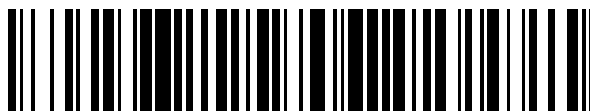


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 855**

51 Int. Cl.:

A61P 31/10 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2010** **PCT/US2010/001530**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010** **WO10138173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010** **E 10780921 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 2435060**

54 Título: **Occidiofungina, un glicopéptido antifúngico único producido por una cepa de Burkholderia contaminans**

30 Prioridad:

25.05.2010 US 800922
26.05.2009 US 217026 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2020

73 Titular/es:

MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY (100.0%)
Office of Technology Management, 100 Research
Blvd., Suite 120X
Starkville, MS 39759, US

72 Inventor/es:

LU, SHIEN;
SMITH, JAMES, L.;
AUSTIN, FRANK y
GU, GANYU

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 757 855 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

Occidiofungina, un glicopéptido antifúngico único producido por una cepa de *Burkholderia contaminans*

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de los compuestos antifúngicos y a su uso terapéutico en la prevención o tratamiento de infecciones y enfermedades fúngicas. La invención se refiere al uso de compuestos antifúngicos nuevos como fungicidas farmacéuticos y agrícolas para animales y plantas. También se desvela la cepa bacteriana que produce los nuevos compuestos antifúngicos.

Antecedentes de la invención

La presente invención proporciona compuestos de glicopéptidos antifúngicos novedosos para prevenir o tratar la infección fúngica. La presente invención en una realización preferida también proporciona una composición farmacéutica y agrícola que comprende los compuestos novedosos y sales de la misma para tratar o prevenir la infección fúngica. También se desvela una cepa bacteriana que produce los nuevos compuestos antifúngicos.

Existe una creciente demanda de nuevos antifúngicos, dada la creciente prevalencia de patógenos resistentes a los agentes antifúngicos actuales. Actualmente existen cuatro grupos terapéuticos principales de agentes antifúngicos: antifúngicos de polieno, antifúngicos de azol, antifúngicos de alilamina, y equinocandinas. Los tres primeros grupos se centran principalmente en la producción de ergosterol o se unen a ergosterol, alterando la membrana fúngica. El ergosterol, al igual que el colesterol que se encuentra en las células de los mamíferos, es importante para mantener una adecuada permeabilidad y fluidez celular. Las equinocandinas, el cuarto grupo, son lipopéptidos sintéticamente modificados que se originan del compuesto natural equinocandina B producido por *Aspergillus nidulans*. En los hongos, dos polisacáridos covalentemente reticulados, (1,3)- β -glucano y quitina, forman el armazón primario responsable de la integridad estructural y la forma de la pared celular. La clase equinocandina de los agentes antifúngicos inhibe (1,3)- β -glucano sintasa, un complejo enzimático que polimeriza la glucosa difosfato de uridina en polímeros de (1,3)- β -glucano.

Una característica sorprendente de algunas cepas de *Burkholderia* es la producción de varios compuestos antifúngicos, que hacen que el organismo sea potencialmente útil para el manejo de enfermedades fúngicas. Sin embargo, el aislamiento de *Burkholderia* spp., de los pacientes con fibrosis quística los reclasificó como patógenos oportunistas, impidiendo así el uso directo de las bacterias para el manejo de enfermedades fúngicas. El aislamiento y la identificación de los antifúngicos responsables de las actividades observadas de supresión de enfermedades de las plantas de las cepas de *Burkholderia* proporcionarán importantes vías para el desarrollo de fungicidas de base biológica, a la vez que eliminarán los posibles riesgos para la salud derivados del uso directo de las bacterias. Se necesitan nuevos antifúngicos debido a la importancia de las infecciones fúngicas en pacientes inmunocomprometidos, y a las limitaciones de los agentes antifúngicos actualmente disponibles con respecto a su espectro de actividad y toxicidad. Además, los nuevos antifúngicos son cruciales para la conservación de los alimentos y la producción de un suministro de alimentos suficiente y asequible. En la presente divulgación, se caracterizan la estructura y actividad de un nuevo compuesto antifúngico llamado occidiofungina, que significa asesino de hongos. La estructura del antifúngico ha sido dilucidada por experimentos de espectroscopia de RMN 2D TOCSY, NOESY, ROESY, y HSQC. La actividad antifúngica de occidiofungina contra una variedad de patógenos animales y fúngicos ha sido probada y comprobada. Adicionalmente, se observó una morfología de membrana aberrante, similar a la que se ha notificado para la clase de las equinocandinas de los antifúngicos, después de la exposición a concentraciones subletales de occidiofungina, lo que sugiere que la occidiofungina también se dirige a la envoltura celular. Este trabajo proporciona una base sustancial para futuros experimentos destinados a comprender el modo de acción del compuesto, así como a investigar el potencial farmacéutico y agrícola de la occidiofungina.

Como resultado, en el campo de los fungicidas existe la necesidad de nuevos compuestos antifúngicos eficaces contra los patógenos animales y vegetales que son resistentes a los agentes fungicidas típicos. La presente invención proporciona tal compuesto y composición.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos de glicopéptido cíclicos antifúngicos novedosos con el nombre occidiofungina, que tienen un aminoácido novedoso unido a ello, y sales farmacéutica o agrícolamente aceptables de los mismos, según lo reivindicado en la reivindicación 1, y una composición que comprende tales compuestos como se reivindica en las reivindicaciones. La presente invención es eficaz contra un amplio intervalo de patógenos fúngicos que afectan a humanos, animales, y plantas. Además, la presente invención altera la morfología de la membrana fúngica normal. También se desvela una cepa bacteriana que produce los nuevos compuestos antifúngicos.

Los compuestos de glicopéptido antifúngicos cíclicos de la presente invención fueron purificados a partir de la cepa

bacteriana *Burkholderia contaminans* e incluye ocho (8) residuos de aminoácidos. Unido a un aminoácido se encuentra un grupo acilo y un azúcar xilosa. Una composición antifúngica comprende el (los) nuevo(s) compuesto(s) y las sales farmacéuticas o agrícolamente aceptables de la misma y al menos un vehículo o diluyente aceptable para la administración al sujeto. Un procedimiento de tratamiento de una infección o enfermedad fúngica comprende la administración del compuesto y la composición a un sujeto durante un tiempo y en condiciones eficaces para eliminar o mejorar la infección. En consecuencia, la invención actual se refiere a compuestos de glicopéptido cíclicos antifúngicos según lo descrito en la presente memoria, a composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos antifúngicos, tales compuestos antifúngicos para tratar patógenos fúngicos de plantas, animales, y/o humanos y al uso y a un procedimiento que utiliza tales compuestos antifúngicos para tratar una infección o enfermedad fúngica en una planta.

Con lo anterior y otros objetos, las características, y ventajas de la presente invención resultarán evidentes de ahora en adelante, la naturaleza de la invención puede ser más claramente entendida por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y a las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Estos dibujos acompañan la descripción detallada de la invención y tienen por objeto ilustrar la invención y sus ventajas. Los dibujos, los cuales están incorporados en y forman una parte de la memoria descriptiva, ilustran ciertas realizaciones preferidas de la invención y, junto con la memoria descriptiva completa, están destinados a explicar las realizaciones preferidas de la presente invención a aquellos expertos en la materia:

La Fig. 1 es una ilustración gráfica del cromatograma de GC de un patrón de xilosa (A); el patrón interno se añadió a ambas muestras. El patrón de xilosa mostró dos picos (Xyl Xyl2).

La Fig. 2 es una ilustración gráfica del cromatograma de GC del glicano a partir de *occidiofungina* (B); el patrón interno se añadió a las muestras. El glicano de *occidiofungina* se identificó como xilosa en base a los tiempos de migración idénticos de ambos picos.

La Fig. 3A es una ilustración gráfica del espectro de RMN TOCSY de *occidiofungina*. La expansión de los espectros de RMN 2D TOCSY muestra sistemas de espín de amida con respecto a alfa, y amida con respecto a cadena lateral para cada residuo de *occidiofungina* A y *occidiofungina* B.

La Fig. 3B es una ilustración gráfica del espectro de RMN NOESY de *occidiofungina*. La expansión del espectro de RMN 2D NOESY muestra los desplazamientos químicos del grupo de acilo corto y de azúcar xilosa en *occidiofungina*.

