



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 323 253**

⑫ Número de solicitud: 200500701

⑬ Int. Cl.:

C07H 17/08 (2006.01)

C12P 19/62 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **23.03.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2009**

Fecha de la concesión: **12.04.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **23.04.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.04.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Malpartida Romero, Francisco de;
Seco Martín, Elena María y
Cuesta Velasco, Trinidad**

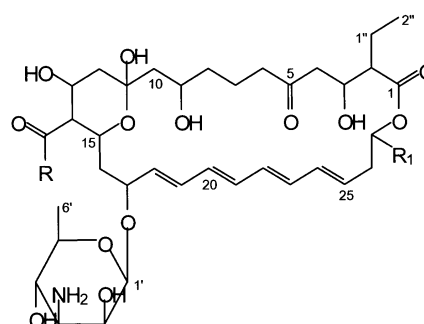
⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Nuevos polienos amidados, procedimiento para su obtención y aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Nuevos polienos amidados, procedimiento para su obtención y aplicaciones.

Los nuevos polienos amidados responden a la fórmula (I), donde R es NH₂ y R₁ es alquilo C₁-C₃, y tienen actividad biocida frente a organismos que poseen membranas celulares que contienen ergosterol, por ejemplo, hongos o parásitos. Estos compuestos pueden ser obtenidos mediante un procedimiento que comprende cultivar un microorganismo productor bajo condiciones que permitan su producción.



(I)

ES 2 323 253 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nuevos polienos amidados, procedimiento para su obtención y aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con nuevos polienos amidados, un procedimiento para su obtención y aplicaciones, por ejemplo, terapéuticas, agrícolas y agroalimentarias. La invención también se relaciona con microorganismos recombinantes productores de polienos amidados así como con vectores útiles para obtener dichos microorganismos.

10 **Antecedentes de la invención**

Las infecciones fúngicas representaban en el pasado un lugar poco relevante dentro del panorama de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, ese panorama ha cambiado radicalmente en los últimos veinte años. El aumento de los pacientes inmunodeprimidos, los trasplantes de médula y de órganos sólidos, el mayor número de pacientes cancerosos, los tratamientos quimioterápicos, la utilización de agentes inmunosupresores así como de agentes antimicrobianos de amplio espectro y de otros fármacos que alteran los mecanismos naturales de defensa, y la epidemia del SIDA, han sido responsables de este cambio. La infección nosocomial por especies fúngicas tiene cada vez mayor relevancia y son también más numerosas las especies fúngicas que se asocian a micosis profundas.

A pesar de la necesidad de disponer de fármacos antifúngicos, el número de estos productos farmacéuticos en el mercado para tratar infecciones sistémicas es peligrosamente bajo. La mayoría de ellos, tales como los azoles y los polienos, entre los que se encuentra la anfotericina B, tienen como diana la integridad estructural de las membranas fúngicas, si bien, en los últimos años, se han desarrollado fármacos antifúngicos (equinocandinas) que tienen como diana componentes específicos de la pared celular.

Los polienos son un grupo de macrólidos policetónicos muy interesantes debido a su actividad antifúngica. Estos compuestos contienen un anillo de macrolactona con numerosos dobles enlaces conjugados, formando cromóforos con un espectro característico en la zona del ultravioleta/visible; estas características son las responsables de sus propiedades físicas y químicas (gran absorción de luz, fotolabilidad y escasa solubilidad en agua). A pesar de la importancia de algunos ejemplos tales como la anfotericina B como fármacos antifúngicos, su mecanismo de acción preciso no se entiende bien todavía; no obstante, la actividad antifúngica parece deberse a interacciones entre las moléculas de polieno y las membranas que contienen esterol. Esta interacción proporciona un canal de iones y las membranas se hacen permeables causando la destrucción de gradientes electroquímicos y la consecuente muerte celular. Estos compuestos muestran una afinidad significativamente mayor a las membranas que contienen ergosterol (el principal esterol presente en las membranas de hongos y parásitos como *Trypanosoma* y *Leishmania*) que a las membranas que contienen colesterol (células de mamíferos). Sin embargo, la interacción entre los polienos y las membranas que contienen colesterol no es insignificante y causa efectos secundarios, lo que unido a la baja solubilidad, hace que el compuesto no sea totalmente satisfactorio para tratar infecciones sistémicas fúngicas. A pesar de estas propiedades indeseables y los efectos secundarios tóxicos de la anfotericina B, este antiguo fármaco ha sido empleado durante más de 40 años y sigue siendo el agente antifúngico preferido para tratar la mayoría de las infecciones sistémicas; de hecho, se admite que no hay mejores alternativas disponibles para luchar contra las enfermedades fúngicas emergentes. Algunos de los efectos indeseables pueden minimizarse mediante la liberación del fármaco en una formulación liposomal; ésto reduce la toxicidad de la anfotericina B y ha permitido su aplicación sistémica como antifúngico (micosis) y como antiparasitario (e.g., frente a leishmaniasis y trypanosomiasis, entre otros parásitos), organismos cuyas membranas celulares contienen ergosterol (Berman *et al.*, 1992, *Antimicrob. Agents Chemother* 36:1978-1980; Herwaldt, (1999), *The Lancet*. 354:1191-1199; Yardley *et al.*, 1999, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:163-197).

