



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 192**

51 Int. Cl.:
C07D 209/20 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01)
C07D 307/54 (2006.01)
A01N 43/08 (2006.01)
A61K 31/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00970605 .2**
86 Fecha de presentación : **05.10.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1224168**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.07.2002**

54 Título: **Enodiinos antifúngicos.**

30 Prioridad: **07.10.1999 US 158099 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **PHYTERA, Inc.**
205 Newbury Street, Suite 407
Framingham, Massachusetts 01701, US

72 Inventor/es: **Cui, Baoliang;**
McAlpine, James, Bruce;
Talbot, Maureen, Kelly y
Yang, Shu-Wei

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 269 192 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

Enodións antifúngicos.

5 **Antecedentes de la invención**

La invención se refiere a compuestos útiles para inhibir infecciones fúngicas.

10 Las infecciones fúngicas (micosis) pueden contribuir y complicar muchas enfermedades, incluyendo enfermedades pulmonares y enfermedades del tracto respiratorio. El número de casos de infecciones fúngicas oportunistas ha aumentado, particularmente en pacientes inmunocomprometidos, tales como aquellos con SIDA, aquellos que están experimentando quimioterapia, y aquellos que están experimentando terapia para prevenir el rechazo de injertos después de una cirugía de trasplante de órganos.

15 En animales, las infecciones fúngicas pueden ser cutáneas, subcutáneas o sistémicas. Las micosis superficiales incluyen tiña del cuero cabelludo, tiña del cuerpo, tiña de los pies, onicomycosis (por ejemplo, hongo en las uñas), perionicomycosis, tiña versicolor, candidiasis bucal, y otras candidiasis tales como las vaginales, del tracto respiratorio, biliares, esofágicas, y del tracto urinario. Las micosis sistémicas incluyen candidiasis sistémicas y mucocutáneas, criptococcosis, aspergilosis, mucormycosis, paracoccidiomycosis, blastomycosis de Norteamérica, histoplasmosis, coccidiomycosis y esporotricosis.

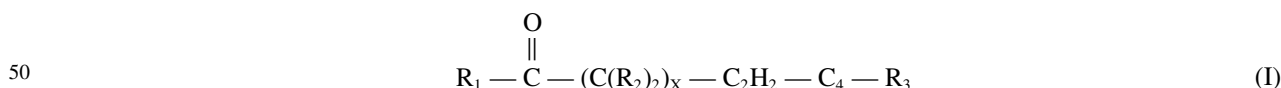
20 Las plantas también son susceptibles a infecciones fúngicas. Las enfermedades de las plantas están causadas por una miríada de patógenos fúngicos invasivos que se incluyen dentro de muchos géneros, por ejemplo: hongos que dan lugar a pudrición blanda (por ejemplo, *Rhizopus spp.*), enfermedad de las hojas (por ejemplo, *Taphrina spp.*), moho polvoriento (por ejemplo, *Sphaerotheca spp.*), manchas foliares (por ejemplo, *Fulvia spp.*), roya (por ejemplo, *Alternaria spp.*), tizón (por ejemplo, *Magnaporthe spp.*), pudrición negra (por ejemplo, *Guignardia spp.*), sarna (por ejemplo, *Venturia spp.*), marchitamiento (por ejemplo, *Fusarium spp.*), herrumbre (por ejemplo, *Puccinia spp.*), hongos del carbón (por ejemplo, *Ustilago spp.*) y canchales (por ejemplo, *Rhizoctonia spp.*).

30 Los ejemplos de organismos patógenos incluyen dermatofitos (por ejemplo, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *M. distortum*, *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *M. rivalieri*, *M. fulvum*, *M. cookei*, *M. vanbreuseghemii*, *M. persicolor*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. menginii*, *T. nanum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum*, *T. soudanense*, *T. violaceum*, *T. yaoundei*, *T. gourvilii*, *T. simii*, *T. ajelloi*, *Hendersonula toruloidea*), levaduras (por ejemplo, *Candida albicans*, *C. tropicalis*), *Torulopsis glabrata*, *Epidermophyton floccosum*, *Malassezia furfur* (*Pityrosporon orbiculare*, *P. ovale*), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y otros *Aspergillus spp.*, *Zygomycetes* (por ejemplo, *Rhizopus*, *Mucor*), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, y *Sporothrix schenckii*.

40 Towers *et al.* Plant and Medica N° 3 1985 pág. 225-229 describe las propiedades antibióticas de la thiarubrina A, un polímero de ditiaclohexadieno de origen natural. Glazunova *et al.*, Antibiotiki Vol. N° 9 1967 pág. 767-771 describe la actividad antibacteriana y antifúngica de ciertos acetilenos. El documento US-A-3475462 describe una cetona acetilénica conjugada que se puede usar como parasiticida.

Sumario de la invención

45 En un aspecto, la invención presenta un compuesto sustancialmente puro que tiene la fórmula:

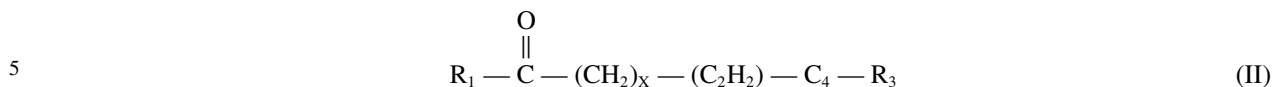


en la que R₁ es un grupo hidroxilo o un resto que se puede remplazar por un grupo hidroxilo en una reacción de hidrólisis; cada R₂ es, independientemente, H o un resto hidrocarbonado monovalente que contiene entre 1 y 4 átomos de carbono, ambos incluidos; R₃ es un anillo pirrol, furano o tiofeno; y X es un número entero entre 4 y 10, ambos incluidos. En todos los compuestos de la invención (Compuestos I-V), la suma de los carbonos de los restos R₂ es preferiblemente menor de 15. Más preferiblemente, la suma de los carbonos de los restos R₂ es menor de 9, y mucho más preferiblemente, menor de 5. Mucho más preferiblemente cada R₂ es H o, como alternativa, cada R₂ es, independientemente, H, CH₃ o C₂H₅. En otras realizaciones preferidas, R₃ es un anillo furano, y X es un número entero entre 5 y 7, ambos incluidos. Los compuestos reivindicados son capaces de inhibir el crecimiento de una célula fúngica (por ejemplo, especies de *Candida* o un dermatofito). Los compuestos de la invención se pueden mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. En un ejemplo preferido, la composición se formula para aplicación tópica.

65

ES 2 269 192 T3

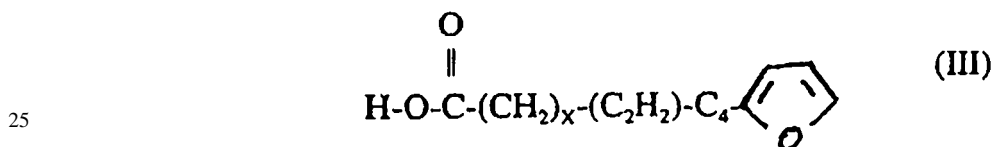
En otro aspecto, la invención presenta un compuesto sustancialmente puro que tiene la fórmula:



10 en la que R_1 es OH, NH_3 , OCH_3 , u OC_2H_5 ; R_3 es un anillo pirrol, furano o tiofeno; y X es un número entero entre 5 y 7, ambos incluidos. En compuestos preferidos, R_1 es OH y/o R_3 es un anillo furano. Estos compuestos también se pueden proporcionar como composiciones farmacéuticamente aceptables y se pueden usar para inhibir el crecimiento de células fúngicas, por ejemplo, para tratar infecciones fúngicas en plantas y animales, incluyendo seres humanos. Preferiblemente, el compuesto inhibe el crecimiento de células fúngicas en al menos un 25%, más preferiblemente en al menos un 50%, y con mucho más preferiblemente en al menos un 90%, determinado por un ensayo convencional descrito en este documento.

15 Los compuestos de la invención, además de ser útiles para tratar infecciones fúngicas, se pueden usar para prevenir infecciones fúngicas.