La Fig. 4A es una ilustración gráfica del espectro de RMN NOESY de *occidiofungina*. La expansión muestra las interacciones de amida con respecto a alfa y amida con respecto a la cadena lateral.

La Fig. 4B es una ilustración gráfica del espectro de RMN NOESY de *occidiofungina*. La expansión muestra las interacciones de amida con respecto a alfa y amida con respecto a la cadena lateral.

La Fig. 5A es una ilustración tabular del espectro de actividad de la *occidiofungina*. Los valores de MIC están representados para varios patógenos de plantas y animales. MIC y MIC50 representan una inhibición de crecimiento del 100 % y una inhibición de crecimiento del 50 %, respectivamente.

La Fig. 5B es una ilustración gráfica del espectro de actividad de la *occidiofungina*. Se muestra una placa de bioensayo representativa de *Geotrichum candidum*. La concentración inicial en el pocillo A1 fue de 32 µg/ml y el pocillo C2 tuvo una concentración final de 62,5 ng/ml. Los dos últimos pocillos sirven como control negativo (sin compuesto antifúngico). El pocillo A4 es una buena representación de un MIC50, en el que el crecimiento del hongo fue inhibido en más de un 50 %.

La FIG. 6 es una representación gráfica de microscopía óptica. En el panel A y B, se observan cambios morfológicos en las hifas significativos en *Rhizoctonia solani* cultivada en concentraciones subinhibidoras (panel A) en comparación con el control (panel B). Las flechas negras sólidas apuntan a la formación de inclusiones intracelulares y las flechas huecas apuntan a deformidades de la membrana. En los paneles C y D, *Geotrichum candidum* expuesta a 4 µg/ml de *occidiofungina* durante 48 horas (panel C) resultó en una inflamación significativa de las células, en comparación con el control (panel D).

La Fig. 7A es una representación gráfica de microscopía electrónica de transmisión y muestra la célula de ensayo de control no tratada. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 8.000.

La Fig. 7B es una representación gráfica de microscopía electrónica de transmisión que muestra *Geotrichum candidum* expuesta a 4 µg/ml de *occidiofungina* durante 48 horas, cuya muestra dio lugar a cambios morfológicos notables en comparación con la célula de ensayo de control no tratada. El espesor de la pared de la célula se reduce drásticamente en comparación con el control. La pared exterior de la célula de *Geotrichum candidum* tratada parece estar desprendiéndose (flecha negra sólida). La falta de contraste dentro de la muestra tratada (flecha hueca) sugiere que la célula tiene componentes celulares lisados y efluídos. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 8.000.

La Fig. 7C es una representación gráfica de microscopía electrónica de transmisión que muestra una visión más amplia que contiene varias artrosporas expuestas a *occidiofungina*. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 8.000.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos de glicopéptido cíclicos antifúngicos novedosos de la presente invención son eficaces contra un amplio intervalo de infecciones fúngicas. Los espectros de RMN compuestos se desvelan en la presente memoria.

En un ejemplo, una composición antifúngica comprende el (los) nuevo(s) compuesto(s) y sus sales y al menos un vehículo o diluyente farmacéutica o agrícolamente aceptable para su administración a seres humanos, animales y/o plantas en necesidad de terapia y tratamiento fungicida.

Una cepa bacteriana aislada que produce compuestos antifúngicos, incluyendo los nuevos compuestos antifúngicos descritos en la presente memoria, es desvelada.

Para los fines de esta divulgación, las abreviaturas son las siguientes: RMN, resonancia magnética nuclear; NOE, efecto nuclear Overhauser; NOESY, espectroscopia de efecto nuclear Overhauser; TOCSY, espectroscopia de correlación total; COSY, espectroscopia de correlación; ROESY, espectroscopia de efecto nuclear Overhauser en el plano rotatorio; HSQC, coherencia nuclear simple cuántica; ESI-MS, Espectrometría de masas de tipo ionización por electrospray; MS/MS, espectrometría de masas en tándem; GC, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; NRPS, sintetasa de péptido no ribosomal; NAA, aminoácidos novedosos; y MIC, concentración mínima inhibidora.

Los términos moleculares tienen su significado común, a menos que se especifique lo contrario. El término "acilo" se define como un radical carbonilo unido a un grupo alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, o heteroarilo, ejemplos que incluyen, entre otros, radicales tales como acetilo y benzoilo. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se define como una dosificación suficiente para inducir un efecto fungicida sobre los hongos en contacto con los compuestos o la composición. La cantidad de la composición farmacéutica o agrícola que es terapéuticamente eficaz depende de los ingredientes y componentes que comprenden la composición y la filosofía de tratamiento.

Para la presente invención, la cepa bacteriana *Burkholderia contaminans* MS14 fue aislada del suelo que suprimió la enfermedad de la podredumbre parda de la hierba de césped. Un nuevo compuesto antifúngico fue purificado a partir del cultivo líquido de esta bacteria. Los datos para dos compuestos antifúngicos estrechamente purificados relacionados se obtuvieron mediante los experimentos de TOCSY, NOESY, ROESY, ¹³C-RMN 2D HSQC, y ESI-MS y GC. El análisis de las masas monoisotópicas de la preparación purificada indicó la presencia de dos compuestos relacionados con masas determinadas como 1199,543 Da y 1215,518 Da; la diferencia corresponde a la masa de un átomo de oxígeno. El análisis de GC identificó un azúcar de xilosa adherido al compuesto antifúngico. Los experimentos de RMN revelaron que el compuesto es cíclico y está compuesto por ocho aminoácidos, dos de los cuales son derivados β-hidroxi de Tyr y Asn, y uno es un nuevo aminoácido (NAA). El nuevo aminoácido sirve como el armazón para la fijación del azúcar de xilosa y una cadena de acilo corta. El espectro y la concentración de la actividad antifúngica se determinó mediante un ensayo de placa de microtitulación. El compuesto antifúngico demostró una potente actividad antifúngica contra un amplio panel de patógenos fúngicos en plantas y animales, así como dos especies de *Pythium spp.* Las observaciones microscópicas demostraron que el compuesto antifúngico altera la morfología normal de la membrana. Las células fúngicas se llenan con grandes cuerpos de inclusión y la membrana se conforma de forma irregular y se hincha tras la exposición a concentraciones subinhibidoras del compuesto antifúngico. Nuestros datos apoyan la identificación del nuevo fungicida y el compuesto ha sido nombrado como occidiofungina, que significa asesino de hongos.

La cepa MS14 de *Burkholderia contaminans* se aisló previamente en suelos que suprimen la enfermedad, un suelo en el que el patógeno transmitido por el suelo causa poco o ningún daño a la planta huésped. La caracterización inicial de esta cepa demostró que inhibía el crecimiento de un amplio intervalo de patógenos fúngicos. Posteriormente, La mutagénesis por transposones identificó la región genómica responsable de la actividad antifúngica, y un fragmento de ADN genético de 56 kb se secuenció y se depositó parcialmente ante GenBank con el número de acceso: EU938698. Esta región genómica contiene varios marcos de lectura abiertos, algunas de las cuales codifican proteínas reguladoras, un transportador de péptidos cíclicos, una glicosiltransferasa, una transaminasa, y módulos catalíticos de sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS). El compuesto antifúngico fue entonces aislado y el análisis de aminoácidos confirmó que la cadena principal del compuesto antifúngico es un oligopéptido que se sintetiza a través de un mecanismo NRPS.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO) y eran de la más alta calidad, a menos que se indique otra cosa. La occidiofungina se produjo y purificó como se ha descrito anteriormente.

Espectrometría de masas. Los compuestos antifúngicos en las fracciones activas fueron analizados por espectrometría de masas de tipo ionización por electrospray (ESI-MS) usando un espectrómetro de masas Micromass Q-TOF II. Los compuestos se disolvieron en 50/50 acetonitrilo/agua (v/v) con 0,1 % de ácido fórmico y se inyectaron en un flujo de 1 µl/min del mismo disolvente utilizando una bomba de jeringa Harvard. El flujo fue pulverizado utilizando la interfaz nano-LC. La MS/MS en tándem (MS/MS) se realizó con iones cargados individualmente utilizando energía de colisión convencional (34 V) y una energía de colisión superior (50 V).