Por esta razón, el descubrimiento de nuevos fármacos antifúngicos o la mejora de las propiedades farmacológicas de los ya existentes constituye un reto apasionante. Con este objetivo, y empleando aproximaciones racionales de modelos moleculares, se han generado y ensayado varios derivados semi-sintéticos de anfotericina B como fármacos antifúngicos eficaces. Para efectuar las modificaciones estructurales se han considerado, entre otros, dos blancos principales: el grupo carboxílico de la cadena lateral y el grupo amino del azúcar. Aunque algunos de estos derivados semi-sintéticos todavía mostraban la misma toxicidad, otros presentaban características farmacológicas mejoradas comparadas con la molécula de anfotericina B: mayor actividad antifúngica, mayor solubilidad en agua, mayor especificidad por membranas que contienen ergosterol y menor actividad hemolítica, lo que sugería una mayor especificidad por las membranas que contienen ergosterol. Aunque la mayor actividad antifúngica le confiere alguna ventaja a estos compuestos, sorprendentemente estas modificaciones estructurales no están comúnmente representadas dentro de los polienos naturales aislados procedentes de microorganismos. De hecho, todos los polienos descritos hasta la fecha como fármacos mejorados son derivados semi-sintéticos, generados por síntesis orgánica en lugar de por biotransformaciones.

Aunque se dispone de diversos agentes antifúngicos no poliénicos, el uso de estos fármacos favorece la selección y desarrollo de cepas resistentes a ellos que pueden comprometer en un futuro la eficacia de esos compuestos para el tratamiento antifúngico. Existe, por tanto, un interés generalizado en la búsqueda de nuevos fármacos antifúngicos y en la mejora de las propiedades farmacológicas de los ya existentes.

Compendio de la invención

Los inventores de la invención han encontrado que mediante la manipulación genética de *Streptomyces diastaticus* var. 108, una cepa productora de dos antibióticos macrólidos poliénicos (rimocidina y CE-108) (Pérez-Zúñiga *et al.*, (2004), J. Antibiot. (Tokio) 57:197-204), por transformación con vectores derivados de SCP2* que portan el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*) (Uchiyama *et al.*, (1985), Gene 38:103-110) se obtienen además de los dos polienos nativos, dos nuevos macrólidos poliénicos en el caldo de fermentación de la cepa recombinante que, una vez caracterizados químicamente, resultaron ser las amidas de los ácidos carboxílicos de los polienos de los que proceden. La actividad biológica y algunos ensayos de toxicidad *in vitro* mostraron que la modificación química presente en los nuevos compuestos (amida en lugar de ácido carboxílico) confiere propiedades biológicas mejoradas comparadas con las que presentan los productos de los que proceden.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con dos polienos amidados identificados más adelante en esta descripción como rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib); su obtención y aplicaciones constituyen aspectos adicionales de esta invención.

Dichos compuestos tienen actividad biocida, que, en particular, es más selectiva frente a organismos que tienen membranas celulares que contienen ergosterol, bien hongos o parásitos. Composiciones biocidas, por ejemplo, composiciones farmacéuticas y/o composiciones antifúngicas para uso agrícola o agroalimentario que contengan dichas amidas, constituyen un aspecto adicional de esta invención. El empleo de dichos polienos amidados en composiciones farmacéuticas con fines sanitarios para uso humano o animal y/o composiciones antifúngicas de uso agrícola o agroalimentario constituye otro aspecto de esta invención.