20 Los compuestos preferidos dentro de la fórmula (II) tienen la fórmula:



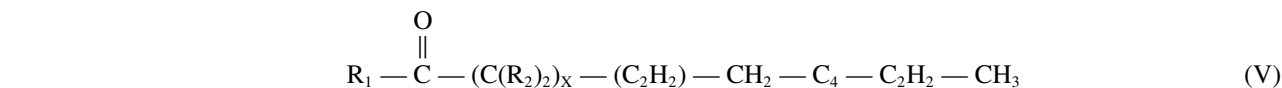
30 en la que X es un número entero entre 5 y 7, ambos incluidos. Estos compuestos se pueden aislar de un cultivo líquido de *Anarrhinum*. Un método preferido incluye las etapas de (a) poner en contacto un cultivo líquido de *Anarrhinum* con un inhibidor de la metilación del ADN; (b) después de al menos tres días, poner en contacto el cultivo, o un subcultivo del mismo, con un elicitador; y (c) extraer el compuesto del cultivo en contacto con el elicitador, o un subcultivo del mismo. El método también puede incluir, entre la etapa (a) y la etapa (b), la etapa de subcultivar el cultivo. Preferiblemente, el cultivo líquido se subcultiva al menos dos veces. Como alternativa, estos compuestos se pueden preparar por las etapas de (a) iniciar un cultivo de callo de una siembra de *Anarrhinum*; (b) cultivar el cultivo de callo iniciado; (c) iniciar un cultivo líquido a partir del cultivo de callo, (d) poner en contacto el cultivo líquido con un inhibidor de la metilación del ADN; (e) subcultivar el cultivo líquido en contacto con el inhibidor de la metilación del ADN; (f) poner en contacto el subcultivo con un elicitador; y (g) extraer el compuesto del cultivo en contacto con el elicitador, o un subcultivo del mismo. Ni la etapa del inhibidor de la metilación del ADN ni la etapa del elicitador es necesaria para que el cultivo líquido de *Anarrhinum* produzca los compuestos de la invención, la inclusión de estas etapas aumentará su rendimiento.

40 En otro aspecto, la invención presenta un compuesto sustancialmente puro que tiene la fórmula:



50 en la que R_1 es un grupo hidroxilo o un resto que se puede remplazar por un grupo hidroxilo en una reacción de hidrólisis; cada R_2 es, independientemente, H o un resto hidrocarbonado monovalente que contiene entre 1 y 4 átomos de carbono, ambos incluidos; y X es un número entero entre 3 y 9, ambos incluidos. Estos compuestos son útiles para inhibir el crecimiento de células fúngicas, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de infecciones fúngicas en plantas y animales, incluyendo seres humanos.

55 En otro aspecto, la invención presenta un compuesto sustancialmente puro que tiene la fórmula:



65 en la que R_1 es un grupo hidroxilo o un resto que se puede remplazar por un grupo hidroxilo en una reacción de hidrólisis; cada R_2 es, independientemente, H o un resto hidrocarbonado monovalente que contiene entre 1 y 4 átomos de carbono, ambos incluidos; y X es un número entero entre 3 y 9, ambos incluidos. Estos compuestos son útiles para inhibir el crecimiento de células fúngicas, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de infecciones fúngicas en plantas y animales, incluyendo seres humanos.

Los compuestos de la invención muestran una amplia actividad antifúngica y una elevada actividad específica, y son por tanto útiles para el tratamiento o prevención de infecciones fúngicas tanto en plantas como en animales,

incluyendo animales y plantas vivos, y productos vegetales (por ejemplo, trigo o forraje). Los animales incluyen mamíferos, particularmente seres humanos, así como animales domésticos criados para alimentación o como mascotas, tales como caballos, vacas, ovejas, aves de corral, peces, cerdos, gatos, perros y animales de zoo. Las plantas incluyen árboles, cultivos, pastos, y plantas de flor.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una ilustración esquemática que muestra la estructura de los Compuestos 1-7.

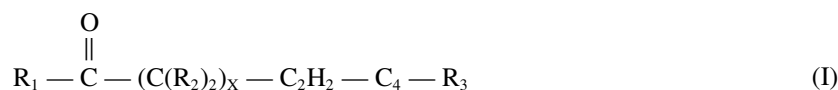
La Fig. 2 es una ilustración esquemática que muestra un método de síntesis de los Compuestos 1, 5 y 7.

Descripción detallada

Se han aislado nuevos compuestos antifúngicos de cultivos de plantas tratados en orden con un inhibidor de la metilación y un elicitor. Estos y compuestos relacionados, que se pueden preparar usando técnicas de síntesis orgánica convencional, son útiles para la prevención o tratamiento de infecciones fúngicas.

Compuestos

En los compuestos de la fórmula I:

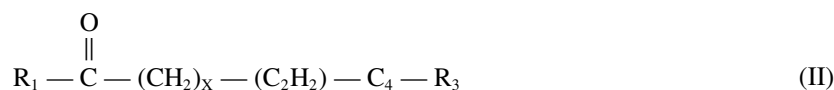


el resto preferido del R_2 es H, como se ejemplifica en este documento por los compuestos 1-7 (Fig. 1). Como alternativa, uno o más restos R_2 se pueden reemplazar por restos hidrocarbonados tales como grupos metilo, etilo, propilo o butilo (o una combinación de los mismos), sin pérdida sustancial de actividad antifúngica. Preferiblemente, la suma de los carbonos en los restos R_2 es menor de 15, más preferiblemente menor de 9, y más preferiblemente menor de 5.

En compuestos preferidos, tales como los compuestos 1-3, 5 y 7, R_3 es un anillo furano. Usando métodos convencionales de síntesis química, este anillo se puede reemplazar por un anillo pirrol o tiofeno; como la estructura terciaria y la distribución de carga de los tres anillos es similar, los compuestos que tienen estos últimos anillos probablemente también tienen actividad antifúngica.

La variable X indica la longitud de una estructura de carbono saturada. La actividad antifúngica de los compuestos reivindicados cambia en parte en base a la longitud de esta estructura. Por ejemplo, los Compuestos 1, 5 y 7 (X=7) tuvieron la mayor actividad anti-Candida, seguidos por el Compuesto 3 (X=6), y luego el Compuesto 2 (X=5). Preferiblemente, X es un número entero entre 5 y 7, ambos incluidos, aunque cadenas de carbono más largas (X=8-10) pueden conservar o aumentar la actividad antifúngica.

Un grupo preferido de compuestos tiene la fórmula:



en la que R_1 es OH, NH_2 , OCH_3 , o OC_2H_5 , R_2 es un anillo pirrol, furano o tiofeno; y X es un número entero entre 5 y 7, ambos incluidos. Incluso más preferiblemente, R_1 es OH, R_2 es un anillo furano. Los compuestos dentro de esta fórmula (por ejemplo, los compuestos 1-3, 5 y 7) tienen una estructura hidrocarbonada que está sin sustituir.

La producción aumentada de compuestos purificados de fórmulas III, IV y V se indujo en cultivos de células y tejidos vegetales siguiendo dos tratamientos por orden: tratamiento con un inhibidor de la metilación del ADN y tratamiento con un elicitor. El tratamiento con un inhibidor de la metilación del ADN se proporciona a una siembra no germinada, a una siembra en germinación, a un cultivo de explante o de tejido, o a un cultivo líquido. También se consideran tratamientos sucesivos con un inhibidor de la metilación del ADN. Por ejemplo, la invención abarca un método que incluye tratar una siembra no germinada con un inhibidor de la metilación del ADN (primer tratamiento), germinar la siembra tratada, hacer crecer un callo de tejido obtenido de la siembra germinada, inducir la suspensión del callo, y tratar un subcultivo de suspensión líquida con un inhibidor de la metilación del ADN (segundo tratamiento). Se use un tratamiento único o tratamientos sucesivos, finalmente se obtiene un cultivo líquido de las células o el tejido vegetal tratado con el inhibidor de la metilación del ADN.

ES 2 269 192 T3

El tratamiento con un inhibidor de la metilación del ADN afecta a la producción de metabolitos secundarios por las células vegetales tratadas. En parte, el efecto sobre las células vegetales tratadas es un efecto temporal inducido por estrés. Lo que es más importante, el tratamiento también afecta a la producción de metabolitos secundarios de subcultivos obtenidos de la siembra no germinada tratada, de la siembra en germinación, del cultivo del explante o el tejido, o del cultivo líquido. El efecto del tratamiento con el inhibidor de la metilación del ADN es epigenéticamente estable respecto a la alteración de la expresión de metabolismo secundario.