Análisis de composición de monosacáridos. El monosacárido en la occidiofungina purificada se determinó como trifluoroacetato de metilglucósido por cromatografía de gas-líquido. Los análisis se realizaron con un cromatógrafo de gases (Modelo 5890, Hewlett-Packard, Sacramento, CA) equipado con una columna de sílice fundida de 25 m (0,22 mm de diámetro interior) OV-1701 WCOT (Chrompack, Bridgewater, NJ) y detector de captura de electrones. Los patrones de azúcar (pentosas, hexosas, N-acetilaminohexas) se procesaron al mismo tiempo que los compuestos de ensayo y el azúcar en occidiofungina se determinó en base a la comparación de su perfil cromatográfico con los de los patrones. Se utilizó sorbitol como patrón interno.

Espectroscopia de RMN. La occidiofungina no es soluble en soluciones acuosas en las concentraciones requeridas para la RMN. Por lo tanto, Se prepararon muestras de 5 mM de occidiofungina en un 50 % de acetonitrilo-d3 (isótopos de Cambridge) y un 50 % de agua en un volumen total de 700 µl. Los datos de RMN fueron recopilados en el sistema de RMN Varian con el espectrómetro Cold Probe™, funcionando a una frecuencia de protones de 800 MHz. Las resonancias ¹H fueron asignadas de acuerdo con los procedimientos convencionales utilizando experimentos TOCSY y NOESY. Se utilizaron los experimentos ROESY y ¹³C-HSQC para aclarar algunas áreas de ambigüedad en los espectros TOCSY y NOESY. Los experimentos TOCSY, NOESY y ¹³C HSQC se recogieron a 25 °C y el experimento ROESY se recogió a 4 °C. La frecuencia portadora se centró en la resonancia de agua, que se suprimió utilizando la muy eficiente técnica de eco selectiva con gradiente de campo de doble impulso. Se utilizó un retardo de relajación de 1,5 s entre las exploraciones. El experimento TOCSY fue adquirido con un tiempo de mezcla de 60 ms utilizando la secuencia DIPSI-2. Los experimentos NOESY y ROESY fueron adquiridos con tiempos de mezcla de 400 ms y 100 ms, respectivamente. Los parámetros para recoger el espectro HSQC se optimizaron para observar los grupos de CH alifáticos (tiempo de retardo de transferencia ajustado para una constante de acoplamiento de 140 Hz y una desviación de ¹³C ajustada a 35 ppm). La anchura de barrido espectral para TOCSY, NOESY, y ROESY era de 9000 Hz (11,25 ppm) en ambas dimensiones. Las anchuras de barrido espectrales para HSQC fueron de 9000,0 Hz (11,25 ppm) en las dimensiones de protones y de 21.200,0 Hz (105,5 ppm) en la dimensión de carbono. Todos los datos 2D fueron recopilados con 8192 puntos complejos en la dimensión de adquisición y entre 320 y 512 puntos complejos para las dimensiones indirectas, excepto para el HSQC que se recogió con 1024 y 192 puntos complejos en la dimensión directa e indirecta, respectivamente. La detección indirecta de fase sensible para el experimento NOESY, ROESY y TOCSY se realizó utilizando el procedimiento de States-TPPI. Para recoger el espectro HSQC se utilizó una secuencia de pulsos de sensibilidad mejorada seleccionada por el gradiente. Los desplazamientos químicos de ¹H se referenciaron con respecto al acetonitrilo (1,93 ppm). Los datos se procesaron con nmrPipe eliminando primero la señal de agua residual por deconvolución, multiplicando los datos en ambas dimensiones por una función coseno al cuadrado o una función coseno al cuadrado con un desplazamiento de 608 (para la dimensión ¹H de HSQC), al rellenarse con ceros una vez, transformada de Fourier y corrección del valor basal. Los datos se analizaron con el programa informático interactivo NMRView. Las intensidades de pico cruzado de NOE se midieron en NMRView. Las distancias se calibraron utilizando la relación $r_{ab}^6 = r_{cal}^6(V_{cal}/V_{ab})$, en la que r_{ab} es la distancia entre los átomos a y b, V_{ab} es el volumen de pico cruzado de NOESY a a b, r_{cal} es una distancia conocida, y V_{cal} es el volumen correspondiente del pico cruzado de la calibración de NOESY. La distancia utilizada para las calibraciones fue β-hidroxi Tyr4 H^δ y protones aromáticos H_e (2,46 Å).

Organismos microbianos. Las cepas fúngicas se obtuvieron a partir de colecciones del Sistema de Laboratorio de Investigación Médica Veterinaria y Diagnóstico de la Universidad Estatal de Mississippi y del Departamento de Entomología y Patología Vegetal o se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, Va.). Los aislados fúngicos utilizados en este estudio fueron *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ATCC9848, *Geotrichum candidum* F-260, *Macrophomina phaseolina* 61, *Microsporum gypseum*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani* MSCOT-1, y *Trichophyton mentagrophytes*. Además, se sometieron a ensayo dos especies de *Pythium*: *Pythium spinosum* 472-04 y *Pythium ultimum* 671-04.

Ensayo de susceptibilidad antifúngica. Las concentraciones inhibitoras mínimas se determinaron mediante ensayos de microdilución con agar. La occidiofungina se diluyó en serie dos veces (32 µg/ml a 62,5 ng/ml) con agua estéril y se añadió a placas de 12 pocillos de fondo plano. Un (1) ml de agar de dextrosa Sabouraud Difco™ (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ) se añadió a cada pocillo. Una vez que el agar se solidificó, las placas se almacenaron invertidas a 4 °C hasta su utilización. Se cultivaron cultivos de hongos en placas de agar de dextrosa Sabouraud de 100x15 mm (Thermo Fisher Scientific Remel Products), Lenexa, KS) a 22 °C durante 7 días. Un punzón circular, que contiene un tapón de 1 cm de diámetro de los hongos de la placa de agar, se realizó en un área de la placa que tiene un crecimiento confluyente de los hongos. El tapón se colocó en 3 ml de PBS y se trituró con aproximadamente 30 golpes de un homogeneizador Ten-brock. Se colocaron cinco (5) µl del sobrenadante en el centro de cada pocillo y se dejaron secar antes de incubar las placas de microtitulación a 22 °C. Las concentraciones inhibitoras mínimas se midieron a las 48 horas para cada especie, excepto para *Trichophyton mentagrophytes*, que se midió a las 72 horas. Las MIC se determinaron como la concentración más baja que inhibe el crecimiento visible de hongos. Los valores de MIC₅₀ se determinaron como una concentración que redujo visiblemente el crecimiento de la colonia en más de un 50 % (en diámetro) en comparación con el control.

Microscopía. Los hongos que crecen en placas de 12 pocillos de fondo plano descritas anteriormente se utilizaron para examinar los efectos de la occidiofungina sobre las hifas y las artrosporas fúngicas. Para cada uno de los

hongos, las hifas o artrosporas con una MIC₅₀ observada a las 48 horas de crecimiento junto al pocillo de MIC se utilizaron para la preparación de portaobjetos de microscopía óptica y de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Para microscopía óptica, se utilizó la solución de algodón azul de lactofenol (Sigma) como tinción positiva y medio de montaje para el portaobjetos. Para TEM, las muestras de *G. candidum* se fijaron a 4 °C con un 2,5 % de glutaraldehído en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,2). Después de aclararse con el tampón, los especímenes se fijaron posteriormente con un 2 % de tetróxido de osmio en el tampón fosfato. Los especímenes lavados con el tampón fosfato se deshidrataron en series de etanol graduado (50-100 %), y luego se embebieron en la resina de Spurr. Las secciones finas generadas con un Ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E (60-90 nm) fueron teñidas doblemente con acetato de uranilo y citrato de plomo como se ha descrito anteriormente. Las rejillas fueron observadas bajo un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-100CXII (Joel Ltd., Tokio, Japón). Las imágenes fueron tomadas con aumentos entre 5.000 y 8.000.

