



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 053**

51 Int. Cl.:

C12P 17/14 (2006.01)

C07D 273/00 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02780072 .1**

96 Fecha de presentación : **12.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1561820**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.08.2005**

54 Título: **Sustancia antihelmíntica FKI-1033 y procedimiento para la producción de la misma.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **THE KITASATO INSTITUTE**
9-1 Shirokane 5-chome
Minato-ku, Tokyo 108-8642, JP

72 Inventor/es: **Omura, Satoshi;**
Shiomi, Kazuro y
Masuma, Rokuro

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 318 053 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

Sustancia antihelmíntica FKI-1033 y procedimiento para la producción de la misma.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva sustancia FKI-1033, que es eficaz como producto agroquímico, medicina veterinaria o producto farmacéutico que tiene actividad de inhibición de la unión de rianodina, actividad insecticida y actividad antihelmíntica, así como a procesos para producción de la misma.

10 Técnicas precedentes

Los insecticidas han contribuido indudablemente a incrementar la producción de recursos alimenticios y su suministro estable, sin embargo han dado lugar a grandes problemas tales como toxicidad residual y destrucción de sistemas ecológicos.

La parasitosis se ha ido reduciendo a medida que han ido mejorando los resultados de higiene medioambiental y el progreso de antihelmínticos, pero recientemente se han incrementado la parasitosis aferente, parasitosis zoonótica, parasitosis oportunista y parasitosis derivada de productos perecederos, y como consecuencia queda planteado el problema de estas varias parasitosis. En ganadería y agricultura, la parasitosis constituye actualmente una gran carga económica. En la infección helmíntica, entre las parasitosis, se utilizan mucho compuestos tales como ivermectina, mebendazol, praziquantel, etc.

Sin embargo, los agentes antihelmínticos usados actualmente no son siempre satisfactorios en cuanto a su eficacia y toxicidad, por lo que existe la demanda de agentes nuevos.

Kanaoka y col. (*Agric. Biol. Chem.* 1978, vol. 42, páginas 629-635) describen el aislamiento de basianolida, un ciclodepsipéptido que tiene actividad insecticida. El compuesto se aisló de los micelios de dos hongos entomófagos, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*.

Las Patentes europeas EP-A-0626375 y EP-A-0626336 describen octaciclodepsipéptidos que tienen actividad endoparasitocida, y describen también su preparación.

Un receptor de rianodina es un canal de iones que induce Ca^{2+} desde el almacenamiento intracelular al citoplasma con nivel de Ca^{2+} incrementado en el citoplasma, y ha sido descubierto como un receptor de un alcaloide vegetal, la rianodina, que presenta actividad insecticida. En los mamíferos, hay tres tipos de receptor de rianodina, es decir, el tipo 1 (tipo de músculo esquelético), tipo 2 (el tipo miocárdico) y tipo 3 (el tipo cerebral), que se codifican independientemente en el gen, que se conocen como un resultado de la clonación de gen. Se ha elucidado la estructura primaria del receptor de rianodina (Takeshima, H. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 707, 165-177, 1993). Se identifica en insectos y helmintos como el receptor de rianodina que no pertenece a los tres tipos anteriores (Takeshima, H., *Proteins, Nucleic Acids and Enzymes*, 43: 1603-1609, 1998).

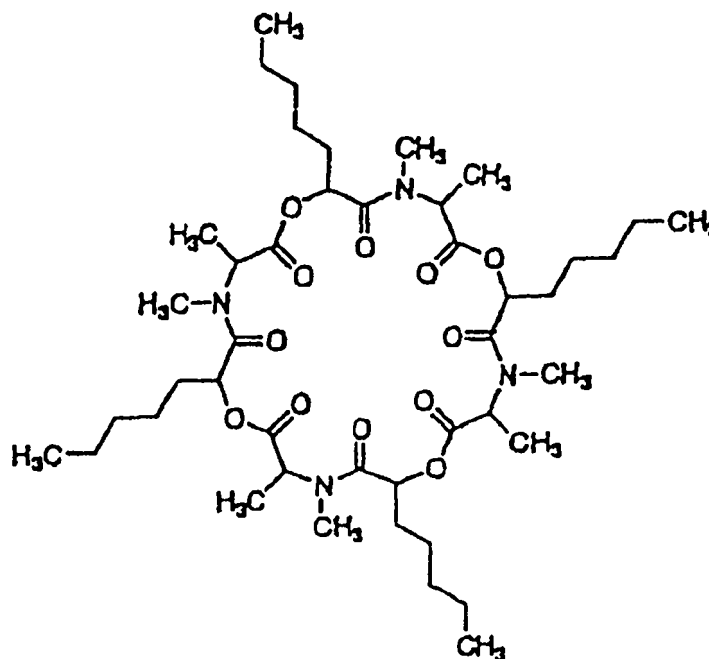
Como consecuencia, se ha informado de que entre las sustancias que inhiben la unión de rianodina al receptor de rianodina, es de esperar que aquellas que tienen alta selectividad para insectos y helmintos sean insecticidas y sustancias antihelmínticas (H. Schmitt y col., *Pesticide Sci.* 48: 375-385, 1996).