De acuerdo con los métodos de la invención, el tratamiento con un inhibidor de la metilación del ADN generalmente se combina con un tratamiento del cultivo líquido obtenido con un elicitador. El tratamiento con un elicitador también estimula o promueve la producción de metabolitos secundarios. La elicitación de un cultivo celular o tisular vegetal generalmente se realiza cuando se establece el cultivo líquido de la planta y puede hacerse crecer hasta niveles suficientes para posibilitar el aislamiento de los compuestos de la invención. Habitualmente, el cultivo tratado con un inhibidor de la metilación del ADN se subcultiva (para retirar el inhibidor de la metilación del ADN residual) antes de ponerlo en contacto con elicitador.

Métodos de Síntesis de los Compuestos 1, 5 y 7

Los compuestos de la invención se pueden sintetizar fácilmente usando métodos convencionales de síntesis orgánica. A continuación se proporciona un ejemplo de síntesis de los compuestos 1, 5 y 7 (Fig. 2).

Etapa 1

Síntesis de 2-(2,2-dibromo-vinil)-furan

Se disolvió tetrabromuro de carbono (20 mmoles) en diclorometano anhidro (200 ml), y se mantuvo a 20°C en atmósfera de argón. Se añadió trifenilfosfina (20 mmoles) en diclorometano (20 ml) gota a gota. Después de 15 de agitación, el matraz de reacción se mantuvo a -60°C, seguido por la adición de furaldehído (10 mmoles) y trietilamina (10 mmoles) en diclorometano (100 ml). La mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente, y se añadieron dos volúmenes de éter. El precipitado se filtró, y se secó el filtrado. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de Si (rendimiento >50%).

Etapa 2

Síntesis de 2-bromoetnil-furano

Se mantuvo 2-(2,2-dibromo-vinil)-furan (4 mmoles) en tetrahydrofurano (40 ml) en atmósfera de argón y se enfrió hasta -100°C. Se añadió hexametil disilano sódico (4,8 mmoles, solución 1 M) en tetrahydrofurano gota a gota al matraz de reacción y se agitó durante 10 minutos. Después se añadió una solución acuosa y saturada de cloruro amónico, y la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente. Se usó éter para extraer el producto de la solución acuosa. El disolvente orgánico se retiró mediante un cultivador rotatorio, y el residuo en bruto se usó para la siguiente reacción en la Etapa 6 (a continuación).

Etapa 3

Síntesis de éster metílico del ácido 9-hidroxi-nonanoico

Se disolvió éster monometílico del ácido azelaico (20 mmoles) en tetrahydrofurano (10 ml) y se mantuvo en atmósfera de argón a -10°C. Se añadió trietilamina (30 mmoles) gota a gota al matraz de reacción, seguido por la adición de cloroformiato de etilo (25 mmoles). La solución se agitó durante 20 minutos, y se añadió borohidruro sódico (60 mmoles) en una porción. Se añadió metanol (40 ml) gota a gota y el matraz de reacción se mantuvo a 0°C durante 40 minutos. Se añadió agua (20 ml) y se retiró el disolvente orgánico mediante un cultivador rotatorio. El residuo se puso en agua y acetato de etilo para el reparto. Se recogió la capa orgánica y se secó para obtener éster metílico del ácido 9-hidroxi-nonanoico de pureza adecuada para su uso en la etapa 4. El rendimiento es >90%.

Etapa 4

Síntesis de éster metílico del ácido 9-oxo-nonaico

Se trató éster metílico del ácido 9-hidroxi-nonanoico (7 g) en diclorometano con dicromato de piridinio (35 g) y se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Se filtró el dicromato de piridinio, y el filtrado orgánico se lavó con agua. Se añadió hexano (volumen 3X) a la solución, y la capa orgánica se recogió y se secó para obtener el producto en bruto. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de Si para obtener ~5 g de producto.

ES 2 269 192 T3

Etapa 5

Síntesis de éster metílico del ácido dodec-9-en-11-inoico

5 Se añadió n-butilitio (750 μ l, 2 M) a metilsulfóxido (6 ml) en atmósfera argón a temperatura ambiente. La solución se agitó durante media hora, y se añadió bromuro de (3-trimetilsilil-2-propinil)-trifenilfosfonio (1 mmol) en metilsulfóxido y se agitó durante una hora. Se añadió éster metílico del ácido 9-oxo-nonaico en metilsulfóxido a la mezcla de la reacción y se agitó durante 4,5 horas. La mezcla de la reacción se vertió sobre agua helada y se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron para obtener la mezcla en bruto, que se purificó adicionalmente por cromatografía en columna de gel de Si. El producto contenía isómeros *trans* y *cis* en una proporción de aproximadamente 8:2.

Etapa 6

15 *Síntesis de ésteres metílicos del Compuesto 1 y del Compuesto 5*

Se añadió una solución de metanol (100 μ l) que contenía cloruro de cobre (I) (0,6 mg), clorhidrato de hidroxilamina (3 mg), y etilamina (70% en agua, ~100 μ l) a éster metílico del ácido dodec-9-en-11-inoico (~3,2 mg) en metanol, seguido por la adición de 2-bromoetilfurano (~2 mg) en metanol. La mezcla de reacción se mantuvo a 0°C durante 20 minutos y se añadieron agua y éter. La capa orgánica se recogió y se secó. Se obtuvo una mezcla de los ésteres metílicos de los Compuestos 1 y 5 (~1 mg) por cromatografía en capa fina preparativa de gel de Si (PTLC) en una proporción *trans-cis* de ~8:2. Uno de estos ésteres metílicos es el Compuesto 7.

Etapa 7

25 *Síntesis del Compuesto 1 y del Compuesto 5*

La mezcla de los ésteres metílicos del Compuesto 1 y del Compuesto 5 (4,7 mg) de la Etapa 6 se disolvió en etanol-agua y se añadió a hidróxido potásico 2 N (400 μ l). La solución se calentó a reflujo durante una hora y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió una solución de clorhidrato (800 μ l; 1 N) y la solución se extrajo con acetato de etilo. Se obtuvo un total de 4 mg de los Compuestos 1 y 5 (proporción *trans:cis* de ~8:2) después de retirar el disolvente orgánico.

Los especialistas en la técnica reconocerán que pueden prepararse otros compuestos de la invención usando variaciones del método precedente, o usando otros métodos convencionales de síntesis orgánica. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en van Hijfte *et al.*, Tetrahedron Lett. 30: 3655; Hauske *et al.*, Tetrahedron Lett. 33: 3715, 1992; y Grandjean *et al.*, Tetrahedron Lett 35: 3529-3530, 1994, cada uno de los cuales está incorporado por la presente como referencia.

40 *Compuestos Terapéuticos Farmacéuticos y Protectores de Plantas*

La invención presenta compuestos capaces de inhibir el crecimiento, la patogenicidad, o la virulencia de un patógeno. Por consiguiente, estos compuestos tienen un valor medicinal o agrícola como fármacos o protectores de plantas. Ejemplos de hongos patógenos que se pueden inhibir por los compuestos de la invención son, por ejemplo, *C. albicans*, *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium marneffeii*, *Microsporium spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, y *Trichophyton spp.*

La invención presenta composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más compuestos de la invención. Para usos terapéuticos, las composiciones o compuestos se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo, formulados en un tampón farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológico. El tratamiento se puede conseguir directamente, por ejemplo, tratando al animal con un compuesto o composición de la invención. Las vías preferibles de administración incluyen, por ejemplo, la inhalación o inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o intradérmica que proporcionan niveles continuos y sostenidos del fármaco en el paciente. El tratamiento de pacientes humanos o de otros animales se realiza usando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención en un vehículo fisiológicamente aceptable. Se describen vehículos adecuados y su formulación, por ejemplo, en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, (19a ed.) ed. A.R. Gennaro AR., 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA. La cantidad de agente antifúngico a administrar varía dependiendo de la forma de administración, la edad y el peso corporal del paciente, y del tipo de enfermedad y de la extensión de la enfermedad. Generalmente, las cantidades estarán en el intervalo de las usadas para otros agentes usados en el tratamiento de enfermedades fúngicas. Un compuesto se administra a una dosificación que inhibe el crecimiento o supervivencia del hongo. Por ejemplo, para la administración sistémica, un compuesto se administra típicamente en un intervalo de 0,1 ng a 10 g/kg de peso vivo.