La invención se relaciona, en otro aspecto, con un procedimiento para la producción de dichos polienos amidados que comprende cultivar un microorganismo recombinante productor de dichos compuestos bajo condiciones que permitan la producción de dichos polienos amidados, y, si se desea, aislar y purificar dichos compuestos. Ejemplos ilustrativos de dichos microorganismos recombinantes incluyen *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B y *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B (invención), los cuales constituyen un aspecto adicional de esta invención así como el empleo de éstos o similares microorganismos recombinantes en la obtención de dichos polienos amidados y, opcionalmente, en la obtención de mezclas de éstos con polienos que contienen un grupo carboxilo.

Breve descripción de las figuras

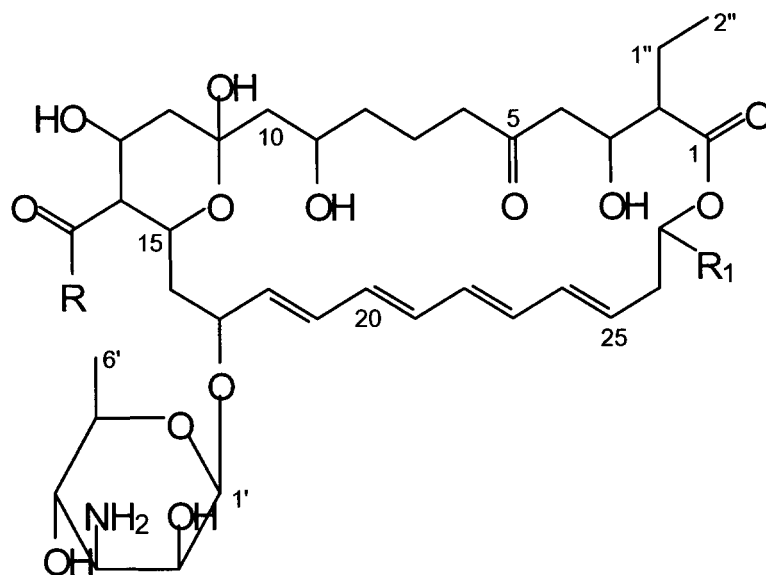
La Figura 1 muestra una representación esquemática de los mapas físicos de los plásmidos recombinantes pSM743B (gen *rimA* introducido en pIJ922) [Figura 1A] y pSM784 (gen *ermE* introducido en pIJ941) [Figura 1B]. En dichas Figuras 1A y 1B, *xysAp*: promotor *xysA*; *rimA*: PKS Tipo I involucrada en la ruta biosintética de CE-108 y rimocidina; *Ti*: terminador del gen de resistencia de metilenomicina; *ermE*, *tsr* y *hyg*: genes de resistencia a eritromicina, tiostrepton e higromicina, respectivamente; *rimI**: *rimI* truncado en su N-terminal. La Figura 1C muestra el perfil cromatográfico (HPLC) del caldo de fermentación de la cepa modificada genéticamente *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B. En dicha Figura 1C, los números 1-4 representan 1: CE-108B (Ib); 2: CE-108 (IIb); 3: rimocidina B (Ia); y 4: rimocidina (IIa).

La Figura 2 muestra la actividad antifúngica de los cuatro tetraenos producidos por *S. diastaticus* var. 108/743B. En dicha figura A: rimocidina (IIa), B: rimocidina B (Ia), C: CE-108 (IIb), D: CE-108B (Ib). Los números que aparecen sobre cada uno de los antibiogramas hacen referencia a las cantidades aplicadas de cada uno de los polienos expresadas en nanomoles. Los organismos diana fueron: *P. chrysogenum*, *C. krusei*, *A. niger*, *C. albicans* y *C. neoformans* (véase la Tabla 1).

(Esquema pasa a página siguiente)

Descripción detallada de la invención**1. Nuevos polienos amidados**

En un aspecto, la invención se relaciona con un compuesto de fórmula (I)



(I)

en donde

R es NH_2 ; y

R_1 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$,

o un isómero, sal, profármaco o solvato del mismo.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) anteriormente descrita pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Tal como aquí se utiliza, el término “sal” incluye tanto sales farmacéuticamente aceptables, es decir, sales del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizadas en la elaboración de un medicamento, como sales farmacéuticamente no aceptables ya que éstas pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza de la sal farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Entre las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) se encuentran las sales de adición de ácido, las cuales pueden obtenerse a partir de ácidos, orgánicos o inorgánicos, por métodos convencionales bien conocidos por los técnicos en la materia haciendo reaccionar el ácido apropiado con el compuesto de fórmula (I) en la cantidad estequiométrica adecuada. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de ácidos que pueden utilizarse para la obtención de dichas sales de adición de ácido incluyen ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido p-toluen-sulfónico, etc., o inorgánicos, por ejemplo, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, etc.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran las profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho

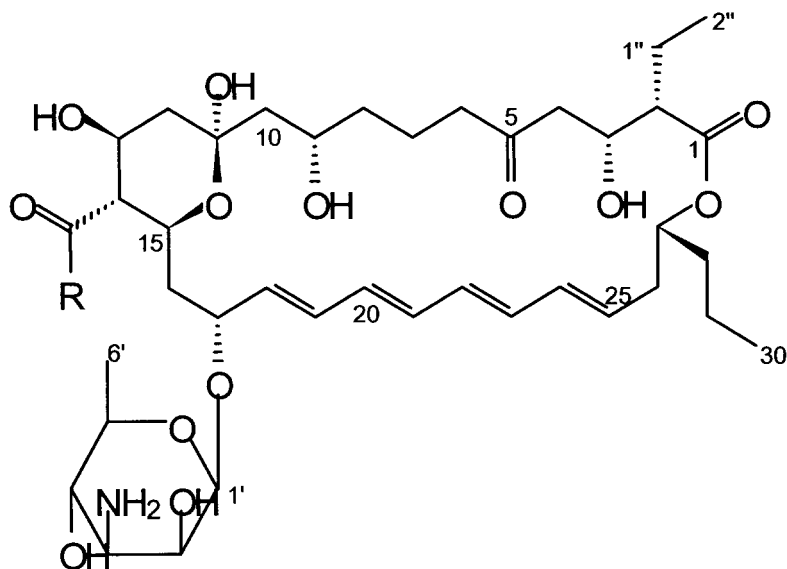
derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación bien conocidos por los técnicos en la materia.

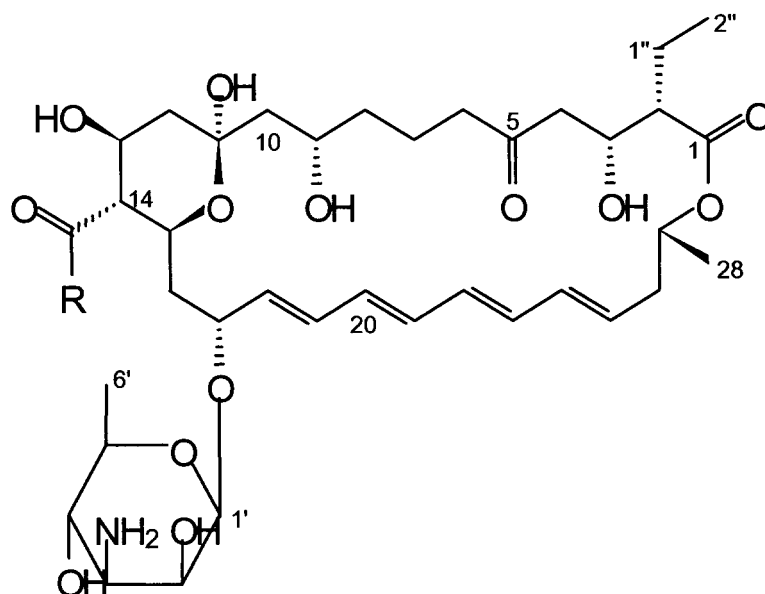
Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus isómeros, sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos de la invención también incluyen compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen dicha estructura, a excepción de la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o por tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C o un nitrógeno enriquecido en ^{15}N , están dentro del alcance de esta invención.

En una realización particular, dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo formado por los compuestos identificados en esta descripción como "rimocidina B", de fórmula (Ia), y "CE-108B", de fórmula (Ib):