Los autores de la presente invención han enfocado su estudio en el receptor de rianodina y han continuado investigando sobre inhibidores de unión a rianodina partiendo de productos de cultivo microbiano con el fin de obtener nuevos fármacos que fueran satisfactorios en cuanto a eficacia y toxicidad del fármaco. Como resultado de ello, los autores de la presente invención han encontrado un nuevo compuesto, sustancia FKI-1033, que era producido por la cepa del hongo FKI-1033, que tenía actividad de inhibición de la unión a rianodina así como tenía actividad insecticida y actividad antihelmíntica.

Uno de los aspectos de la presente invención es una nueva sustancia FKI-1033, que es eficaz como producto agroquímico, medicina veterinaria o producto farmacéutico que tiene actividad de inhibición de la unión a rianodina, actividad insecticida y actividad antihelmíntica y procesos para producción de la misma.

La sustancia FKI-1033 se puede obtener por cultivo de un microorganismo, que pertenece al grupo de los hongos, que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033 en un medio, acumulación de la sustancia FKI-1033 en la masa del cultivo y aislamiento de la sustancia FKI-1033 desde la masa del cultivo.

La presente invención proporciona sustancia FKI-1033 representada por la siguiente estructura química:



La presente invención proporciona también un procedimiento para la producción de sustancia FKI-1033 que comprende el cultivo de un microorganismo que es un hongo, que pertenece a *Verticillium* sp. que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033 en un medio, la acumulación de sustancia FKI-1033 en el medio de cultivo y aislamiento de la sustancia FKI-1033 acumulada en el medio cultivado y aislamiento de la sustancia FKI-1033 desde la masa de cultivo.

En el procedimiento de la presente invención, el microorganismo que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033 es, preferiblemente *Verticillium* sp. FKI-1033 FERM BP-8291 o un mutante del mismo que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033.

La presente invención proporciona también un microorganismo *Verticillium* sp. FKI-1033 FERM BP-8291 que es un hongo.

La presente invención proporciona también un microorganismo *Verticillium* sp FKI-1033 que es FERM BP-8291 o un mutante del mismo que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033.

La presente invención proporciona también una composición que comprende sustancia FKI-1033 como ingrediente activo que tiene actividad de inhibidor de unión a rianodina y/o que tiene actividad insecticida y antihelmíntica.

La presente invención proporciona además la utilización sustancia FKI-1033 en la producción de un compuesto agroquímico, fármaco veterinario o medicamento, que tiene actividad insecticida y antihelmíntica para inhibir la unión de rianodina al receptor de rianodina.

El microorganismo que tiene capacidad de producir la nueva sustancia FKI-1033 representada por la fórmula dada aquí antes (en adelante designado como "microorganismo productor de sustancia FKI-1033") es un hongo, y puede ser el microorganismo que tiene capacidad de producir sustancia FKI-1033 de la presente invención sin limitación específica. Un ejemplo preferido de la cepa utilizada para producción de sustancia FKI-1033 de la presente invención es la cepa FKI-1033 de *Verticillium* sp, que fue aislada de nuevo desde una muestra de suelo en la Prefectura de Kagoshima por los autores de la presente invención. Las propiedades taxonómicas de la cepa son las siguientes:

(1) Características morfológicas

La cepa mostró un crecimiento relativamente bueno en un medio de agar con glucosa de patata, medio de agar de harina de maíz, medio de agar de Miura, medio de agar de extracto de malta y medio de agar de harina de avena. La génesis de conidios en cada medio era moderada.

