usando ensayos de difusión en agar frente al crecimiento micelial de *A. supraseptata* SVB-F2, *B. cinera* ICMP16621, y *S. Sclerotiorum* ICMP13844. Las cepas fúngicas se hicieron crecer sobre agar YPD. Los compuestos del ensayo se absorbieron sobre discos de papel individuales (6 mm de diámetro) o directamente en el agar a través de un orificio de 1 mm a 20 µl/disco de solución de pigmento en tampón de fosfato (pH 7,4). Se usó tampón fosfato como testigo negativo.

Las placas de ensayo se incubaron a 25 °C durante 5 días y se examinaron en cuanto a la presencia de una zona de inhibición.

(j) Ensayo de actividad biológica-inhibición de la germinación de esporas

5 La actividad del compuesto de fórmula (IV) frente a la germinación de esporas de diferentes fitopatógenos se llevó a cabo en placas de microtitulación de 12 pocillos que contenían 200 µl de suspensión de esporas fúngicas (~10⁶ esporas.ml⁻¹) y 1,8 ml de Pigmento purificado por HPLC nuevamente puesto en suspensión en caldo de cultivo de YPD esterilizado.

10 Se ensayaron nueve hongos fitopatógenos: *B. cinera* ICMP16621, *S. sclerotiorum* ICMP13844, *Alternaria alternata* ICMP1099-96, *Phomopsis viticola* ICMP5537, *Mycosphaerella graminicola* ICMP12504-95, *Rhizoctonia solani* ICMP11620, *Magnaporthe grisea* ICMP14481, *Sclerotium cepivorum* ICMP10916-91, y *Venturia inaequalis* ICMP4095-96. Se ensayaron tres concentraciones diferentes de compuesto antifúngico: 2,7, 1,3 y 0,7 mg.ml⁻¹ respectivamente. Los cultivos se incubaron a 25 °C. Cada tratamiento se preparó por triplicado. Las esporas germinadas se observaron y registraron a las 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 240 horas. Se determinó el porcentaje de esporas germinadas mediante examen microscópico de 3 campos microscópicos (hemocitómetro) por muestra. Las esporas se consideraron germinadas cuando la longitud del tubo del germen era igual o más larga que el diámetro de la espóra. Se utilizó caldo de YPD sin compuesto antifúngico como control positivo.

(k) Caracterización química.

20 Se midieron espectros UV-Vis con un espectrofotómetro Hitachi High-Technologies Corporation modelo U1800. Los espectros IR se registraron en un espectrómetro Thermo Electron Nicolet 8700 FT-IR. Se colocó una gota en la parte superior del cristal de diamante y se dejó secar durante 1 hora para reducir las bandas de agua que dominaban el espectro, seguidamente se recolectaron 100 exploraciones a una resolución de 4 cm⁻¹ y se calculó el promedio. El ángulo de incidencia del haz IR era de 45° y el espectro se corrigió con ATR y se corrigió con una referencia. Se llevó a cabo un análisis por FT-ICR MS electropulverización por infusión directa en un espectrómetro de masas Thermo LTQ-FT en metanol acuoso en un modo de iones positivos. Los espectros RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 600 equipado con una criosonda de triple resonancia (Bruker, Karlsruhe, Alemania) a 600 MHz para 1H y 150 MHz para 13C en DMSO-d₆. Se usó TMS como un patrón interno.

(l) Comparación de diferentes cepas de *E. purpurascens*

30 Las cepas de *Epicoccum purpurascens* ICMP1732, ICMP2048, ICMP2931, ICMP10458, ICMP10459, ICMP10460, ICMP11503, ICMP13352, ICMP15700, ICMP15816 e ICMP16305 se ensayaron todas para determinar si producían el compuesto de fórmula (IV) producido por la cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens*. Cada cepa se cultivó y se extrajeron productos extracelulares como se describió con anterioridad. Los extractos de cultivo se purificaron previamente mediante extracción en fase sólida como se describió anteriormente y el extracto purificado se analizó mediante HPLC y electropulverización de infusión directa FT-ICR MS como anteriormente.