RESULTADOS

La occidiofungina es un glicopéptido cíclico. Los datos de espectrometría de masas de alta resolución revelaron la existencia de dos variantes estructurales del péptido antifúngico; una con una masa monoisotópica de 1.199,543 Da y la otra con una masa monoisotópica de 1.215,518 que corresponde a la adición de oxígeno al primer compuesto. Dada la presencia de dos variantes estructurales, las variantes del compuesto antifúngico se denominan occidiofungina A (1.199,5584 Da) y occidiofungina B (1.215,5533 Da). El análisis ESI-TOF MS/MS del compuesto antifúngico no fue concluyente, ya que la energía de colisión convencional solo provocaba la pérdida de glicano y la alta energía de colisión que se requería para fragmentar el compuesto antifúngico producía una serie compleja de iones hijos. Sin embargo, el hecho de que se requiriera una alta energía de disociación para que se produjera la fragmentación sugiere que el compuesto es un péptido cíclico. Un procedimiento de disociación convencional resultó solo en una pérdida de 149 Da del ion parental, que indica la presencia de un azúcar de pentosa. El análisis de GC reveló que el azúcar adherido al oligopéptido es una xilosa (Figuras 1 y 2). Un intento de digerir el péptido con tripsina no tuvo éxito (los datos no se muestran). El fracaso en la linealización del péptido antifúngico impidió el posterior análisis de ESI-MS.

La RMN demostró ser el procedimiento definitivo para determinar la estructura del oligopéptido antifúngico. Para determinar la estructura covalente completa del péptido antifúngico, se recopilaron los datos de TOCSY, NOESY, ROESY, y HSQC. Los conjuntos de datos TOCSY y NOESY proporcionaron asignaciones secuenciales y los conjuntos de datos de ROESY y HSQC se utilizaron como evidencias para las asignaciones basadas en protones. Los conjuntos de datos de TOCSY/NOESY revelaron la presencia de 13 sistemas de espín distintos en la frecuencia de protones amida del espectro. Este número de sistemas de espín es mayor de lo esperado para un oligopéptido con una masa de 1199 y 1215 Da. Un análisis más detallado del conjunto de datos reveló que la variante oxidada, occidiofungina B, tiene varios sistemas de espín distintos en la frecuencia de amida del espectro de TOCSY (Figura 3A).

Una asignación numérica de los aminoácidos puede atribuirse a los datos de secuenciación que indican la ubicación del dominio de la tioesterasa en el complejo NRPS; la ubicación del dominio de la tioesterasa designa normalmente el extremo C-terminal del oligopéptido. Los residuos 1 y 7 de occidiofungina A tienen un patrón de desplazamiento químico característico de un residuo de Asn. El residuo 4 es un residuo modificado de Tyr. El carbono beta es hidroxilado, lo que resulta en un notable desplazamiento a campo más abajo del protón beta a 5,16 ppm. Se observan NOEs entre los protones delta del anillo aromático al protón beta de β -hidroxil Tyr, permitiendo la asignación definitiva de las frecuencias de protones aromáticos. La occidiofungina B difiere de occidiofungina A en que el β -carbono de Asn1 es hidroxilado, resultando en un residuo de β -hidroxil Asn en la posición 1. La hidroxilación del carbono beta dio como resultado que el protón beta cambiara de 2,67 ppm a 4,24 ppm.

La occidiofungina tiene un amplio espectro de actividad antifúngica. La occidiofungina demostró una actividad antifúngica significativa contra una amplia serie de patógenos fúngicos de plantas y animales (Figuras 5A y 5B). *R. solani* fue la más sensible de los hongos sometidos a ensayo con una MIC de 2 μ g/ml y mostró una inhibición significativa del crecimiento a una concentración de 0,5 μ g/ml. *A. fumigatus* y *A. niger*, que son causas comunes de aspergilosis pulmonar invasiva, eran altamente susceptibles a la occidiofungina con una MIC de 8 μ g/ml y 4 μ g/ml, respectivamente. Dos hongos relacionados, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes* ambos asociados con la dermatofitosis, fueron sensibles a la occidiofungina con MIC de 4 μ g/ml. Los hongos patógenos adicionales, *Penicillium* sp., *Alternaria alternata* y *Macrophomina phaseolina*, mostraron ser sensibles a la occidiofungina con una MIC de 32 μ g/ml, 8 μ g/ml y 2 μ g/ml, respectivamente. El hongo *F. oxysporum* fue el menos sensible a la occidiofungina con una MIC >32 μ g/ml. Sin embargo, se observó una inhibición significativa del crecimiento a 16 μ g/ml. *G. candidum*, un patógeno de levadura de plantas y animales, se inhibió significativamente al tener una MIC de 8 μ g/ml y una notable inhibición del crecimiento a 4 μ g/ml (Figura 5B). *P. spinosum* y *P. ultimum* fueron las más sensibles a la occidiofungina, con una MIC de 1 μ g/ml y 2 μ g/ml, respectivamente. Estos datos indican que la occidiofungina tiene una posible aplicación como un potente agente antifúngico de amplio espectro contra los patógenos fúngicos de plantas y animales.

La occidiofungina altera la integridad de la membrana. En estos estudios se utilizaron hifas y células de edad equivalente. Las hifas de *R. solani* que crecen en concentraciones subinhibidoras de occidiofungina (0,5 μ g/ml) se

compararon con las hifas de *R. solani* que crecen en ausencia del compuesto antifúngico. Hubo una reducción de más del 50 % en el crecimiento de *R. solani* en esta concentración (Figura 5A). La occidiofungina indujo cambios morfológicos hifales significativos, siendo uno de los cambios más notables la formación de inclusiones intracelulares (Figura 6), paneles A y B, flechas negras sólidas). Otra diferencia notable fue la deformación de las puntas de las hifas y el patrón ondulado de la membrana celular después de la exposición a occidiofungina (Figura 6), paneles A y B, flechas huecas). La misma observación se hizo sobre la morfología de las hifas de *M. phaseolina* cultivadas bajo concentraciones subinhibidoras (no se muestra). Las artrósporas de *G. candidum* expuestas a 4 µg/ml de occidiofungina durante 48 horas mostraron formas amorfas debido a la inflamación celular posterior a la exposición (Figura 6, paneles C y D) en comparación con las células no tratadas. Los datos de TEM muestran una drástica disminución en el espesor de la pared celular de *G. candidum* después de la exposición a concentraciones subinhibidoras de occidiofungina durante 48 horas (Figuras 7A, 7B, y 7C). Además, lo que parece ser un desprendimiento de la pared celular está presente en la muestra tratada (Figuras 7A, 7B, flechas negras sólidas), lo que sugiere que la integridad de la pared celular se ve afectada por la exposición a la occidiofungina. La falta de contraste celular interna en la *G. candidum* tratada también sugiere que la célula se ha lisado (Figuras 7A, 7B, flechas huecas). Presumiblemente, la pared celular más delgada es incapaz de mantener la presión osmótica. No se puede hacer ninguna declaración acerca de la hinchazón a partir de los datos de la TEM, dado que las artrósporas son cilíndricas y la posibilidad de seccionarlas es alta. Una vista más amplia que muestra varias artrósporas muestra que algunas de ellas retienen una apariencia cilíndrica (Figura 7C); no obstante, todas comparten las mismas deformidades morfológicas internas y en la pared celular, tal como se observa en la artróspora mostrada en la Figura 7B. Estas observaciones indican que la occidiofungina se dirige a la integridad de la membrana al alterar la formación de la pared celular y que la occidiofungina puede inhibir la función enzimática, ya que la formación de cuerpos de inclusión visibles se atribuye generalmente a la acumulación de sustrato.

ANÁLISIS

Los hallazgos de este estudio incluyen: la elucidación de la estructura de occidiofungina que contiene un nuevo aminoácido; la caracterización de la actividad antifúngica de amplio espectro de occidiofungina; y la observación *in vivo* de las inclusiones celulares y de la inestabilidad de las membranas después de la exposición al compuesto antifúngico.

La caracterización estructural confirma que la occidiofungina es un agente antifúngico único. Los datos estructurales proporcionaron asignaciones de aminoácidos que permitieron distinguir entre las dos variantes estructurales de occidiofungina, occidiofungina A y occidiofungina B.

Se identificó un nuevo aminoácido que se caracteriza por los datos de RMN. Se desconoce la importancia de este residuo único para la actividad antifúngica, pero es un área de enorme interés para nuestro grupo. Además, dos derivados de aminoácidos, β-hidroxi Asn (exclusivo de occidiofungina B) y β-hidroxi Tyr fueron identificados en los datos de RMN. Todavía no se ha logrado la separación cromatográfica de cada variante. Por lo tanto, aún no se sabe si la hidroxilación del carbono beta de Asn 1 es importante para la bioactividad del compuesto. El dramático desplazamiento en las frecuencias de amida de los residuos cerca de β-hidroxi Asn 1 sugiere que la conformación del péptido cambió después de la hidroxilación del carbono beta de Asn 1.