La observación microscópica del crecimiento de colonias en el medio de agar del extracto de malta mostraba hifas con tabiques, y habían nacido conidioforos desde los micelios aéreos a veces. Se observó la phialida directamente desde la hifas aéreas o una sola verticilación o dos a cuatro verticilaciones en la parte media de encima de los conidioforos. La longitud de la phialida era de 25-80 μm con un ligero hinchamiento en la base (2,0-2.8 μm) y estrechándose

ES 2 318 053 T3

con la forma en cuña de la parte de arriba. Los conidios eran subglobosos a ovales (2,5-4,0 x 2,0-3,0 μm) y formaban una masa viscosa de conidios desde la parte de arriba de la phialida.

(2) *Propiedades de los cultivos en varios medios de agar*

En la Tabla 1 se muestran observaciones macroscópicas de la cepa cultivada en varios medios de agar a 25°C durante 7 días.

TABLA 1

Medio	Condiciones del crecimiento en el medio (diámetro de la colonia)	Color de la superficie de la colonia	Color de la parte inversa de la colonia	Pigmento soluble
Agar de glucosa de patata	Moderado (42-44 mm), Aterciopelado en copos Penumbra suave entera	Blanco	Pardo amarillento pálido	Ninguno
Agar de harina de maíz	Moderado (39-42 mm), Aterciopelado, pulverulento Penumbra suave, entera	Blanco	Pardo amarillento, pálido	Ninguno
Agar de Miura	Moderado (44-45 mm) aterciopelado en polvo, Penumbra suave, entera	Blanco	Blanco	Ninguno
Agar de extracto de malta	Moderado (42-46 mm), aterciopelado, en copos Penumbra suave, entera	Blanco	Blanco - Pardo amarillento pálido	Ninguno

5	Agar de avena	Moderado (43-46 mm), Aterciopelado, en copos, Penumbra su- ave entera	Blanco	Blanco	Ninguno
10					

15 (3) *Propiedades fisiológicas*

(1) *Condiciones óptimas de crecimiento*

Las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa eran pH 5-7 y 18,5-29,0°C.

20 (2) *Intervalo de crecimiento*

El intervalo para el crecimiento de la cepa era de 4-10, y el intervalo de temperatura era de 6,5-31°C.

25 (3) *Naturaleza: aerobia*

Como resultado de la comparación con las propiedades morfológicas, propiedades de cultivo y propiedades fisiológicas de la cepa FKI-1033 y cepas conocidas, la presente cepa se identificó como una cepa perteneciente al género *Verticillium*, y se citó como *Verticillium* sp FKI-1033. La cepa se depositó como *Verticillium* sp. FKI-1033 en el Depósito Internacional de Organismos Patentados, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial avanzada de AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashij, 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón. La fecha del depósito fue del 21 de octubre, 2002, como depósito No. FERM SP-8219.

La producción de sustancia FKI-1033 de la presente invención se puede realizar por cultivo del microorganismo productor de sustancia FKI-1033, perteneciente al grupo de los hongos, en un medio, aislamiento de la masa cultivada del mismo y purificación del mismo. Dado que es fácil que muten las propiedades taxonómicas generales de los microorganismos y que no son estables, no solamente se pueden utilizar en la presente invención los mutantes naturales sino también los mutantes artificiales obtenidos por irradiación ultravioleta convencional o tratamiento con un inductor de mutantes tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, que incluyen todas las cepas que producen sustancia FKI-1033 perteneciente a hongos.

Las fuentes de nutrientes adecuadas para producción de sustancia FKI-1033 pueden ser fuentes de nutrientes de hongos. Por ejemplo, las fuentes de nutrientes que se pueden utilizar son fuentes de nitrógeno comerciales tales como peptona, extracto de carne, licor de maceración de maíz, semilla de algodón en polvo, cacahuete en polvo, harina de soja, extracto de levadura, NZ-amina, hidrolizado de caseína, nitrato de sodio, nitrato de amonio, y sulfato de amonio, hidratos de carbono tales como glicerina, almidón, glucosa, galactosa y manosa, o fuentes de carbono tales como ácidos grasos y sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, fosfato, carbonato de calcio, y sulfato de magnesio, solas o combinaciones de ellas.

Si es necesario, se pueden añadir sales metálicas traza, aceite animal, vegetal y mineral como agente anti formación de espuma. Estas son, preferiblemente sustancias que se pueden utilizar por el microorganismo productor y útiles para la producción de sustancia FKI-1033, y se pueden utilizar todos los materiales conocidos para cultivar hongos. En una producción en masa de sustancia FKI-1033, se aplica preferiblemente cultivo líquido. La temperatura de cultivo puede estar dentro de un intervalo de crecimiento de la cepa productora y la producción de sustancia FKI-1033. Se pueden seleccionar opcionalmente las condiciones de cultivo antes descritas dependiendo de las propiedades del microorganismo que produce sustancia FKI-1033.