En un método preferido, se formula uno o más compuestos de la invención en combinación con un vehículo sólido o líquido dermatológicamente aceptable. Los vehículos sólidos útiles incluyen sólidos divididos finamente, tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes, o glicoles (o mezclas de agua-alcohol/glicol), en los que los presentes compuestos se pueden disolver o dispersar a niveles eficaces. Se pueden añadir adyuvantes (tales como fragancias aromatizantes), tensioactivos, y

ES 2 269 192 T3

agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones se pueden aplicar por discos absorbentes, pueden usarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o se pueden pulverizar sobre el área afectada usando pulverizadores de tipo bomba o de aerosol. Las composiciones líquidas también se pueden emplear como gotas oculares, elixires bucales, duchas, etc. Los espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas, o materiales minerales modificados también se pueden emplear con vehículos líquidos para formar pastas, geles, pomadas, jabones y similares, que se pueden untar, para la aplicación directa sobre la piel del usuario.

La concentración total de uno o más compuestos de la invención en las presentes composiciones se puede variar ampliamente, y dependerá de factores tales como la compatibilidad del ingrediente o los ingredientes activos con el vehículo, la potencia del ingrediente o los ingredientes activos y la afección a tratar. Generalmente, la concentración del compuesto o los compuestos de la fórmula en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1-25% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-10% en peso, y más preferiblemente de aproximadamente el 0,5% al 5% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5% en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 0,5-2,5% en peso.

Para usos agrícolas, se pueden usar las composiciones o los agentes descritos en este documento, por ejemplo, como productos químicos aplicados como pulverizaciones o polvos sobre el follaje de las plantas, o en sistemas de irrigación. Típicamente, dichos agentes se administran sobre la superficie de la planta anticipándose al patógeno para prevenir la infección. Las semillas, bulbos, raíces, tubérculos y bulbos también se tratan para prevenir un ataque del patógeno después de plantarse controlando los patógenos que llevan sobre ellos o que existen en la tierra en el lugar de la plantación. La tierra con la que se plantan vegetales, plantas ornamentales, arbustos o árboles también se puede tratar con fumigantes químicos para controlar una diversidad de patógenos fúngicos. El tratamiento se hace preferiblemente durante varios días o semanas antes de plantar. Los productos químicos se pueden aplicar mediante una ruta mecánica, por ejemplo un tractor, o bien mediante aplicaciones manuales. Además, los compuestos de la invención se pueden usar como desinfectantes.

En otras aplicaciones médicas, se puede añadir un compuesto antifúngico a los materiales usados para preparar dispositivos médicos tales como catéteres, incluyendo, pero sin limitación, catéteres intravenosos, urinarios, intraperitoneales, ventriculares, espinales, y de drenaje quirúrgico, para evitar la colonización y la siembra sistémica por patógenos fúngicos potenciales. De forma similar, se puede añadir un compuesto antifúngico a los materiales que constituyen diversas prótesis quirúrgicas y a dentaduras postizas para evitar la colonización por patógenos fúngicos y evitar de este modo infecciones invasivas más graves o la diseminación sistémica de estos patógenos.

Ensayos para la Actividad Antifúngica

La capacidad de un agente de inhibir el crecimiento fúngico y, de este modo, el transcurso de la infección por un organismo patogénico se puede demostrar por un experimento *in vitro* que mida el crecimiento de ese organismo, o por el uso de un ensayo de inhibición basado en enzimas o células como marcador indirecto del crecimiento. La inhibición se describe preferiblemente por una IC₅₀ (la concentración de un compuesto necesaria para una inhibición del 50%) o como MIC (la concentración inhibidora mínima, es decir, la concentración más baja del compuesto que inhibe el crecimiento del organismo). Por tanto, una IC₅₀ o MIC inferior indican que un compuesto tiene una mayor actividad inhibidora del crecimiento. Un compuesto con una especificidad aumentada demuestra uno o más de los siguientes casos: inhibición preferente de una enzima microbiana sobre una enzima correspondiente o similar en la célula o tejido hospedador; inhibición preferente de una enzima microbiana sobre otra enzima microbiana; e inhibición preferente del crecimiento de un microbio sobre el crecimiento de la célula o el tejido hospedador. En general, un compuesto activo preferiblemente inhibe el crecimiento, medido por un parámetro dado, en al menos un 25% (por ejemplo, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, o al menos un 65%) cuando se compara con un organismo que no ha contactado con el compuesto.

Los ejemplos específicos de ensayos farmacológicos incluyen los que miden la inhibición de lo siguiente: crecimiento de *C. albicans* (por ejemplo, ATCC N° 90028), quitina sintasa específica de hongos, o glucano sintasa. Ensayos adicionales miden la eficacia del agente para prolongar la vida de ratones infectados por una exposición letal a *C. albicans* sensible a fluconazol o resistente a fluconazol (véase, por ejemplo, Lo *et al.*, Cell 90: 939-949, 1997).

Un compuesto preferido es ampliamente eficaz contra uno o más *Candida spp.*, tales como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermorulii*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. viswanathii*, y *C. kefyr*, así como otras analizadas en este documento. Un compuesto preferido también es eficaz contra infecciones fúngicas tales como *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Histoplasma capsulatum* (var. *capsulatum*), *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* (var. *neoformans*, y var. *gattii*), *C. bidus*, *C. laurentii*, y *C. fusarium*, así como organismos mucormicóticos tales como *Rhizopus oryzae*, *R. microsporus*, *R. pusillus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Saksenaea vasiformis*, *Mucro circinelloides*, *M. ramossissimus*, *Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Cokeromyces recurvatus*, y *Syncephalastrum racemosum*. Los compuestos descritos pueden mostrar actividad contra más de un tipo de organismo y son, por lo tanto, particularmente adecuados y eficaces para la administración a pacientes con más de un tipo de infección (por ejemplo, un paciente puede tener dos tipos de infecciones fúngicas). Ciertos compuestos descritos también pueden demostrar aditividad o sinergia cuando se administran en combinación con otros agentes terapéuticos tales como azoles (por ejemplo, fluconazol) y anfotericina B. Preferiblemente, los com-

ES 2 269 192 T3

puestos se seleccionan según la toxicidad para células de mamífero (por ejemplo, en las líneas celulares Vero (riñón de mono) o U937 (monocitos humanos)); se prefieren particularmente compuestos con una toxicidad baja para células de mamíferos a una concentración que inhiba el crecimiento fúngico.

5 *Inhibición del Crecimiento de Candida spp.*

Hay numerosos ensayos que se pueden usar para medir la inhibición del crecimiento de un hongo tal como *Candida*. En un ejemplo, se subcultivan cultivos de *Candida*, por ejemplo *C. albicans* cepas DSY1024 y SC5314, *C. krusei* ATCC 6258, y *C. glabrata* ATCC 90030, a partir de soluciones madre criopreservadas sobre placas de agar dextrosa de Sabouraud. Se suspenden blastoconidios en medio RPMI-MOPS y se inoculan (500 cfu/pocillo) en placas de 96 pocillos que contienen compuestos de ensayo en un volumen final de 100 μ l/pocillo. Después de 22 horas a 35°C, se añaden a cada pocillo 25 μ l de XTT (hidróxido de (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio), (100 μ g/ml) con PMS (metil sulfato de fenazina, 5 μ M), seguido por 2 horas de agitación. El crecimiento se evalúa espectrofotométricamente midiendo la aparición de una mancha de formazán soluble a 450 nm usando un lector de microplaca E_{max}. La validez del ensayo se confirma por la determinación de la concentración inhibidora mínima (MIC) de *C. albicans* para agentes antifúngicos conocidos tales como anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, nikomicina Z, y polioquina D.

Los especialistas en la técnica reconocerán que puede adaptarse fácilmente cualquier ensayo que mida el crecimiento de cualquier hongo para determinar la inhibición del crecimiento fúngico por compuestos de la presente invención.

Inhibición de Candidiasis Resistente a Fluconazol y Sensible a Fluconazol en Ratones

Se infectan ratones inmunocompetentes (ICR, Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) con una cepa patogénica (por ejemplo, cepa N° 64) de *C. albicans* que es sensible a fluconazol. Después de 24 horas, la diseminación de la infección se ha demostrado por recuentos de colonias orgánicas (riñón, bazo e hígado) mayores de 10⁵ unidades formadoras de colonias (CFU). El tratamiento se comienza 24 horas después de la infección con una dosificación diaria durante 10 días. Los ratones de control sin tratar habitualmente mueren después de aproximadamente 16 días. Después de 30 días el porcentaje de supervivencia en el grupo tratado con fluconazol (40 mg por kg de peso vivo, dos veces al día) es de aproximadamente el 30%. Además de medir la viabilidad del animal, se puede medir la carga fúngica de los órganos (en CFU).