2. Resultados

35 (a) Antagonismo de hongos filamentosos mediante SVB-F1 de *E. purpurascens*

El *E. purpurascens* mostró una actividad antifúngica pronunciada cuando se cultivó conjuntamente sobre placas de agar con elevado contenido de proteínas con otros hongos filamentosos, dando lugar a una zona de inhibición clara alrededor de colonias de *E. purpurascens* (datos no mostrados). No se observó actividad antimicrobiana frente a levaduras, bacterias Gram positivas o Gram negativas (datos no mostrados).

40 (b) Propiedades y producción del compuesto de fórmula (IV), denominado "Epicoccaene"

45 Cuando se cultivó *E. purpurascens* SVB-F1 en medios ricos en proteínas secretó activamente un exudado pigmentado. Este exudado pigmentado se fraccionó como se describió anteriormente y cuando se ensayó según los métodos anteriormente descritos mostró una actividad antifúngica pronunciada frente hongos filamentosos. No se observó actividad antimicrobiana frente a levaduras, bacterias Gram positivas o Gram negativas (datos no mostrados).

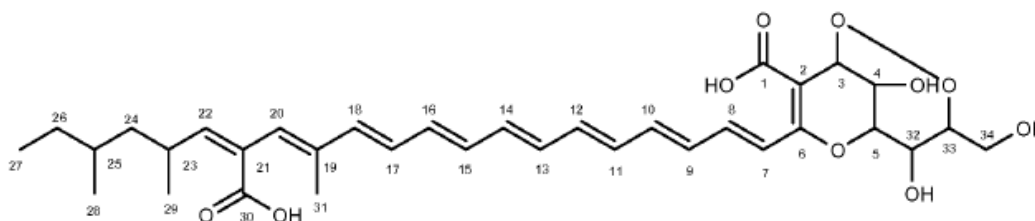
50 *E. purpurascens* SVB-F1 puede crecer bien en medio mineral mínimo con glucosa y amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, pero produjo solamente el exudado pigmentado cuando se hizo crecer en medios que contenían sustratos proteínicos como peptona, extracto de levadura y extracto de patata (datos no mostrados). El crecimiento de *E. purpurascens* SVB-F1 en medio de agar mineral mínimo complementado con aminoácidos individuales condujo a la producción de pigmento amarillo cuando se complementó histidina para el medio (datos no mostrados).

El compuesto de fórmula (IV) aislado a partir del exudado pigmentado de *E. purpurascens* SVB-F1, en lo que sigue "compuesto 1", es fácilmente soluble en agua y disolventes orgánicos polares como metanol y etanol. Se encontró que era inestable bajo condiciones ácidas, cambiando de un color amarillo brillante hasta un naranja pálido. Cuando

una solución ácida de compuesto 1 se ajustó a pH 12, recuperó su color amarillo brillante, sugiriendo una reordenación estructural dependiente del pH reversible. La tabla 1 anterior resume la estabilidad del compuesto 1 para diferentes condiciones. Exhibe una degradación pronunciada cuando se disolvió en solución de ácidos orgánicos (10% p/p), así como una sensibilidad a la luz moderada cuando se disolvió en agua a pH neutro. Sin embargo, cuando se disuelve en agua a pH 8,0 o superior, en metanol o en soluciones de azúcares (10% p/p), su resistencia a la luz aumentó (tabla 1). El compuesto 1 parece es también resistente a la temperatura y radiación de microondas (tabla 1) y su potencia antioxidante determinada mediante FRAP (potencia antioxidante reductora férrica) y ensayos de fosfomolibdeno así como su capacidad de eliminación de radicales, son comparables a las del ácido ascórbico (datos no mostrados).

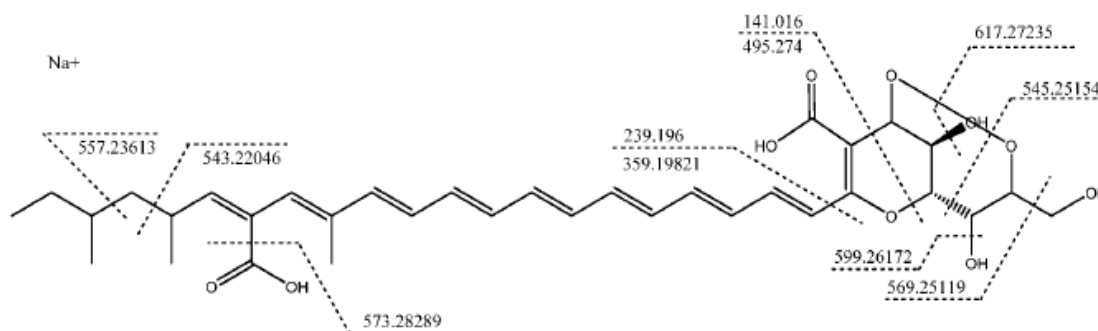
(c) Caracterización química.