La sustancia FKI-1033 se puede extraer utilizando disolvente orgánico inmiscible con agua tal como cloroformo y acetato de etilo desde el líquido de cultivo. Además de la extracción anterior, se pueden aplicar los métodos de aislamiento conocidos utilizados para recogida de sustancia soluble en grasa tal como cromatografía de adsorción, cromatografía de reparto, cromatografía de filtración por gel, raspado de cromatografía en capa fina, cromatografía centrífuga en contra-corriente y cromatografía de líquidos de alto rendimiento, en combinación o repetidamente para obtener la sustancia purificada.

ES 2 318 053 T3

Las propiedades físicoquímicas de sustancia FKI-1033 de la presente invención son como sigue.

(1) Naturaleza: aceite incoloro.

(2) Peso molecular: 875,53997 (M+Na, espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido de alta resolución).

(3) Fórmula molecular: $C_{44}H_{76}N_4O_{12}$.

(4) Rotación específica: $[\alpha]^{25}_D = -53,0^\circ$ (c=0,2, metanol).

(5) Espectro de absorción en el ultravioleta (en metanol). absorción máxima a 202 nm ($\epsilon = 19700$).

(6) Espectro de absorción en el infrarrojo (KBr): absorción máxima a 3467, 2956, 2933, 2862, 1743, 1662, 1464, 1416, 1205, 1084 cm^{-1} .

(7) RMN de protón 1H : se midieron el desplazamiento químico en cloroformo deuterado y la constante de acoplamiento de spin utilizando un espectrómetro de RMN Unity Inova 600, Varian Inc. U.S. El desplazamiento químico (ppm) y la constante de acoplamiento de spin (Hz) se muestran en la Tabla 2.

(8) RMN- ^{13}C : desplazamiento químico en cloroformo deuterado medido por utilización de espectrómetro de RMN Unity Inova, Varian Inc., U.S. El desplazamiento químico (ppm) se muestra en la Tabla 2.

(9) Solubilidad en disolvente: Soluble en metanol, etanol, acetato de etilo y cloroformo. Difícilmente soluble en agua y n-hexano.

(10) Reacción de color: Positiva para ácido sulfúrico.

TABLA 2

^{13}C	1H
171,2s	
171,0s	
170,8s x 4	
170,0s	
169,9s x 2	
169,8s	
169,3s x 3	
169,2s	
71,6d	5,11dd (1H, J=2,5, 10,6)
71,3d x 3	5,42m (3H)
71,0d	5,45dd (1H, J=5,3, 8,4)
70,8d	5,36dd (1H, d=5,3, 9,0)
70,7d	5,32dd (1H, J=3,3, 10,1)
54,4d	4,56q (1H, J=7,3)
51,94d x 3	5,40q (3H, J=7,2)
51,85d	5,54q (1H, J=7,4)
51,76d	5,30q (1H, J= 7,4)
51,5d	5,53q (1H, J=7,3)
31,5q	3,18s (3H)