En un experimento similar usando un aislado clínico resistente a fluconazol (por ejemplo, *C. albicans* UTR-14), el porcentaje de supervivencia después de 20 días del grupo tratado con fluconazol (40 mg por kg de peso vivo p.o.) (dos veces al día) y en el grupo no tratado es habitualmente del 0%.

Inhibición de C. albicans con Combinaciones de Fármacos

Los compuestos de la invención se pueden ensayar en combinación con agentes antifúngicos conocidos (por ejemplo, anfotericina B y fluconazol) usando cualquiera de los ensayos precedentes. Los compuestos que, en combinación con agentes antifúngicos conocidos, son compuestos particularmente útiles, ya que se pueden incorporar en un régimen para tratar o prevenir infecciones fúngicas.

Los siguientes ejemplos son para ilustrar la invención. No pretenden limitar la invención en ningún modo.

Ejemplo 1

Aislamiento de Compuestos Antifúngicos de Anarrhinum bellidifolium

Se preparó un cultivo de células vegetales de *A. bellidifolium* (*Scrophulariaceae*) usando semillas de *A. bellidifolium*. Las semillas se esterilizaron por una inmersión de 15 minutos en Domestos al 5% (cloro activo al 0,25%). Las semillas estériles se colocaron en un medio de germinación de semillas (B83 modificado según la receta B5 de Gamborg), + sacarosa (1%), sin hormonas, y B83 + propiconazol (10 mg/l). Después de la germinación y el crecimiento apropiado de las raíces/brotos, las plántulas estériles se cortaron en trozos pequeños de aproximadamente 5 mm y se colocaron en un medio solidificado de inducción de callo B50 (modificado según la receta B5 de Gamborg para contener ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (1 mg/l), quinetina (0,1 mg/l), agua de coco (100 ml/l), sacarosa (2%)). Después de la producción del callo el material se usó para iniciar cultivos en suspensión.

Para establecer cultivos en suspensión, se colocaron porciones de explantes de plántulas + callo en B88, modificado según la receta B5 de Gamborg (Gamborg *et al.*, Exp. Cell. Res. 50: 151-158, 1968) para contener 2,4-D (1 mg/l), quinetina (0,1 mg/l), agua de coco (100 ml/l) + sacarosa al 3%. Los medios de suspensión se repusieron a intervalos de 14 días. Después de 3 meses, el cultivo en suspensión líquido establecido se mantuvo rutinariamente en un matraz cónico de 250 ml, transfiriendo 28 ml de cultivo de suspensión de 14 días a 100 ml de medio B88 fresco. EL cultivo se incubó a 25°C en oscuridad continua y se agitó a 140 rpm.

Se inoculó un matraz cónico de 2 l que contenía 750 ml de medio de producción B49 (Gamborg B5, sacarosa al 5%, sin hormonas) con 256 ml de cultivo de suspensión de 14 días. Después del crecimiento durante 7 días, se añadieron

ES 2 269 192 T3

jasmonato de metilo esterilizado por filtración (250 μ M de concentración final) y una preparación de *Candida albicans* esterilizada en autoclave (concentración final de 50 mg/l). Los cultivos celulares se recogieron por filtración al vacío después de otros 6 días. La preparación de *C. albicans* se obtuvo haciendo crecer un cultivo de ATCC 28516 en medios YEPD (extracto de levadura al 1%, peptona de levadura al 2%, glucosa al 2%) hasta una densidad celular máxima y esterilizando en autoclave todo el cultivo de levaduras antes de la adición a cultivos vegetales.

Se hicieron recrecimientos posteriores usando el material que había experimentado varias rondas de periodos cortos de almacenamiento en frío mediante los que se colocaron 140 ml de cultivos de 3 días en un matraz plano de cultivo tisular de 600 ml con tapa con ventilación, y después se almacenaron a 15°C durante 91 días. Después se retiró el cultivo y se colocó en un matraz cónico de 250 ml remplazándose los medios a intervalos de 14 días hasta que el cultivo se pudo mantener de forma rutinaria transfiriendo 40 ml de cultivo de 14 días a 100 ml de medio B88 fresco. Después de la recolección, las células separadas se secaron por congelación antes de la extracción.

Ejemplo 2

Aislamiento de los Compuestos 1-5

La biomasa celular secada por congelación (41 g) de 6 litros de cultivo celular AB-03499-T2 (*A. bellidifolium*) se descongeló y se lavó bien con agua, después se secó. Esto se extrajo con 2 litros de cloruro de metileno/metanol 1:1. El extracto seco (2,8 g) se absorbió y se fraccionó en una columna Diaion HP-20[®] (d.i. 2,5 cm, 25 cm profundidad) y se eluyó con H₂O, MeOH en H₂O, MeOH y acetona para producir las fracciones A1, A2, A3 y A4, respectivamente. El análisis de HPLC mostró que la mayoría de los derivados de acetileno se encontraron en la fracción A3 (columna Nova-pak HR C-18 (3,9 x 300 mm), gradiente de CH₃CN al 20% (HCOOH al 0,1%) a CH₃CN al 100% (HCOOH al 0,1%) en 14 minutos). La fracción A3 se subfraccionó por cromatografía en columna por gravedad (C-18 en fase inversa) usando como sistema disolvente MeOH al 40% para producir el Compuesto 1 (50 mg), Compuesto 2 (6 mg), Compuesto 3 (5 mg) y una mezcla compleja (7 mg) que se purificó adicionalmente por cromatografía en columna con gel de sílice en fase normal usando una mezcla de hexanos y acetona (5:1) para producir el Compuesto 4 (3 mg) y el Compuesto 5 (2 mg).

Compuesto 1. UV: 247, 260, 289, 308,328; Fórmula molecular: C₁₈H₂₀O₃. ESMS: m/z 283 [M-H]⁻ en modo negativo, m/z 307 [M+Na]⁺ en modo positivo, en Hewlett Packard; HRFABMS: m/z 284,1419 (calc. 284,1412) [M]⁺, m/z 307,1297 (calc. 307,1311) [M+Na]⁺, en Finnigan MAT95Q, a m/ Δ m= 4.000 usando la definición del valle de porcentaje 10. La matriz era alcohol 3-nitrobenzílico.

Datos RMN: véase la Tabla 1 (para protones en un instrumento de Unidad Varian).

Compuesto 2. ESMS m/z: 279 [M+Na]⁺ (calc. para C₁₆H₁₆O₃Na [279]).

Compuesto 3. Goma amorfa: UV (MeOH_{max} nm: 213, 247, 260, 290, 308, y 328; ¹H-RMN y ¹³C-RMN: Tabla 1; ESMS m/z: 293 [M+Na]⁺ (calc. para C₁₇H₁₈O₃Na [293]).

Compuesto 4. Goma amorfa: UV (MeOH_{max} nm: 213, 247, 260, 290, 308, y 328; ¹H-RMN y ¹³C-RMN: Tabla 1; ESMS m/z: 295 [M+Na]⁺ (calc. para C₁₈H₂₄O₂Na [295]).

Compuesto 5. Goma amorfa: UV (MeOH_{max} nm: 213, 247, 260, 290, 308, y 328; ¹H-RMN y ¹³C-RMN: Tabla 1; ESMS m/z: 307 [M+Na]⁺ (calc. para C₁₈H₂₀O₃Na [307]).