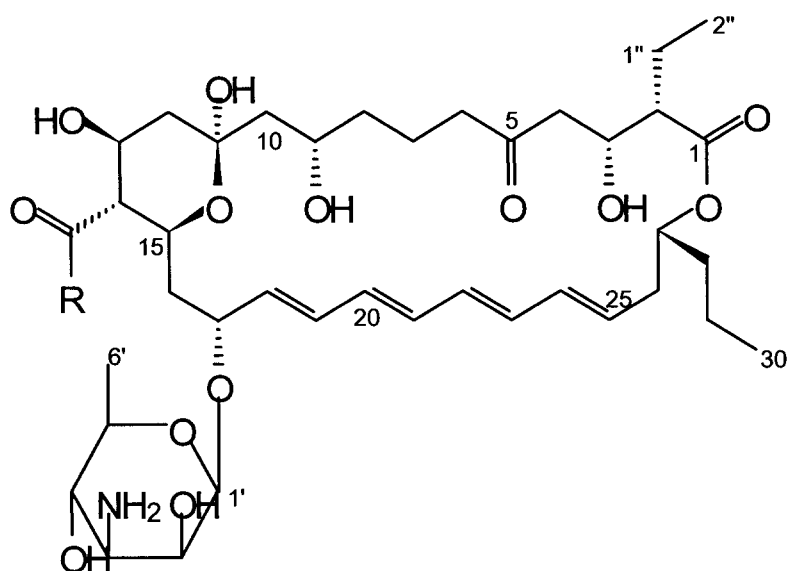
(Ia) $\text{R} = \text{NH}_2$



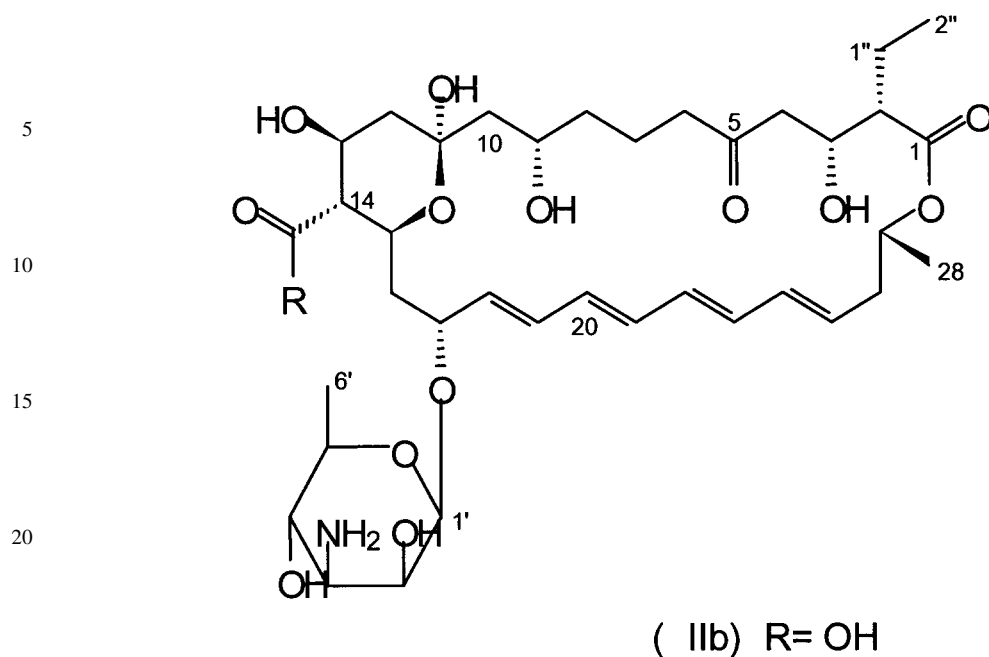
(Ib) $R = NH_2$

sus isómeros, sales, profármacos o solvatos.

Estos dos nuevos polienos amidados [rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib)] han sido denominados así porque son las amidas correspondientes de los compuestos naturales rimocidina (IIa) y CE-108 (IIb)



(IIa) $R = OH$



La estructura química de dichos compuestos ha sido caracterizada mediante diversas técnicas al igual que su actividad biológica (por ejemplo, espectrometría, RMN, antibiogramas, actividad hemolítica, etc). La sustitución del grupo carboxilo libre, presente en el anillo de macrolactona de la rimocidina y CE-108, por un grupo amida parece determinar una mayor afinidad hacia membranas con ergosterol (tales como, la de hongos y, otros organismos como los parásitos *Trypanosoma* y *Leishmania*) que hacia membranas con colesterol (presente en las células animales). Esta modificación química incrementa la toxicidad selectiva de estos polienos hacia hongos lo que constituye una clara ventaja de cara a su aplicación clínica. De hecho, los ensayos de actividad fungicida (Figura 2) y toxicidad frente a células animales (eritrocitos) (Tabla 3), revelan una mayor toxicidad selectiva hacia los hongos que los tetraenos parentales rimocidina y CE-108. Semejante especificidad es aplicable a otros organismos con ergosterol en sus membranas, tales como los parásitos *Leishmania* y *Trypanosoma*.

2. Aplicaciones de los nuevos polienos amidados

Los compuestos de fórmula (I) tienen, en general, actividad biocida, y, en particular, actividad biocida frente a organismos que poseen una membrana celular que contiene ergosterol, por lo que son potencialmente útiles como biocidas. Tal como se utiliza en esta descripción, un “biocida” es una sustancia química que detiene el crecimiento o mata a distintos tipos de seres vivos.