El compuesto 1 tiene un peso molecular de 612 y la fórmula molecular $C_{34}H_{45}O_{10}$ a partir de mediciones de ES/FT-ICR/MS (encontrados 613,29973 para MH^+ , $C_{34}H_{45}O_{10}$), indicando que el compuesto 1 es un isómero de orevactaeno, un inhibidor de la unión de proteína VIH-1 Rev aislada también a partir de un cultivo de *E. purpurascens* (Shu *et al*, 1997). Sin embargo, la absorción UV máxima del compuesto purificado se obtuvo a 428 nm, sugiriendo un sistema de conjugación ligeramente diferente en comparación con el orevactaeno, que presenta una UV máx a 432. El espectro IR del compuesto 1 mostró características de absorción fuertes de los hidroxilos ($3375,5$ y $3220,0$ cm^{-1}), hidroxilos unidos a carbonilos ($2903,6$ - $3023,0$ cm^{-1}), carbonilo conjugado ($1676,8$ cm^{-1}) y absorciones adicionales que sugieren la presencia de un éster/lactona ($1093,9$ - $1204,9$ cm^{-1}) y alquenos ($1005,1$ cm^{-1}). Los espectros 1H RMN y ^{13}C RMN del compuesto 1 eran casi idénticos a los de orevactaeno (datos no mostrados). Sin embargo, se observaron diferencias mayores que las diferencias de desplazamientos químicos para C1, C2, C8 y C7, lo que indica diferencias estructurales entre el compuesto 1 y el orevactaeno. Basándose en los datos de conectividad de HMBC, HSQS y COSY, la estructura del compuesto 1 se determinó que era de la fórmula (IV) anteriormente descrita:



(IV)

El compuesto 1 posee dos diferencias estructurales principales en comparación con el orevactaeno. En primer lugar, el compuesto 1 tiene un grupo carboxilo en C1, lo que explica las diferencias de desplazamientos químicos de C1, C2, C8 y C7. En segundo lugar, a pesar de no tener una gran influencia sobre la resonancia de C3 y C33, se cree que el enlace de oxígeno de estos carbonos está unido formando un anillo de peróxido de siete miembros, porque esta es la única manera de hacer coincidir el peso molecular de 612 y las correspondientes trayectorias de fragmentación mediante espectrometría de masas de alta resolución en la representación del compuesto de fórmula (IV) siguiente.



(IV)

También, están presentes once dobles enlaces en la estructura propuesta del compuesto 1, que es cercana a 12.5 predicha mediante MS de alta resolución. La estereoquímica de los centros quirales en C4, C5, C32 y C33 no pudo ser determinar sin ambigüedades con los datos actuales. Son necesarios experimentos adicionales de RMN.

(d) Actividad biológica - inhibición del crecimiento micelial por el compuesto 1

El compuesto 1 purificado mediante HPLC mostró una fuerte actividad frente a *B. cinera* ICMP16621, *S. sclerotiorum* ICMP13844 y *A. supraseptata* SVB-F2, produciendo una zona distintiva de inhibición en los ensayos de difusión en agar (datos no mostrados). No se observó actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans* SC5614, *Candida utilis* 02/DO0981, *Saccharomyces cerevisiae* BM45, *Staphylococcus epidermis* SVB-B12, *Escherichia coli* SVB-B11 o *Pseudomonas aeruginosa* SVB-B10 usando ensayos de difusión en agar (datos no mostrados).