ES 2 318 053 T3

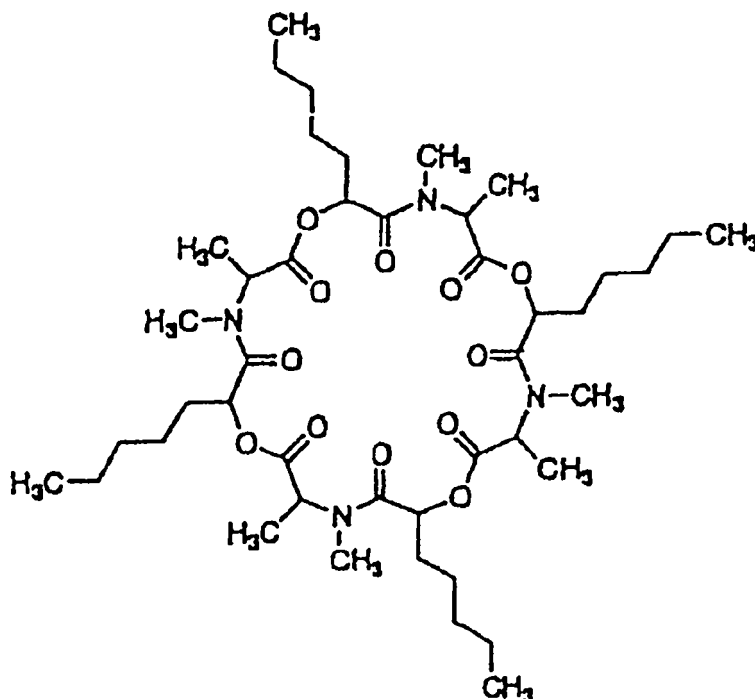
	31,40t x 5	1,31m (10H)
5	31,36t x 2	1,30m (4H)
	31,2t	1,78m (2H)
	31,1t	1,78m (2H)
10	31,0t x 3	1,78m (6H)
	30,98t	1,78m (2H)
	30,97q	2,96s (3H)
15	30,92t	1,78m (2H)
	30,73q x 3	2,91s (9H)
	30,66q	3,01s (3H)
20	29,4q	2,99s (3H)
	25,1t	1,30m (2H)
	24,83t	1,30 m (2H)
25	24,82t	1,30 m (2H)
	24,76t x 4	1,30 m (8H)
	22,42t x 4	1,30m (8H)
30	22,39t x 3	1,30m (6H)
	15,9q	1,59d (3H, J=7,3)
35	15,0q	1,41d (3H, J=7,4)
	14,8q	1,45d (3H, J=7,3)
	14,2 q x 3	1,38d (9H, J=7,2)
40	14,0q	1,39d (3H, J=7,4)
	13,93q x 3	0,88m (9H)
	13,90q	0,88m (3H)
45	13,88q x 3	0,88m (9H)

50 En la Tabla, cada símbolo significa lo siguiente; s; singlete, d: duplete, t: triplete, q cuartete. m: multiplete, H número de protón, J: constante de acoplamiento (Hz).

55 Como resultado del examen y discusión detallada de varias propiedades físicoquímicas y datos del espectro de la sustancia FKI-1033, se llegó a la determinación de la estructura química de la sustancia FKI-1033 representada por la fórmula dada a continuación. En los espectros de RMN de protón y de ¹³C de la sustancia FKI-1033, se vio que la intensidad de la señal estaba 1,75 veces por encima de la fórmula molecular. Esto puede ser debido a que la sustancia FKI-1033 puede existir en la forma de dos tipos del isómero conformacional con una relación de 3:4. En un isómero conformacional, el número de la señal solo se puede observar en ¼ del mismo. Esto sugiere que la conformación es de simetría de rotación cuádruple.

60

65



Como se ha señalado aquí antes, las diversas propiedades físicoquímicas de la sustancia FK1-1033 están descritas con detalle, sin que se haya informado de ningún compuesto con idénticas propiedades, por lo que la sustancia FK1-1033 se calificó como una sustancia nueva.

En lo siguiente se explica con detalle la actividad de inhibición de la unión a rianodina de la sustancia FK1-1033 de la presente invención.

(1) La preparación de la fracción de receptor de rianodina bruto del insecto se llevó a cabo como sigue.

Se congelaron el torax y las patas de diez insectos *Periplaneta americana* adultos con nitrógeno líquido y se cortaron finamente, y se homogeneizaron tres veces en 15 ml de tampón Tris HCl 50 mM (pH 7,4) que contenía 4 µg/ml de leupeptina y 3 µg/ml de pepstatina utilizando un homogeneizador de cuchillas a 0°C, 24.000 rpm durante 30 segundos. El homogenato se filtró utilizando una tela de algodón de doble capa y el filtrado se centrifugó a 4°C, 3.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 4°C, 30.000 rpm durante 30 minutos y el precipitado se suspendió en 1 ml de tampón Tris HCl 20 mM (pH 8,0) que contenía sacarosa 0,3 molar, cloruro de calcio 500 mM y cloruro de potasio 1,5 M y se homogeneizó en recipiente de vidrio para obtener fracción bruta de receptor de rianodina. La fracción bruta de receptor de rianodina se utilizó diluyéndola aproximadamente 7 veces con el tampón A (tampón Tris-HCl 20 mM (pH 9,0) que contenía 4 µg/ml de aprotinina, 4 µg/ml de leupeptina, sacarosa 0,3 M y cloruro de calcio 500 µM) inmediatamente antes de su uso.

(2) La preparación de fracción bruta de fracción de rianodina de mamífero se llevó a cabo como sigue.