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1

Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
δC	δH	δC	δH	δC	δH	δC
177,7	2,28 (t)	177,7	2,30 (t)	177,8	177,8	176,0
1 (s)	J=7,5 (s)	J=7,5 (s)	J=7,5 (s)	(s)	(s)	(s)
Hz, 2H)		Hz)				
34,9	1,60	34,8	2,31 (t)	34,9	1,62 (m)	35,0
2 (t)	(m,2H)	(t)	J=7,5 (t)	(t)	J=7,5 (t)	2,28 (t)
			Hz)	Hz)	2H)	34,8
26,1	1,36 (m)	25,9	1,63 (m)	26,0	1,50-	2,33 (t)
3 (t)	(t)	(t)	(t)	1,29 (t)	1,60 (m)	J=7,5
				(m) ^b	26,1	J=7,5
30,1	1,36 (m)	29,7	1,51-	29,8	1,50-	Hz, 2H)
4 (t) ^a	(t) ^a	(t) ^a	1,29 (m) ^c	1,29 (t) ^a	1,50-	
			(m) ^c	(m) ^b	30,1	30,1
30,	1,36 (m)	29,5	1,51-	30,0	1,51-	1,36 (m)
5 1(t) ^a	(t) ^a	(t) ^a	1,29 (m) ^c	1,29 (t) ^a	1,29 (m) ^b	30,0
				(m) ^b	30,2	1,36 (m)
30,0	1,36 (m)	31,7	2,38 (c)	29,7	1,50-	30,0
				30,3	1,41-1,30	1,36 (m)
				30,3	1,41-1,30	29,9
				30,3	1,41-1,30	1,36 (m)

6	(t) ^a	(t)	J=7,5 Hz	(t) ^a	1,29 (m) ^b	(t) ^a	1,29 (m) ^b	(t) ^a	1,29 (m) ^b	(t) ^a	(t) ^a
7	29,6 (t)	1,46 (m, 2H)	150,1 6,22 (dt, J=10,8, 7,5 Hz)	31,7 (t)	2,38 (c, J=7,5 Hz)	30,2 (t) ^a	1,41-1,30 (m) ^c	29,5 (t) ^a	1,50-1,29 (m) ^b	26,2 (t) ^a	1,37 (m) 29,6 (t)
8	31,7 (t)	2,36 (cd, J=7,5, 1,2 Hz, 2H)	108,7 5,64 (d, J=10,8)	150,3 6,22 (dt, J=10,8, 7,5 Hz)	28,0 (t)	2,09 (c, d, J=6,6, 1,2 Hz)	31,7 (t)	2,19 (cd, J=7,5, 1,2 Hz)	33,5 (t)	1,49 (m, J=7,5, 1,2 Hz, 2H)	31,7 (t)
9	150,4 (d)	6,21 (dt, J=10,8, 7,5 Hz, 1H)	82,3 (s)	108,7 5,64 (dt, J=10,8, 1,2 Hz)	133,7 5,55-5,48 (dt, J=15,9, 1,2 Hz)	151,1 6,40 (dt, J=7,2 Hz, 1H)	86,4 (d)	4,30 (c, J=10,8, 7,5 Hz, 1H)	150,4 6,22 (dt, J=10,8, 7,5 Hz, 1H)	108,6 5,63 (dt, J=10,8, 1,2 Hz, 1H)	108,6 5,65 (dt, J=10,8, 1,2 Hz, 1H)
10	108,6 (d)	5,63 (dt, J=10,8, 1,2 Hz, 1H)	78,9 (s)	82,4 (s)	123,7 5,64 (dt, J=10,8, 6,6, 1,2 Hz)	109,2 5,67 (dt, J=15,9, 1,2 Hz)	147,7 6,23 (dd, J=15,9, 1,2 Hz)	108,6 5,65 (dt, J=10,8, 1,2 Hz, 1H)	112,0 5,85 (d, J=15,9, 7,2 Hz)	82,4 (s)	82,4 (s)
11	82,4 (s)	77,6 (s)	78,9 (s)	18,4 (t)	3,10 (d, J=6,6 Hz)	84,4 (s)	J=6,6 Hz	82,4 (s)	J=15,9, 7,2 Hz	82,4 (s)	82,4 (s)

5		J=2,1, 0.9 Hz, 1H)
10	(d)	J=6,9, 1.8 Hz, 3H)
15	(c)	a, J=1,8 Hz)
20	(d)	J=6,9, 1.8 Hz)
25	(c)	J=1.8, 0.9 Hz, 1H)
30	(d)	J=1.8, 0.9 Hz, 1H)
35	(c)	J=6,9, 1.8 Hz)
40	(d)	J=6,9, 1.8 Hz, 3H)
45	(c)	J=1.8, 0.9 Hz, 1H)
50	(d)	J=1.8, 0.9 Hz, 1H)
55	(c)	J=6,9, 1.8 Hz)
60	(d)	J=6,9, 1.8 Hz, 3H)
65	(c)	J=1.8, 0.9 Hz, 1H)

ES 2 269 192 T3

Ejemplo 3

Aislamiento de Compuestos Antifúngicos de Anarrhinum corsicum

5 Se preparó un cultivo de células vegetales de *A. corsicum* (*Scrophulariaceae*) usando semillas de *A. corsicum*. Las semillas se esterilizaron por inmersión de 30 minutos en Klorin al 30% + Tween 20 seguido de H₂O₂ al 3% durante 3 minutos. Las semillas estériles se colocaron en un medio de germinación de semillas (B83 modificado según la receta B5 de Gamborg, + sacarosa (1%), sin hormonas, y B83 + propiconazol (10 mg/l)). Después de la germinación y el crecimiento adecuado de las raíces/brotos, las plántulas estériles se cortaron en trozos pequeños de aproximadamente 10 5 mm y se colocaron en un medio solidificado de inducción de callos B50 (modificado según la receta B5 de Gamborg para contener 2,4-D (1 mg/l), quinetina (0,1 mg/l), agua de coco (100 ml/l), sacarosa (2%)). El callo se estableció dos meses después del comienzo.

15 Para establecer cultivos en suspensión, se colocaron porciones del callo establecido en B105, modificado según la receta B5 de Gamborg para contener 2,4-D (1 mg/l), quinetina (0,1 mg/l), agua de coco (100 ml/l), glutamina (1,46 mg/l)+ sacarosa al 3%. El medio de suspensión se repuso a intervalos de 14 días. Después de 2 meses, el cultivo en suspensión establecido se mantuvo rutinariamente en un matraz cónico de 250 ml, transfiriendo 40 ml de cultivo en suspensión de 14 días a 100 ml de medio B105 fresco. El cultivo se incubó a 25°C en oscuridad continua y se agitó a 20 140 rpm.

25 El cultivo se preparó para la producción de muestras del siguiente modo: Se tomó una alícuota de 40 ml de la suspensión en el día 0, y se transfirió a un matraz de 100 ml. En el día tres, se añadió un solución estéril de 5-azacitidina (5-AC) en agua a una concentración final de 3×10^{-5} M, y la mezcla resultante se incubó durante 11 días. El cultivo de 40 ml tratado con 5-AC se subcultivó después dos veces antes de transferirse a una mayor escala para manipulación adicional.

30 Se inoculó un matraz cónico de 500 ml que contenía 190 ml de medio de producción B49 (B5 de Gamborg, sacarosa al 5%, sin hormonas) con 70 ml de cultivo de suspensión de 14 días. Después de 7 días de crecimiento, se añadieron jasmonato de metilo esterilizado por filtración (250 μ M de concentración final) y una preparación de *Candida albicans* esterilizada en autoclave (concentración final de 50 mg/l). Los cultivos celulares se recogieron por filtración al vacío después de otros 6 días. La preparación de *C. albicans* se obtuvo haciendo crecer un cultivo de ATCC 28516 en medios YEPD (extracto de levadura al 1%, peptona de levadura al 2%, glucosa al 2%) hasta una densidad celular máxima y por esterilizando en autoclave dos veces todo el cultivo de levaduras antes de la adición a los cultivos vegetales.

35 Después de la recolección, las células separadas se secaron por congelación antes de la extracción.

Ejemplo 4

Aislamiento del Compuesto 6

40 LP416E8 (AC-05081-T4-3) era un extracto orgánico de un cultivo de células vegetales manipulado de *A. corsicum*. Este extracto fue sujeto de fraccionamiento dirigido por bioactividad porque mostró actividad antifúngica en una selección contra la cepa de *C. albicans* DSY1024 con un cuádruple “knock-out” y resistencia a múltiples fármacos (MDR). La IC₅₀ del extracto original para LP416E8 fue de 3,2 μ g/ml contra este organismo.

45 La biomasa celular en bruto de un cultivo de 20 litros se filtró y se lavó con agua destilada. La biomasa seca (393 g) se mezcló con 2 litros de diclorometano y metanol (1:1), y se agitó durante 1,5 horas. La biomasa se retiró por filtración. El procedimiento de extracción se repitió tres veces. El extracto orgánico seco (19,7 g) se obtuvo retirando el disolvente en vacío en un evaporador rotatorio.