(e) Actividad biológica-inhibición de la germinación de esporas por el compuesto 1

El compuesto 1 fue capaz también de inhibir completamente la germinación de esporas de *B. cinera* durante la incubación en medio de cultivo rico durante 10 días (datos no mostrados). En comparación, las esporas de *B. cinera* fueron completamente germinadas en 12 horas de incubación en las muestras testigos positivas, lo que demuestra el fuerte efecto de inhibición del compuesto 1 (datos no mostrados). La totalidad de las tres concentraciones diferentes de compuesto 1 ensayadas fueron capaces de inhibir completamente la germinación de esporas, no solamente de *B. cinera*, sino también de *S. sclerotiorum* ICMP13844, *A. alternata* ICMP1099-96, *P. viticola* ICMP5537, *R. solani* ICMP11620, *M. grisea* ICMP14481, *S. cepivorum* ICMP10916-91 y *V. inaequalis* ICMP4095-96; lo que indica que la dosis de inhibición mínima (MID) de compuesto 1 contra estos hongos está por debajo de 0,7 mg/ml. Solamente *M. graminicola* ICMP12504-95 fue resistente a todas las concentraciones de compuesto 1 ensayadas.

(f) Comparación química de diferentes cepas de *E. purpurascens*

Posteriormente se obtuvieron Once cepas adicionales de *E. purpurascens* para determinar si producían compuesto 1. De las once cepas de *E. purpurascens* estudiadas, dos fueron aisladas fuera de Nueva Zelanda (ICMP10458 ["ultramar"] e ICMP13352 [Reino Unido]) y nueve fueron aisladas en diferentes partes de Nueva Zelanda. Solamente dos cepas de *E. purpurascens*, ICMP13352 e ICMP1732, no consiguieron producir compuesto 1. No se observó producción de pigmento durante el crecimiento de estas cepas.

Aplicación industrial

Los compuestos, aislados, composiciones y métodos de la invención, como se definen en las reivindicaciones, son útiles para tratar o prevenir infecciones fúngicas, particularmente infecciones fúngicas filamentosas en animales y plantas, solos o suministrados de forma separada, simultánea o secuencialmente con otro aceptable en farmacia o agricultura.

Referencias

Shu YZ, Ye Q, Li H, Kadow KF, Hussain RA, Huang S, Gustavson DR, Lowe SE, Chang LP, Pirnik DM, Kodukula K. 1997. Orevactaene, a novel binding inhibitor of HIV-1 rev protein to rev response element (RRE) from *Epicoccum nigrum* WC47880.

Tripathi P, Dubey NK. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetable. *Postharvest Biol. Technol.* 32: 235-245.

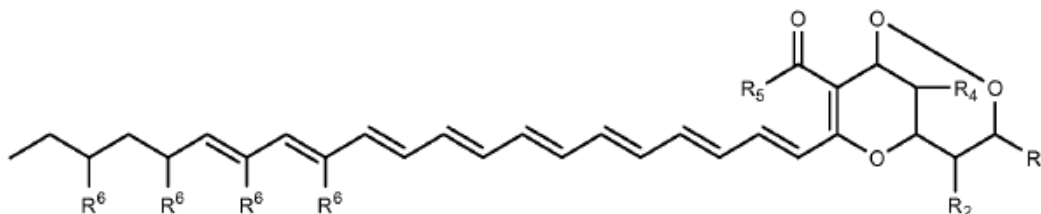
Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Dijken J. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture steady on regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8: 501-517.

La cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* se encuentra depositada en la entidad National Measurement Institute, Australia (NMI), 1 Suakin Street, Pymble, New South Wales, 2073, Australia, bajo el número de acceso V10/000331, y se depositó el 18 de marzo de 2010.

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo biológicamente puro de cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* depositada en la entidad National Measurement Institute, Australia (NMI) bajo el número de acceso V10/000331, depositada el 18 de marzo de 2010, o un exudado obtenido a partir mismo.

5 2. Un aislado o compuesto sustancialmente puro de fórmula (IIIA) o una sal, solvato o hidrato del mismo



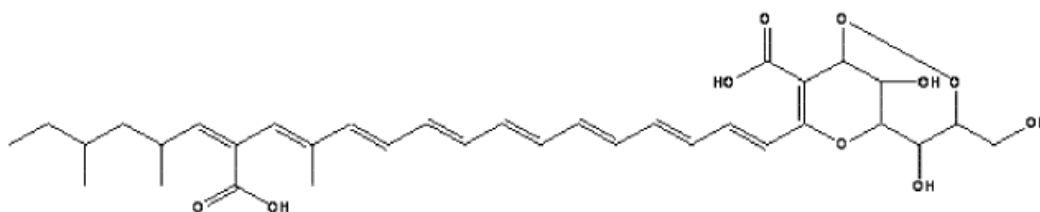
(IIIA)

en la cual

R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, metilo, metoxi e hidroxilo; y

10 en que cada R⁶ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, metilo, metoxi, hidroxilo y carboxilo.