Se desconoce el mecanismo exacto de actividad de la occidiofungina, pero este estudio proporciona una base sólida para comenzar experimentos para dilucidar el mecanismo de acción. La occidiofungina demostró una fuerte actividad inhibidora contra dos especies de *Pythium*. *Pythium* no es un hongo verdadero y el ergosterol no está presente como estero principal en sus membranas celulares; por consiguiente, es insensible a los antifúngicos que se orientan selectivamente al ergosterol. Por lo tanto, la actividad antifúngica de occidiofungina presumiblemente no implica la unión de ergosterol o la inhibición de la síntesis de ergosterol. También es importante destacar que la pared celular de *Pythium* no contiene quitina, y que este oomiceto contiene una gran cantidad de β-glucano en su pared celular. Por lo tanto, tampoco es probable que la occidiofungina se oriente selectivamente a la síntesis de quitina.

La morfología de los hongos expuestos a occidiofungina se asemeja a la morfología notificada en la literatura de hongos expuestos a equinocandinas, lo que sugiere que la occidiofungina puede orientarse selectivamente a la síntesis de glucano. *A. fumigatus* expuesta a concentraciones inhibidoras de micafungina, una equinocandina, mostró una ráfaga de hifas y mostró membranas onduladas y puntas de hifas deformadas a concentraciones subinhibidoras. *Candida albicans* expuesta a dosis letales de equinocandinas induce hinchazón y en dosis subinhibidoras se observaron cambios morfológicos anormales en la membrana. La formación de morfología de la membrana aberrante en *A. fumigatus* es similar a la observada cuando *R. solani* y *M. phaseolina* se cultivaron bajo concentraciones subinhibidoras y la hinchazón celular de *C. albicans* se parece a la observada para *Geotrichum candidum* expuesta a una dosis subinhibidora de occidiofungina. De forma interesante, *Fusarium* spp., son resistentes a las equinocandinas. El mecanismo de resistencia se atribuye a mutantes naturales en la subunidad catalítica de la enzima (1,3)-β-glucano sintasa y a diferencias naturales en la estructura de la pared celular, de manera específica, *Fusarium* spp., posee menos de 1,3-β-glucanos. Mientras que la MIC de *F. oxysporum* fue >32 µg/ml en este estudio, la occidiofungina redujo drásticamente el crecimiento de este hongo a 16 µg/ml. Estudios adicionales explorarán si la occidiofungina inhibe la síntesis de la pared de la célula fúngica compuesta por glucanos,

en particular su capacidad para inhibir (1,3)- β -glucano sintasa. La formación de la pared celular y las respuestas al daño de la pared celular implican una intrincada red de señalización celular, que orquesta la comunicación entre la superficie de la pared celular fúngica y las enzimas biosintéticas para su síntesis y reparación. Por consiguiente, el mecanismo exacto de acción de la occidiofungina podría implicar una diana completamente nueva.

Una composición que comprende la presente invención puede ser administrada a un sujeto animal o planta en una cantidad terapéuticamente eficaz, dependiendo de la gravedad de la infección o enfermedad, previniendo o disminuyendo así cualquier efecto a corto o largo plazo de la infección por hongos.

Esta divulgación ha descrito y caracterizado por primera vez un conjunto de compuestos antifúngicos novedosos y extremadamente eficaces para su aplicación en la prevención y reducción de un amplio intervalo de infecciones fúngicas en sujetos humanos, animales, y plantas, así como la nueva cepa bacteriana aislada que produce los compuestos antifúngicos.

REFERENCIAS CITADAS

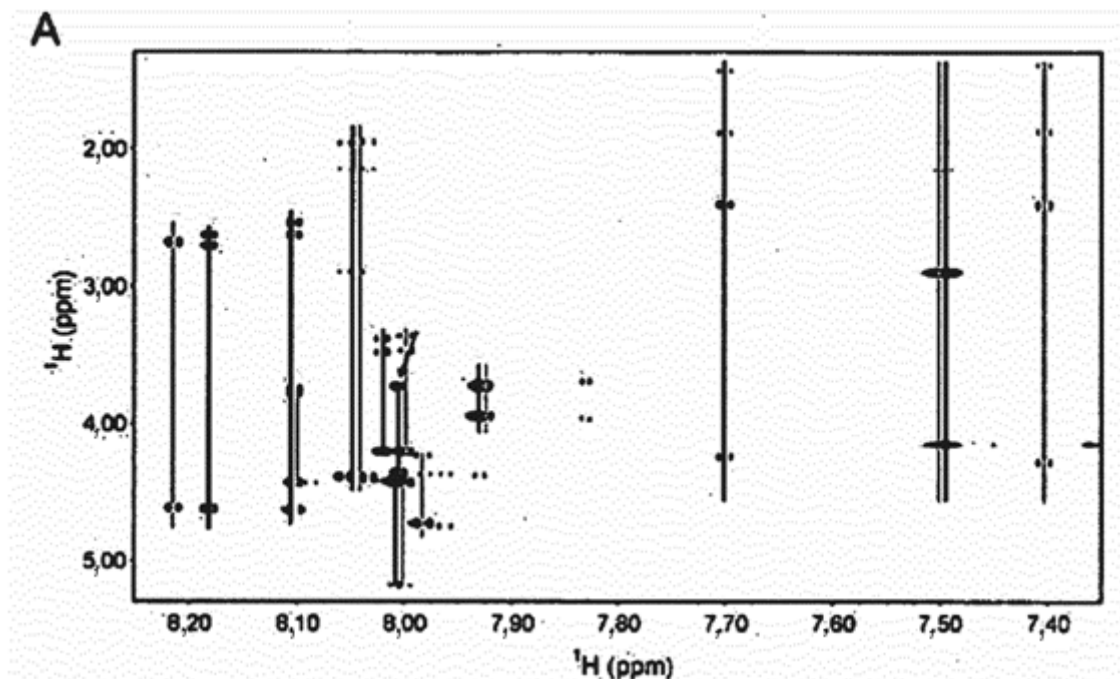
- Cook, R. R., y Baker, K. F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Lu, S-E., Woolfolk, S., y Caceres, J. (2005) Isolation and identification and genetic analysis of rhizobacteria antagonistic to plant soilborne fungal pathogens. *Phytopathology* 95, 62-63.
- Gu, G. Y., Smith, L., Wang, N., Wang, H., y Lu, S-E. (2009) Biosynthesis of an antifungal oligopeptide in *Burkholderia contaminans* strain MS 14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 328-332.
- Gu, G., Wang, N., Chaney, N., Smith, L., y Lu, S-E. (2009) AmbR1 is a key transcriptional regulator for production of antifungal activity of *Burkholderia contaminans* strain MS14. *FEMS Microbiol. Lett.* aceptado el 5 de mayo de 2009.
- Ghannoum, M. G., y Rice, L. B. (1999) Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of these Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 501 -517.
- Kavanagh, K. (2007) *New Insights in Medical Mycology*, Springer, Nueva York, NY.
- Lorian, V. (2005), *Antibiotics in laboratory medicine*, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.
- Hashimoto, S. (2009) Micafungin: a sulfated echinocandin. *J. Antibiot.* 62, 27-35.
- Ikeda, F., Tanaka, S., Ohki, H., Matsumoto, S., Maki, K., Katashima, M., Barrett, D., y Aoki, Y. (2007) Role of micafungin in the antifungal armamentarium. *Curr. Medic. Chem.* 14, 1263-1275.
- de Groot, P. W. J., de Boer, A. D., Cunningham, J., Dekker, H. L., de Jong, L., Hellingwerf, K. J., de Koster, C., y Klis, F. M. (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot. Cell* 3, 955-965.
- Klis, F. M., de Groot, P., y Hellingwerf, K. (2001) Molecular organisation of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 39, 1-8.
- Munro, C. A. y Gow, N. A. R. (2001) Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 39, 41-53.
- Roncero, C. (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41, 367-378.
- Douglas, C. M., D'Ippolito, J. A., Shei, G. J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J. A., Li, W., Abruzzo, G. K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A., y Kurtz, M. B. (1997) Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41,2471-2479.
- Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., y Visca, P. (2006) *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol.* 14, 277-286.
- Mahenthalingam, E., Baldwin, A., y Dowson, C. G. (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1539-1551.
- Walker, L. A., Munro, C. A., de Bruijn, I., Lenardon, M. D., McKinnon, A., y Gow, N. A. R. (2008) Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* 4(4), e1000040.
- Nishiyama, Y., Hasumi, Y., Ueda, K., Uchida, K., y Yamaguchi, H. (2005) Effects of micafungin on the morphology of *Aspergillus fumigatus*. *J. Electron Microsc.* 54, 67-77.
- Nakai, T., Hatano, K., Ikeda, F., y Shibuya, K. (2005) Electron microscopic findings for micafungin-treated experimental pulmonary aspergillosis in mice. *Med. Mycol.* 43, 439-445.
- Angiolella, L., Maras, B., Stringaro, A. R., Arancia, G., Mondello, F., Girolamo, A., Palamara, A. T., y Cassone, A. (2005) Glucan-associated protein modulations and ultrastructural changes of the cell wall in *Candida albicans* treated with micafungin, a water-soluble, lipopeptide antimycotic. *J. Chemother.* 17, 409-416.
- Tomana, M., Prchal, J., Garner, L., Skalka, H., y Barker, S. (1984) Gas chromatographic analysis of lens monosaccharides. *J. Lab. Clin. Med.* 103, 137-142.
- Renfrow, M. B., Cooper, H. J., Tomana, M., Kulhavy, R., Hiki, Y., Toma, K., Emmett, M. R., Mestecky, J., Marshal, A. G., y Novak, J. (2005) Determination of aberrant O-glycosylation in the IgA1 hinge region by electron capture dissociation Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 280, 19136-19145.
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, Nueva York.
- Braunschweiler, L., y Ernst, R. R. (1983) Coherence Transfer By Isotropic Mixing - Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 53, 521-528.
- Kumar, A., Ernst, R. R., y Wüthrich, K. (1980) A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement (2D NOE) Experiment for the Elucidation of Complete Proton-Proton Cross-Relaxation Networks in Biological Macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1-6.

- Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J., Warren, C. D., y Jeanloz, R. W. (1984) Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 811-813.
- Bodenhausen, G., y Ruben, D. J. (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 69, 185-188.
- 5 Hwang, T. L., y Shaka, A. J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J. Magn. Reson.* A112, 275-279.
- Dalvit, C. (1998) Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules. *J. Biomol. NMR.* SL1,437-444.
- Shaka, A. J., Lee, C. J., y Pines, A. (1988) Iterative Schemes for Bilinear Operators - Application to Spin
- 10 Decoupling. *J. Magn. Reson.* 77, 274-293.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., y Bax, A. (1989) Rapid Recording of 2D NMR-Spectra without Phase Cycling - Application to the Study of Hydrogen-Exchange in Proteins. *J. Magn. Reson.* 85, 393-399.
- Kay, L. E., Keiffer, P., y Saarinen, T. (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10663-10665.
- 15 Boban, J. K., Plant, D., y Hurd, R. E. (1992) Improved Proton-Detected Heteronuclear Correlation Using Gradient-Enhanced z and zz filters. *J. Magn. Reson.* A101, 113.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., y Bax, A. (1995) NMRpipe - a Multidimensional Spectral Processing System Based on Unix Pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277-293.
- Johnson, B. A., y Blevins, R. A. (1994) NMRView - a Computer-Program for the Visualization and Analysis of
- 20 NMR Data. *J. Biomol. NMR* 4, 603-614.
- Gross, D., y DeVay, J. (1977) Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plant Pathol.* 11, 13-28.
- Nishiyama, Y., Uchida, K., y Yamaguchi, H. (2002) Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandinlike lipopeptide. *J. Electron Microsc.* 51,247-255.
- 25 Lin, S., Liehr, S., Cooperman, B.S., y Cotter, R. J. (2001) Sequencing cyclic peptide inhibitors of mammalian ribonucleotide reductase by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* 36, 658-663.
- Frias, H. V., Mendes, M. A., Cardozo, K. H. M., Carvalho, V. M., Tomazela, D., Colepicolo, P., y Pinto, E. (2006) Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 741-746.
- 30 Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., y Thomas, M. G. (2008) Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Mol. Pharm.* 5, 191-211.
- Waelder, S., Lee, L., y Redfield, A. G. (1975) Nuclear magnetic resonance studies of exchangeable protons. I. Fourier transform saturation-recovery and transfer of saturation of the tryptophan indole nitrogen proton. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 2927-2928.
- 35 Krishnan-Natesan, S., y Chandrasekar, P. H. (2008) Current and future therapeutic options in the management of invasive aspergillosis. *Drugs* 68, 265-282.
- Ngwogu, A. C., y Otokunefor, T. V. (2007) Epidemiology of dermatophytoses in a rural community in Eastern Nigeria and review of literature from Africa. *Mycopathologia* 164, 149-158.
- 40 Yaghmour, M. A., Inderbitzin, P., Bostock, R. M., y Michailides, T. J. (2008) Characterization of *Geotrichum candidum* causing sour rot of peaches and nectarines in California. *Phytopathology* 98, S175-S175.
- Sfakianakis, A., Krasagakis, K., Stefanidou, M., Maraki, S., Koutsopoulos, A., Kofteridis, D., Samonis, G., y Tosca, A. (2007) Invasive cutaneous infection with *Geotrichum candidum* - sequential treatment with amphotericin B and voriconazole. *Med. Mycol.* 45, 81-84.
- 45 Pereira, D. I. B., Santurio, J. M., Alves, S. H., Argenta, J. S., Potter, L., Spanemberg, A., y Ferreira, L. (2007) Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1168-1171.
- Argenta, J. S., Santurio, J. M., Alves, S. H., Pereira, D. I. B., Cavaleiro, A. S., Spanemberg, A., y Ferreira, L. (2008) *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 767-769.
- 50 Popolo, L., Gualtieri, T., y Ragni, E. (2001) The yeast cell-wall salvage pathway. *Med. Mycol.* 39, 111-121.
- Levin, D. E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol.Rev.* 69, 262-291.
- Douglas, C. M. (2001) Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* 39, 55-66.

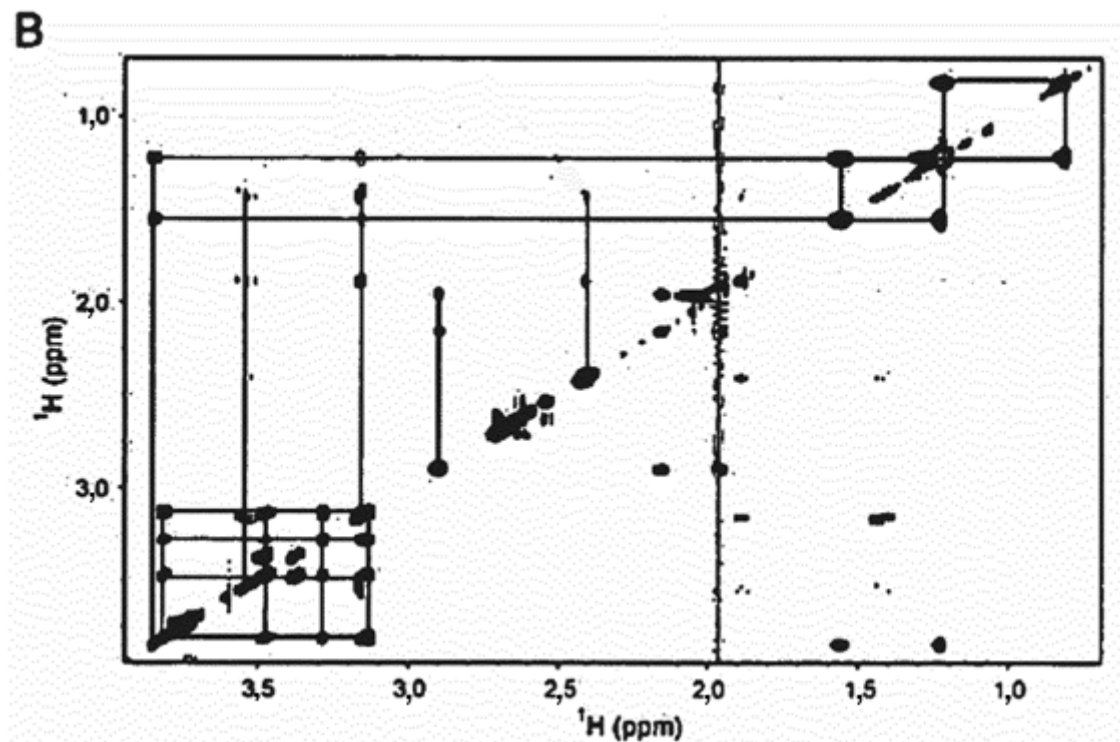
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de glicopéptido cíclico antifúngico, y sales farmacéutica y agrícolamente aceptables del mismo, para evitar o tratar una infección o enfermedad fúngica, siendo dicho glicopéptido cíclico derivado de la cepa bacteriana *Burkholderia contaminans*; **caracterizado por** tener dos variantes estructurales con una masa monoisotópica de 1199,543 Da y 1215,518 Da, correspondiendo la diferencia a la masa de un átomo de oxígeno, compuesto por ocho aminoácidos, dos de los cuales son derivados β -hidroxi de tirosina (Tyr) y de asparagina (Asn) y un nuevo aminoácido que sirve como armazón para la fijación de un azúcar de xilosa y una cadena de acilo corta; y además se **caracteriza por** tener el siguiente espectro de RMN A de espectroscopia de correlación total (TOCSY)