50 El extracto seco (19,0 g) se mezcló con una resina de poliestireno HP-20[®], y después se aplicó a una columna de resina de poliestireno HP-20[®] (2000 ml), que se había equilibrado con agua destilada al 100%. La columna se eluyó con un sistema disolvente de gradiente por etapas con fracciones de 2 litros de concentraciones crecientes de acetonitrilo en agua (25%, 40%, 60%, 70%, 80%). Después se eluyó secuencialmente la columna con porciones de 55 2 litros de metanol, acetona y diclorometano. El disolvente se retiró de cada fracción al vacío. Las fracciones, con pesos dados entre paréntesis, se designaron en orden de elución, A1 (9,33 g), A2 (1,55 g), A3 (0,40 g), A4 (0,49 g), A5 (0,32 g), A6 (0,60 g), A7 (2,38 g), y A8 (0,67 g). La fracción activa A6 (0,60 g) se fraccionó adicionalmente por cromatografía en columna Sephadex LH-20[®], se eluyó con hexano-diclorometano (1:1) y después se lavó con metanol para dar las fracciones; B1 (8 mg), B2 (78 mg), B3 (104 mg), B4 (12 mg), B5 (4 mg), B6 (26 mg) y B7 (0,7 mg). La 60 fracción B4 se identificó como el Compuesto 1. La fracción B3 se pasó a través de otra columna Sephadex LH-20[®] eluida con el mismo sistema disolvente y se recogieron 26 fracciones. Las fracciones C22, C23 y C24 se combinaron para producir un total de 13 mg idénticos al Compuesto 1 por TLC y ¹HRMN.

65 Las fracciones C6 a C9 se fraccionaron adicionalmente para obtener el Compuesto 4 y el Compuesto 6. Cada una se aplicó primero a placas de TLC preparativa de gel de sílice. Las placas se desarrollaron dos veces con n-hexano-EtOAc (3:1). La banda de R_f más alto, visualizado por irradiación con luz UV, de cada placa (fracciones C6D1, C7D1, C8D1 y C9D1) se retiró y se extrajo con acetona. Se combinaron cuatro extractos orgánicos y se concentraron para producir el Compuesto 5 (~4 mg), identificado por datos de RMN y MS (Tabla 1).

ES 2 269 192 T3

Las bandas Rf en el tercer lugar más alto de las placas de TLC preparativa anteriores para las fracciones C8 y C9 se retiraron y se extrajeron con acetona. Los dos extractos orgánicos se combinaron para producir el Compuesto 6 (~3 mg) identificado por datos de RMN y MS (Tabla 1).

5 Ejemplo 5

Metilación del Compuesto 1

Se disolvieron 3,3 mg del Compuesto 1 en 1 ml de MeOH, y se añadió el exceso de trimetilsilil-diazometano (~0,3 ml) a la solución. La mezcla de reacción se mantuvo sin agitar durante 5 horas a temperatura ambiente. El solvente y el exceso de reactivo se retiraron con una corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió en hexano y se aplicó a una PTLC de gel de sílice, desarrollada con hexano-EtOAc (3:1). La banda principal con Rf ~0,9 se retiró y se extrajo con acetona. La acetona se retiró con una corriente de nitrógeno, y se obtuvieron 2,5 mg del Compuesto 7 (el éster metílico del Compuesto 1) (Tabla 1).

15 Ejemplo 6

Inhibición del Crecimiento Fúngico por el Compuesto 1

20 Usando el ensayo de crecimiento fúngico descrito en este documento, se ensayó el Compuesto 1 para su capacidad de inhibir el crecimiento de *C. albicans*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. glabrata*. Los valores de MIC e IC₅₀ se presentan en la Tabla 2. El crecimiento de todas las cepas ensayadas, incluyendo el de las cepas de *C. albicans* 93-1226 y UTR-14, que son resistentes a fluconazol, se inhibió a valores de IC₅₀ de 0,35 a 42 ng/ml.

25

TABLA 2

	MIC (ng/ml)	IC ₅₀ (ng/ml)
<i>C. albicans</i>		
<i>DSY1024</i>	0,625	0,35
	1,25	1,2
	2,5	1,6
<i>SC5314</i>	0,625	0,36
	1,25	1,2
	2,5	1,5
<i>90028</i>	1,25	1,22
<i>A26</i>	1,25	1,10
<i>Nº 64</i>	5	1,45
<i>UTR-14^a</i>	2,5	3,64
<i>93-1226^a</i>	2,5	2,10
<i>C. keyfer</i>		
<i>46764</i>	10	10-5
<i>C. tropicalis</i>		
<i>623-20</i>	5	2,96
<i>750</i>	5	4,67
<i>97-1037</i>	5	3,68
<i>C. krusei</i>		

65

ES 2 269 192 T3

6258	50	41,90
97-1037	50	26,10
<i>C. glabrata</i>		
90030	5	12,5-25
95-2421	12,5	8,25
95-2425	12,5	3,13-6,25

^aCepa resistente a fluconazol

También se ensayó la actividad anti-crecimiento celular del Compuesto 1 en otras cepas fúngicas, así como en cepas bacterianas y en células de mamífero cultivadas (Tabla 3). El crecimiento fúngico se inhibió con valores de IC₅₀ en el intervalo de 180 ng/ml a 100 mg/ml. El crecimiento de células bacterianas y el crecimiento de células de mamífero se inhibieron a concentraciones sustancialmente mayores de Compuesto 1.

TABLA 3

	MIC (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>S. cerevisiae</i> AD1-9	0,25	0,18
<i>S. cerevisiae</i> 2229-5C	1	0,5-1,0
<i>A. fumigatus</i> 8001	200	50-100
<i>S. aureus</i> 29213	50	31,6
<i>E. faecalis</i> 29212	12,5	7,5
<i>E. coli</i> 700	>200	na
Células Vero	na	31,0, 5,7
Células HF	na	12

Ejemplo 7

Inhibición del Crecimiento Fúngico por los Compuestos 2-7

Usando el ensayo general de crecimiento celular descrito en este documento, se ensayaron los Compuestos 2-7 para su capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas *DSY1024* y *SC5314* de *C. albicans*. Los resultados se presentan en la Tabla 4. Cada compuesto inhibió el crecimiento de la cepa *DSY1024*, que tiene cuatro mutaciones MDR, y por tanto se espera que sea más sensible a los inhibidores del crecimiento. Los Compuestos 2, 6 y 7 también fueron capaces de inhibir el crecimiento de la cepa *SC5314*.

TABLA 4

		DSY1024	SC5314
Compuesto 2	MIC (ng/ml)	3125	3125
	IC ₅₀ (ng/ml)	1817	2592
Compuesto 3	MIC (ng/ml)	1000	nt
	IC ₅₀ (ng/ml)	503	nt
Compuesto 4	MIC (ng/ml)	100000	100000
	IC ₅₀ (ng/ml)	68000	88200
Compuesto 5	MIC (ng/ml)	7,8	nt
	IC ₅₀ (ng/ml)	3,9	nt
Compuesto 6	MIC (ng/ml)	12500	12500
	IC ₅₀ (ng/ml)	11300	8500
Compuesto 7	MIC (ng/ml)	250	250
	IC ₅₀ (ng/ml)	190	221

Inhibición del Crecimiento de Dermatofitos

Los compuestos de la invención también son eficaces contra dermatofitos. El ensayo se realizó usando un método de microdilución basado en el protocolo antifúngico NCCLS M27A. Los compuestos a ensayar se prepararon en DMSO y se diluyeron a la concentración apropiada en medio RPMI 1640 (el medio de crecimiento de dermatofitos). Se preparó un inóculo de cada organismo de ensayo a partir de placas de agar harina de avena para contener $0,5-2,5 \times 10^3$ conidios/ml. Se añadieron cien microlitros del inóculo a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía $4 \mu\text{l}$ de un compuesto de ensayo y $96 \mu\text{l}$ de RPMI 1640. Se usó terbinafina (vendido con el nombre comercial Lamisil®) como control positivo. Las placas se incubaron durante cuatro días a 35°C , y se determinó la MIC por inspección visual. Los datos se resumen en la siguiente tabla.