Se cortaron finamente músculos de las patas traseras de ratón ICR, y se homogeneizaron 3,0 gramos de los mismos a 0°C, 1.000 rpm durante 3 x 30 segundos, utilizando una homogeneizadora de vidrio, en 15 ml de tampón B (tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) que contenía 4 µg/ml de aprotinina y 4 µg/ml de leupeptina. El homogenato se pasó al microtubo de ensayo y el homogeneizador de vidrio se lavó también con los 7,5 ml de tampón B y la solución de lavado se añadió asimismo al microtubo de ensayo, que se agitó, luego se centrifugó por utilización de ultracentrífuga enfriada a 4°C, 25.000 x g durante 40 minutos. Se añadieron 2,4 ml de tampón B al precipitado obtenido y se suspendieron para obtener la fracción de receptor de rianodina bruta de origen de ratón.

(3) Se ensayó como sigue la actividad de unión del receptor de rianodina bruto de *Periplaneta americana*.

Se añadieron 70 µl del tampón A, 10 µl de solución de etanol de rianodina 0,1 nM y 10 µl de rianodina 20 nM [9,21-³H] a la microplaca de 96 pocillos (Corning Inc, U.S.). Se añadieron 10 µl de fracción de receptor de rianodina bruto de *Periplaneta americana* para iniciar la reacción, y se sacudió a temperatura ambiente durante 90 minutos por utilización de una mezcladora de microplaca. Se filtró la mezcla de reacción con filtro de fibra de vidrio (Wallac Inc. Printed Filtermat B) utilizando recolector 96[®] Mach IIIM (Tomtech Inc.) y se lavó tres veces con 300 µl de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) a baja temperatura. El filtro se secó en horno microondas. Se colocó encima una lámina de aparato de centelleo (Wallac Inc, U.S., MeltiLex[™] B/HS) y la lámina se fundió sobre la placa caliente. Se midió la radiactividad por medida de la intensidad de la fluorescencia del filtro empleando un contador de centelleo (Wallac Inc. U.S., MicroBeta[™] Trilux).

ES 2 318 053 T3

Se ensayó la actividad de inhibición de unión a rianodina de sustancia FKI-1033 por adición de sustancia FKI-1033 inicialmente en el ensayo de actividad de unión a rianodina y se calculó con la siguiente ecuación comparando con la actividad de unión a rianodina del control.

$$\text{Actividad de inhibición de unión a rianodina} = (1 - (\text{radiactividad en la adición de sustancia FKI-1033} / \text{radiactividad de control})) \times 100$$

Según el resultado obtenido por cálculo con la ecuación anterior, la sustancia FKI-1033 mostraba la actividad de inhibición de la unión a rianodina, $IC_{50} = 4,2 \mu M$, frente al receptor de rianodina de origen de *Periplaneta americana*.

(4) Se ensayó como sigue la actividad de unión de receptor bruto de rianodina de mamífero.

Se añadieron 70 μl del tampón A, 10 μl de solución de etanol de rianodina 0,1 nM y 10 μl de rianodina 20 nM (9,21- 3H) (N) a la microplaca de 96 pocillos (Corning Inc., U.S.). Se añadieron 10 μl de fracción bruta de receptor de rianodina de origen de ratón para iniciar la reacción, y se sacudió a temperatura ambiente durante 90 minutos utilizando una mezcladora de microplaca. La mezcla de reacción se filtró con filtro de fibra de vidrio (Wallac Inc., Printed Filtermat B) utilizando Recolector 96[®] Mach III M (Tomtech Inc.) y se lavó tres veces con 300 μl de tampón Tris HCl 20 mM (pH 8,0) a baja temperatura. El filtro se secó utilizando horno de microondas. Se puso encima una lámina de aparato de centelleo (Wallac Inc. U.S., Meltflex[®] 8,0) y la lámina se fundió sobre la placa caliente. Se midió la radiactividad por medida de la intensidad de fluorescencia del filtro empleando contador de centelleo (Wallac Inc. U.S., MicroBeta Trilux).

La actividad de inhibición de unión a rianodina de la sustancia FKI-1033 se ensayó por adición de sustancia FKI-1033 inicialmente al ensayo de actividad de unión a rianodina y se calculó empleando la siguiente ecuación comparando con la actividad de unión a rianodina del control.

$$\text{Actividad de inhibición de unión a rianodina} = (1 - (\text{radiactividad a la adición de sustancia FKI-1033} / \text{radiactividad de control})) \times 100$$

Según el resultado obtenido por el cálculo con la anterior ecuación, la sustancia FKI-1033 mostraba una actividad de inhibición de unión a rianodina $IC_{50} = 53,9 \mu M$, frente al receptor de rianodina de origen de ratón.