A:



y por tener el siguiente espectro de RMN 2D de espectroscopia de efecto nuclear Overhauser (NOESY) B:



- siendo dichos espectros obtenidos al disolver una muestra de 5 mM del glicopéptido cíclico en 50 % de acetonitrilo-d₃ y 50 % de agua, en un volumen total de 700 µl, y recopilar los datos de RMN a una frecuencia de protón de 800 MHz, una anchura de barrido espectral de 9000,0 Hz en las dimensiones del protón y del carbono, una temperatura de 25 °C con la frecuencia portadora centrada en una frecuencia de resonancia de agua mientras se suprime la resonancia de agua mediante una técnica de eco selectiva con gradiente de campo de doble impulso, con adquisición de datos, para el espectro A de RMN TOCSY, que utiliza un tiempo de mezcla de 60 milisegundos utilizando la secuencia DIPSI-2 y que emplea un retardo de relajación de 1,5 segundos entre barridos, y con adquisición de datos, para el espectro B de RMN 2D NOESY, que utiliza un tiempo de mezcla de 400 milisegundos utilizando la secuencia DIPSI-2 y que emplea un retardo de relajación de 1,5 segundos entre barridos.
2. Un compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1 para tratar patógenos fúngicos de plantas, animales y/o humanos que comprende la etapa que consiste en poner en contacto al menos un patógeno fúngico de plantas, animales y/o humanos con el compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de al menos un patógeno fúngico de plantas, animales, y/o humanos.
4. Un procedimiento de tratamiento de una infección o enfermedad fúngica en una planta que comprende la etapa que consiste en poner en contacto el sitio de infección o enfermedad fúngica con el compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Utilización del compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de una infección o enfermedad fúngica en una planta.
6. Un compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1 para alterar la morfología de la membrana celular de al menos un patógeno fúngico de plantas, animales y/o humanos que comprende la etapa que consiste en poner contacto la membrana celular con el compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1.
7. Un compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1 para alterar la morfología de la membrana celular de al menos un patógeno fúngico de plantas, animales, y/o humanos.
8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto antifúngico de acuerdo con la reivindicación 1 y al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que al menos un vehículo o diluyente es un vehículo o diluyente agrícolamente aceptable.