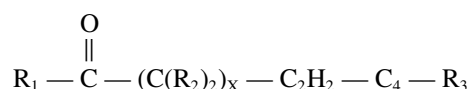
TABLA 5

Organismo	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Compuesto 1	Compuesto 3	Compuesto 7	Terbinafina
<i>T. rubrum</i>	0,001	8,0	0,125	0,002
<i>T. mentagrophytes</i>	0,001	2,0	0,125	0,004
<i>T. tonsurans</i>	0,001	2,0	0,125	0,015
<i>M. canis</i>	0,001	2,0	0,125	0,015

ES 2 269 192 T3

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto sustancialmente puro que tiene la fórmula:



en la que R_1 es un grupo hidroxilo o un resto que se puede remplazar por un grupo hidroxilo en una reacción de hidrólisis; cada R_2 es, independientemente, H o un resto hidrocarbonado monovalente que contiene entre 1 y 4 átomos de carbono, ambos incluidos; R_3 es un anillo pirrol, furano o tiofeno; y X es un número entero entre 4 y 10, ambos incluidos.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que cada R_2 es H.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que cada R_2 es, independientemente, H, CH_3 o C_2H_5 .

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la suma de los átomos de carbono en los restos R_2 es menor de 15.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que la suma de los átomos de carbono en los restos R_2 es menor de 9.

6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que la suma de los átomos de carbono en los restos R_2 es menor de 5.

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R_3 es un anillo furano.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que X es un número entero entre 5 y 7, ambos incluidos.

9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso como inhibidor del crecimiento de *Candida albicans*.

10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_1 es OH, NH_2 , OCH_3 o OC_2H_5 , R_3 es un anillo pirrol, furano o tiofeno, y X es un número entero entre 5 y 7, ambos incluidos.

12. El compuesto de la reivindicación 11, en el que R_1 es OH.

13. El compuesto de la reivindicación 11, en el que R_3 es un anillo furano.

14. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la fabricación de una composición para inhibir el crecimiento de una célula fúngica.

15. El uso de la reivindicación 14, en el que la célula fúngica es una célula de *Candida albicans*.

16. El uso de la reivindicación 15, en el que el compuesto inhibe el crecimiento de la célula de *Candida albicans* en al menos un 90%.

17. Un método para inhibir el desarrollo de una infección fúngica en una planta, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto el organismo con un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

18. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para tratar una infección fúngica.

19. El compuesto de la reivindicación 18, en el que dicho hongo es un dermatofito.

20. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la fabricación de un medicamento para tratar una infección fúngica.

FIG. 1

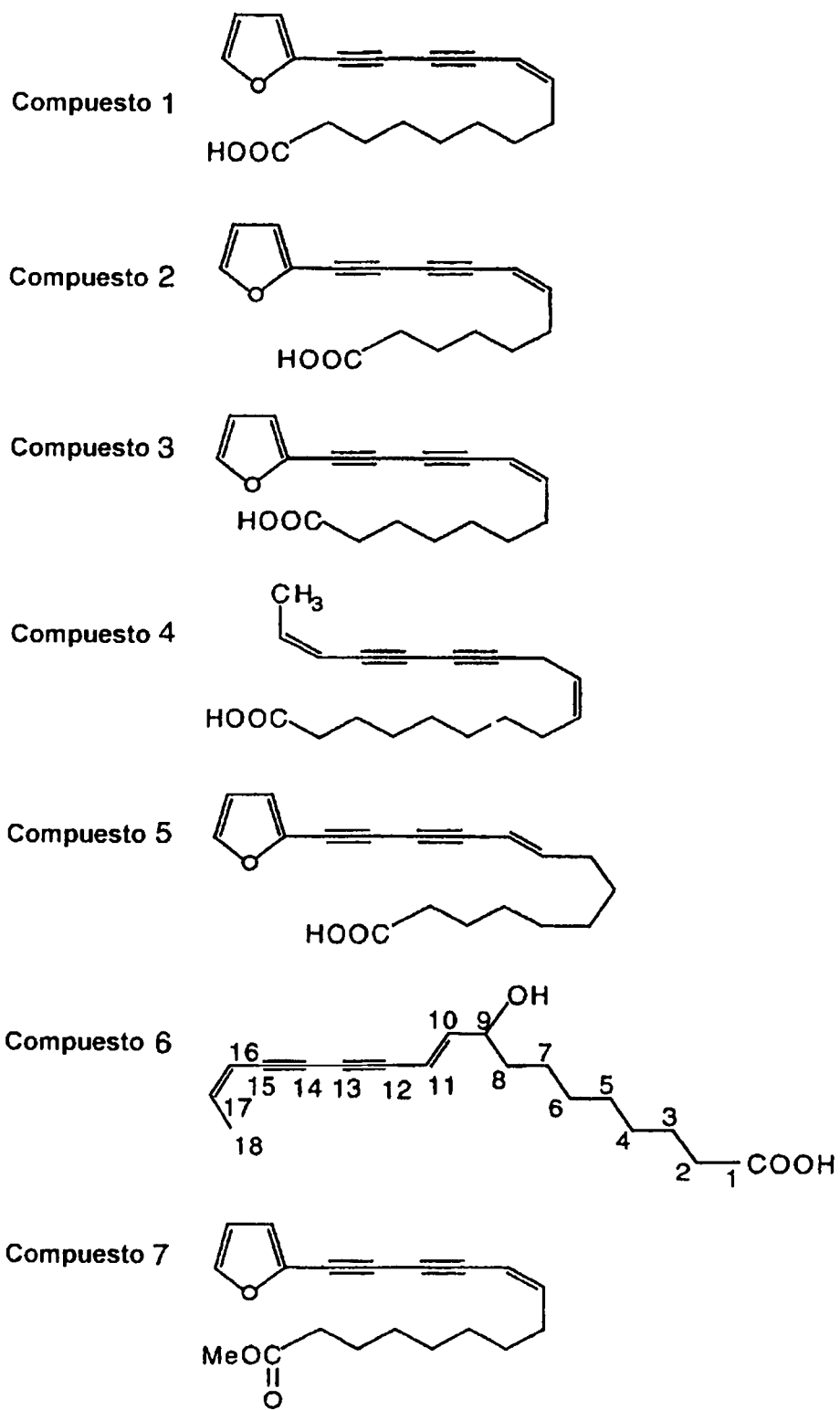
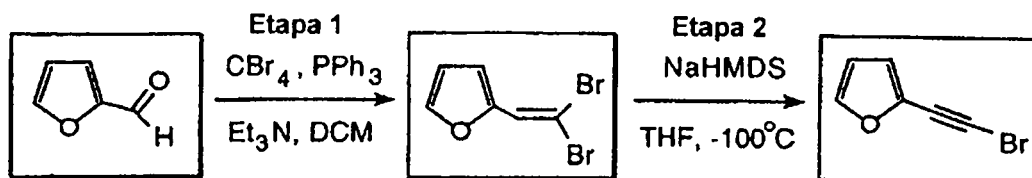
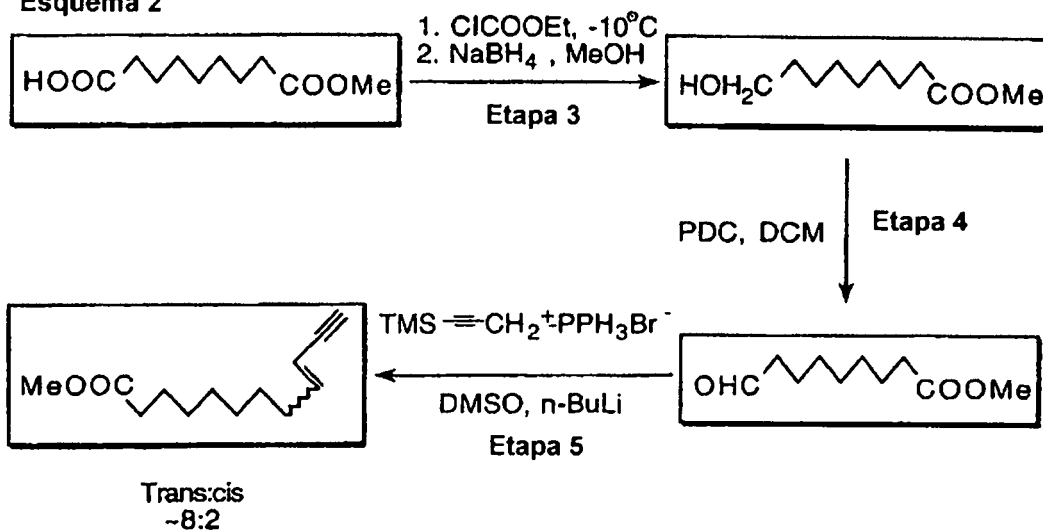


FIG. 2

Esquema 1



Esquema 2



Esquema 3