Como consecuencia, según los resultados del ensayo anterior, se confirmó que la sustancia FKI-1033 presentaba una inhibición de unión a rianodina más de diez veces más potente frente a receptor de rianodina de insecto que el receptor de rianodina de mamífero.

(5) La actividad antimicrobiana de FKI-1033 se muestra en lo siguiente

Se empaparon discos de papel (Advantech Inc., Japón, 6 mm de diámetro) con 10 μl de solución en metanol (1 mg/ml) de sustancia FKI-1033, y el disolvente se separó por secado hasta constancia en el tiempo. Se pusieron entonces los discos sobre la placa de agar que contenía cada microorganismo de ensayo. Las placas de agar se incubaron a 35°C durante un tiempo de 24 horas y se midió el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco de papel. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3

Microorganismo de ensayo	Diámetro de la zona de inhibición (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607	-
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	-
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2 (IFO 12734)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3080	-
<i>Xantomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> KB 88	-
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 23745	-
<i>Acholeplasma laidlawii</i> KB 174	-
<i>Candida albicans</i> KFI	-
<i>Saccharomices cerevisiae</i> KF 26	-
<i>Pyricularia oryzae</i> KF 180	-
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	-
<i>Mucor racemosus</i> IFO 4581	-

Como se muestra en la anterior Tabla 3, la sustancia FKI-1033 no presentaba actividades inhibitoras de crecimiento frente a varios microorganismos,

(6) En lo siguiente se explican con detalle las actividades anti-nematodo y anti-artrópodo de la sustancia FKI-2033.

Se añadió solución de metanol de sustancia FKI-1033 a una placa de 96 pocillos (Corning Inc., U.S.), se separó el metanol al vacío, se añadieron 250 μ l del medio de ensayo (lecitina 0,01%, hidrogenocarbonato de sodio 7,5 mM, cloruro de potasio 7,5 mM, dihidrato de cloruro de calcio 7,5 mM y heptahidrato de sulfato de magnesio 7,5 mM) y se agitó por sacudida durante 15 minutos.

A lo anterior se añadieron 50 μ l de tampón que contenía varios nauplios de *Artemia salina*, que se hicieron salir de los huevos al tampón, y a lo anterior se añadieron aproximadamente diez nematodos, *Caenorhabditis elegans*, que se criaron en medio agar para crecimiento de nematodos. Se observó al microscopio el aspecto de estos organismos al cabo de dos días, y la sustancia FKI-1033 inhibía el crecimiento de los artrópodos y nematodos a 20 μ g/ml.

Por consiguiente, la sustancia FKI-1033 se puede utilizar en productos farmacéuticos como inhibidor de la unión a rianodina, insecticida o agente antihelmíntico.

El mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se explica con un ejemplo pero no ha de entenderse que queda limitada con este ejemplo.

Se añadió cada cepa de lazada de *Verticillium* sp. FKI-1033 FERM BP-8219 cultivada sobre medio inclinado de agar a un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml de medio líquido (pH 6.0) consistente en glucosa 2,0%, Polipeptona (Nihon Seiyaku Co., Japón) 0,5%, extracto de levadura (Oriental Yeast Co., Japón) 0,2%, agar 0,1%, fosfato de dihidrógeno de potasio 0,1%, heptahidrato de sulfato de magnesio 0,05% y agua y se cultivó con agitación de sacudida a 27°C durante tres días. Se añadieron 20 ml de este líquido de cultivo de siembra a cada uno de los 4 matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían, cada uno, 80 ml de agua esterilizada y desionizada y se diluyeron. Se inocularon 10 ml del cultivo de siembra diluido a cada uno de 24 matraces Roux (1 litro de capacidad) que contenían 240 g de medio de producción (arroz italiano 150 g, agua del grifo 90 ml, heptahidrato de sulfato de hierro (II) 0,9 mg, pentahidrato de sulfato de cobre (II) 0,9 mg y hexahidrato de cloruro de cobalto 0,9 mg y se cultivó estáticamente a 27°C durante 13 días.