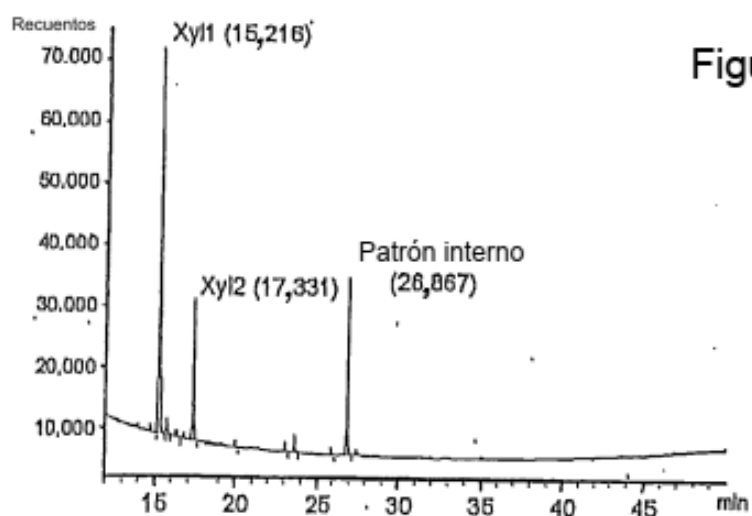


Figura 1

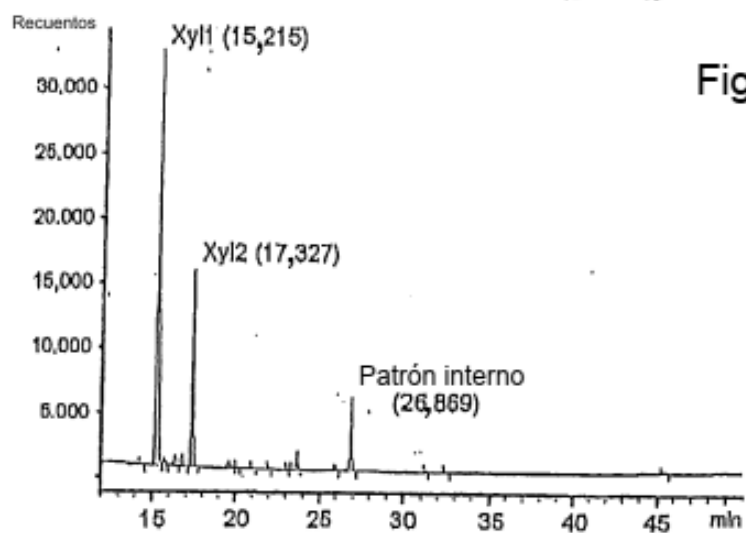


Figura 2

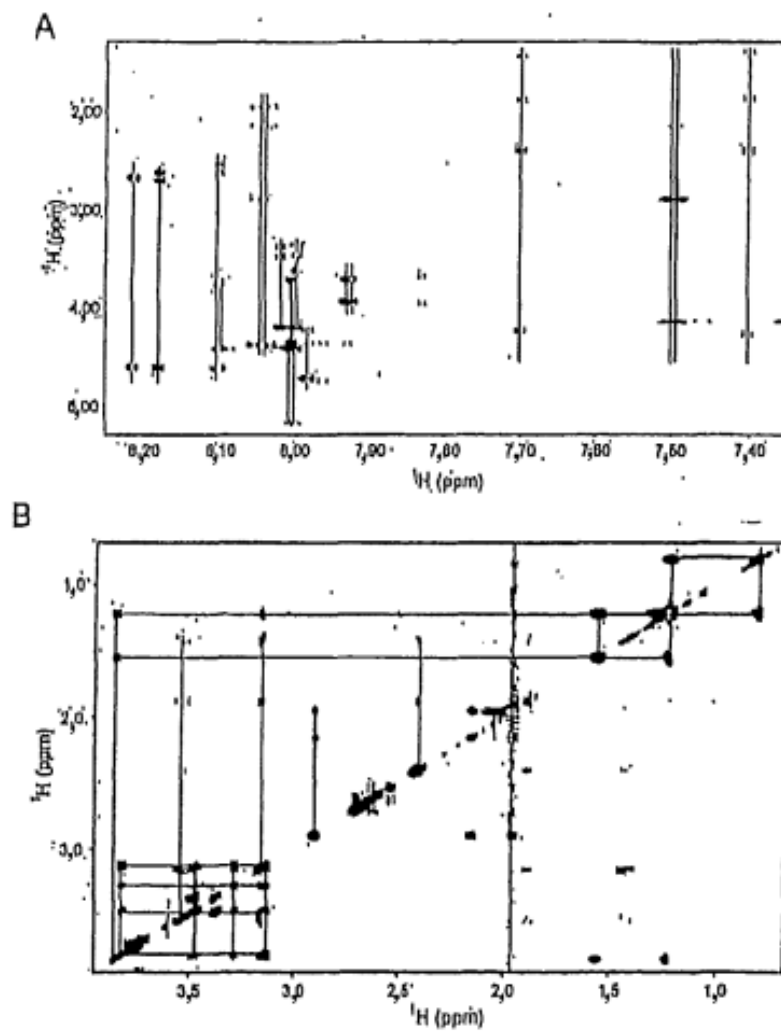


Figura 3

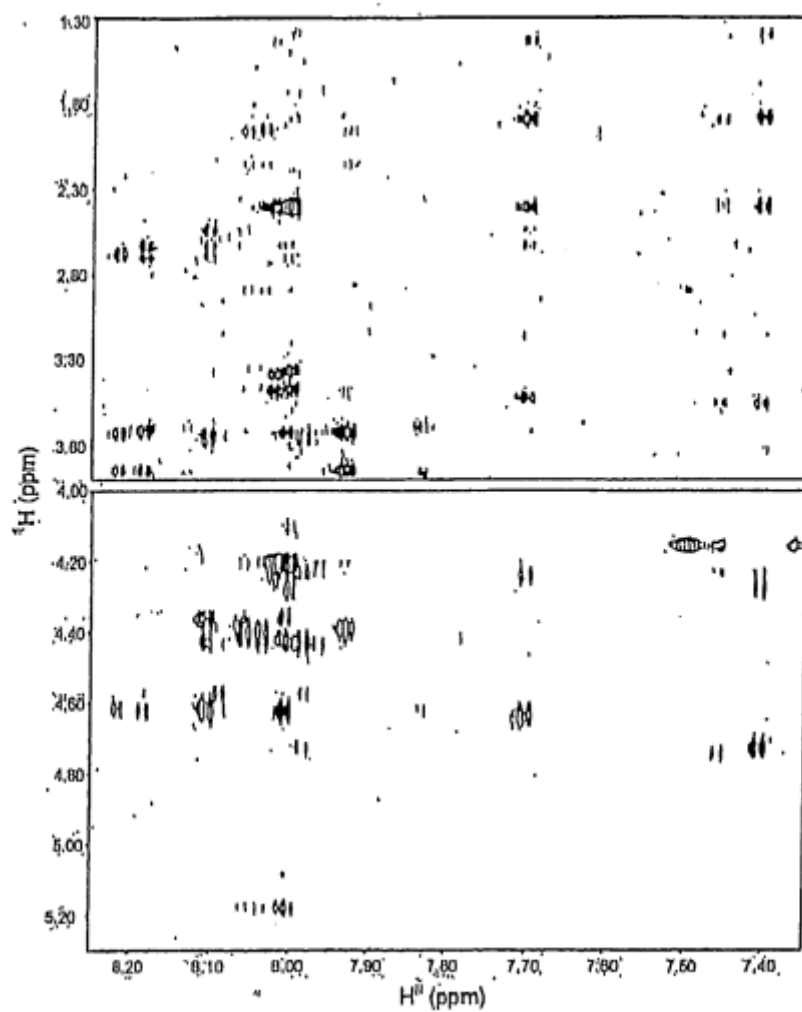


Figura 4

A

Organismo	MIC (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	Patógeno
<i>Alternaria alternata</i>	8	1	Planta y animal
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8	1	Animal
<i>Aspergillus niger</i>	4	0,25	Planta y animal
<i>Fusarium oxysporum</i>	>32	16	Planta
<i>Geotrichum candidum</i>	8	4	Planta y animal
<i>Macrophomina phaseolina</i>	2	0,25	Planta
<i>Microsporum gypseum</i>	4	1	Animal
<i>Penicillium sp.</i>	32	16	Planta y animal
<i>Pythium spinosum</i>	1	0,5	Planta
<i>Pythium ultimum</i>	2	1	Planta
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	0,5	Planta
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4	2	Planta y animal

B

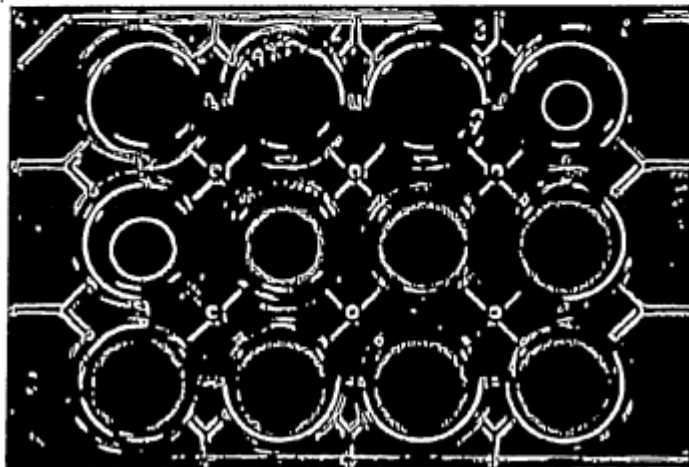


Figura 5

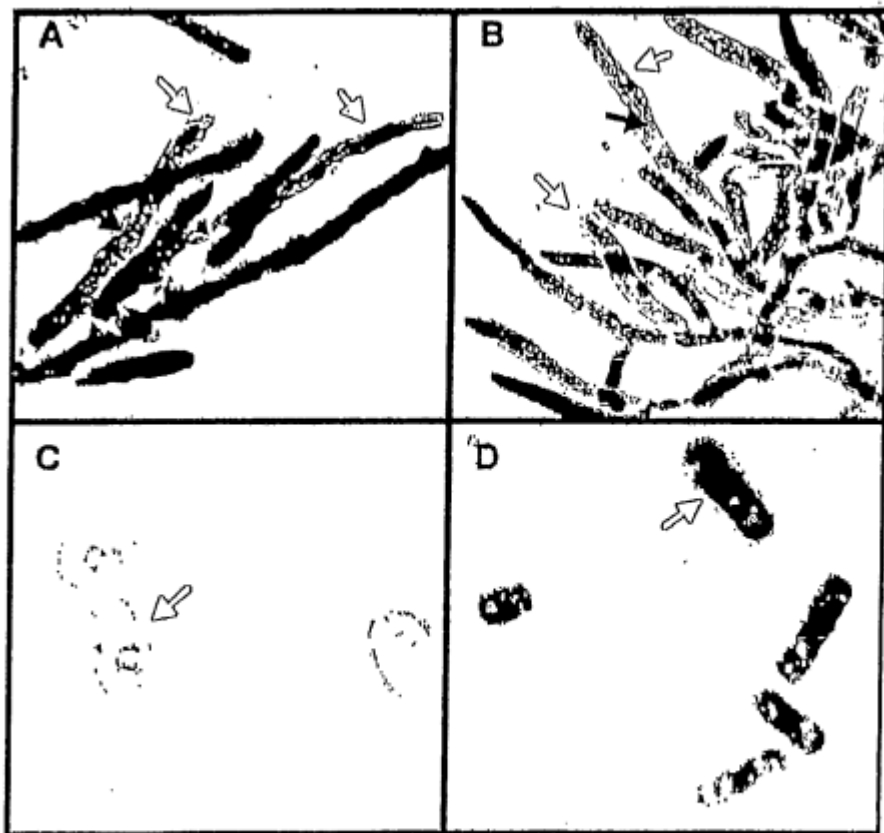


Figura 6

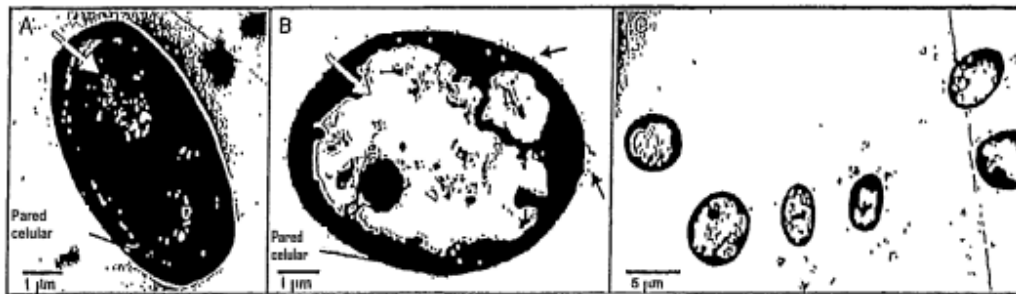


Figura 7