3. Un aislado o compuesto sustancialmente puro de fórmula (IV)



(IV)

15 4. Un aislado obtenido o que puede ser obtenido a partir de *Epicoccum purpurascens*, que comprende al menos aproximadamente de 1 a 99% en peso de un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal del mismo.

5. Una composición que comprende (a) un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal, solvato o hidrato del mismo, o (b) un aislado obtenido o que puede ser obtenido a partir de *Epicoccum purpurascens*, que comprende al menos aproximadamente 1 a 99% en peso de un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal del mismo, o (c) cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* depositada en la entidad National Measurement Institute, Australia (NMI) bajo el número de acceso V10/000331 o un exudado del mismo y un portador aceptable en agricultura o farmacia.

6. Un cultivo o exudado de la reivindicación 1, un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, un aislado de la reivindicación 4, o una composición de la reivindicación 5, para su uso en un método para tratar o prevenir una infección fúngica filamentosa en un sujeto animal que lo necesita.

7. Un método para tratar o prevenir una infección fúngica filamentosa, que comprende la aplicación de

25 (a) un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal, solvato o hidrato del mismo; o

(b) un aislado obtenido o que puede ser obtenido a partir de *Epicoccum purpurascens* que comprende al menos aproximadamente 1 a 99% en peso de un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal del mismo;

30 (c) una composición que comprende un compuesto de fórmula (IIIA) o (IV) o una sal, solvato o hidrato del mismo o un aislado obtenido o que puede ser obtenido a partir de *Epicoccum purpurascens*, que comprende al menos aproximadamente 1 a 99% en peso de un compuesto de Fórmula (I) o una sal del mismo y un portador aceptable en agricultura o farmacia; o

(d) una composición que comprende la cepa SVB-F1 de *Epicoccum purpurascens* depositada en la entidad National Measurement Institute, Australia (NMI) bajo el número de acceso V10/000331 o un exudado de la misma, y un portador aceptable en agricultura o farmacia;

5 a una superficie diana que lo necesita, en el que dicho método no es un método de tratamiento de un cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

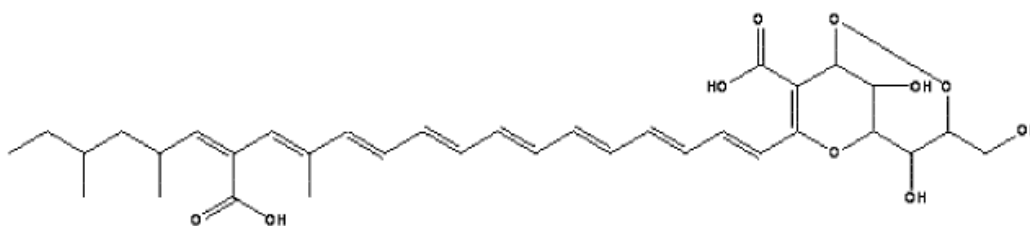
8. Un método de la reivindicación 7, en el que la composición de (d) se formula mezclando y/o triturando la cepa de *Epicoccum purpurascens* o un exudado de la misma con el portador aceptable en agricultura o farmacia.

9. Un método de la reivindicación 7 u 8, en el que la composición de (d) es un polvo.

10. Un método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la composición de (d) es formulada en forma de un polvo humectable, polvo soluble, polvo fino, gránulo o gránulo dispersable en agua.

11. Un método de la reivindicación 7, en el que el portador aceptable en agricultura o farmacia es talco.

12. Un método para producir un compuesto de fórmula (IV) o una sal del mismo



(IV)

comprendiendo el método

15 (a) cultivar un organismo del género *Epicoccum*, preferiblemente *Epicoccum purpurascens*, en un medio de cultivo para producir el compuesto de fórmula (IV) o una sal del mismo, y

(b) opcionalmente extraer el compuesto de fórmula (IV) o una sal del mismo a partir del medio de cultivo.