ES 2 318 053 T3

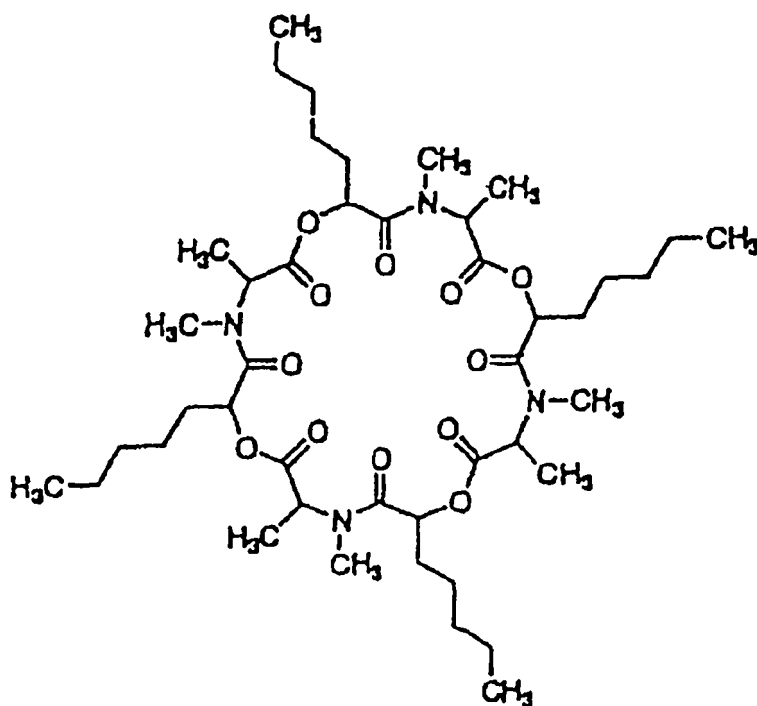
Se añadió una solución mixta de metanol:agua igual a 2:1 (200 ml) a cada uno de los 24 matraces Roux (1 litro), se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar durante 3 horas. Se eliminó el metanol al vacío y la solución acuosa obtenida se extrajo dos veces con igual cantidad de acetato de etilo. Utilizando sulfato de sodio anhidro, se deshidrató la solución de acetato de etilo y se secó al vacío para obtener 2,53 g de sustancia oleosa marrón oscuro. Esta se cargó sobre una columna de gel de sílice (φ 2,8 x 14,0 cm) se rellenó con hexano, se lavó con una mezcla de hexano-acetato de etilo (100:75), se eluyó con una mezcla de hexano-acetato de etilo (100:150) y se concentró al vacío para obtener 183 mg de sustancia oleosa marrón oscura. La sustancia se cargó en columna Sephadex LH-20 (φ 2,7 x 92 cm) y se eluyó con metanol para obtener 86,5 mg de sustancia FKI-1033 como sustancia oleosa incolora.

Aplicabilidad industrial

Como se ha explicado antes, la sustancia FKL-1033 se produce por cultivo de un microorganismo que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033 en el medio, acumulación de sustancia FKI-1033 en el medio, y aislamiento de la sustancia FKI-1033 de la masa de cultivo. La sustancia FKI-1033 tiene actividad de inhibición de la unión a rianodina, actividad insecticida, y actividad antihelmíntica, y se espera que la nueva sustancia FKI-1033 sea útil en productos químicos agrícolas, fármacos veterinarios y medicamentos que puedan ser satisfactorios desde el punto de vista de la eficacia, toxicidad, etc.

REIVINDICACIONES

1. Una sustancia FKI-1033 representada por la fórmula



2. Un procedimiento para la producción de sustancia FKI-1033 que comprende el cultivo de un microorganismo, que es un hongo que pertenece a *Verticillium sp.* que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033 en un medio, la acumulación de la sustancia FKI-1033 en el medio de cultivo y el aislamiento de la sustancia FKI-1033 en el medio de cultivo y aislamiento de la sustancia FKI-1033 desde la masa de cultivo.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2 donde el microorganismo que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033 es *Verticillium sp* FKI-1033 FERM BP-8219 o un mutante del mismo que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033.

4. Un microorganismo de *Verticillium sp* FKI-10 33, que es FERM-BP-8219 o un mutante del mismo que tiene la capacidad de producir sustancia FKI-1033 según la reivindicación 1.

5. Un microorganismo según la reivindicación 4 que es *Verticillium sp* FKI-1033 FERM BP-8219.

6. Una composición que comprende sustancia FKI-1033 como un ingrediente activo que tiene actividad de inhibidor de unión a rianodina.

7. Una composición que comprende sustancia FKI-1033 como ingrediente activo que tiene actividad insecticida y antihelmíntica.

8. Utilización de la sustancia FKI-1033 en la producción de un producto químico agrícola, fármaco veterinario o medicamento que tiene actividad insecticida y antihelmíntica para inhibir la unión de rianodina a receptor de rianodina.