Asimismo, la expresión “organismos que poseen una membrana celular que contiene ergosterol” incluye a cualquier organismo provisto de una membrana celular que contiene ergosterol, por ejemplo, hongos, parásitos, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos organismos incluyen los parásitos *Trypanosoma*, *Leishmania*, etc., así como hongos tales como *Fusarium oxysporium*, *Botrytis cinerea* (fitopatógenos), *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans* (patógenos humanos), entre otros.

Por tanto, dichos compuestos de fórmula (I), en particular, los compuestos rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib) son potencialmente útiles como biocidas frente a dichos organismos que poseen una membrana celular que contiene ergosterol. En una realización particular, dichos compuestos son más útiles como agentes antiparasitarios o como agentes antifúngicos que los correspondientes polienos no amidados. El término “antifúngico” incluye tanto fungicidas como fungistáticos.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención se relaciona con una *composición biocida* que comprende un compuesto de fórmula (I), junto con un vehículo inerte. En una realización particular, dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo formado por rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas. Dicha composición biocida es particularmente útil frente a organismos que poseen membranas celulares que contienen ergosterol. En una realización particular, dicha composición biocida es una composición antifúngica que comprende un compuesto de fórmula (I), tal como un compuesto seleccionado entre los compuestos rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas, junto con, opcionalmente, uno o más vehículos inertes.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “inerte” significa que dicho vehículo no tiene una actividad biocida significativa.

Si se desea, dicha composición biocida puede contener, además, otros biocidas, naturales, recombinantes o sintéticos, que, eventualmente, potencien la acción biocida de dicho compuesto de fórmula (I), por ejemplo, de los compuestos rimocidina B y/o CE-108B o bien que incrementen su espectro de acción.

2.1 Aplicaciones terapéuticas

Un campo importante donde encuentran aplicación los compuestos de fórmula (I), en particular, los compuestos rimocidina B y/o CE-108B, es en Sanidad humana y animal. Por tanto, en una realización particular, la invención proporciona una *composición farmacéutica* que comprende un compuesto de fórmula (I), junto con, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre los compuestos rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye adyuvantes, sólidos o líquidos, disolventes, tensioactivos, etc.

Si se desea, dicha composición farmacéutica puede contener, además, uno o más agentes terapéuticos que, eventualmente, potencien la acción terapéutica de dicho compuesto de fórmula (I), por ejemplo, de los compuestos rimocidina B y/o CE-108B, o bien que incrementen su espectro de acción.

Dicha composición farmacéutica puede ser utilizada para prevenir y/o tratar infecciones causadas por organismos patógenos de humanos o animales que poseen membranas celulares que contienen ergosterol, por ejemplo, parásitos y hongos patógenos de humanos o animales.

Por tanto, en una realización concreta, dicha composición farmacéutica es una composición antiparasitaria y puede ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por parásitos cuyas membranas celulares contienen ergosterol, por ejemplo, *Typanosoma*, *Leishmania*, etc. Si se desea, dicha composición antiparasitaria puede contener, además, uno o más agentes antiparasitarios que, eventualmente, potencien la acción terapéutica de dicho compuesto de fórmula (I), por ejemplo, de los compuestos rimocidina B y/o CE-108B, o bien que incrementen su espectro de acción.

En otra realización concreta, dicha composición farmacéutica es una composición antifúngica y puede ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por hongos (cuyas membranas celulares contienen ergosterol). Si se desea, dicha composición antifúngica puede contener, además, uno o más agentes antifúngicos que, eventualmente, potencien la acción antifúngica de dicho compuesto de fórmula (I), por ejemplo, rimocidina B y/o CE-108B, o bien que incrementen su espectro de acción. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos agentes antifúngicos incluyen polienos, tales como anfotericina B, nistatina, AB-400, alilaminas (e.g., terbinafina, naftifina, etc.), amorolfia, tolnaftalato, etc.; azoles, tales como clotrimazol, miconazol, ketoconazol, fluconazol, itraconazol, etc.; benzofuranos, por ejemplo, griseofulvina, etc.; pirimidinas, por ejemplo, flucitosina, etc.

El compuesto de fórmula (I) estará presente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad apropiada para ejercer su efecto terapéutico. En una realización particular, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, contiene entre 0,01% y 99,99% en peso de un compuesto de fórmula (I), tal como un compuesto seleccionado entre los compuestos rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas, y puede presentarse en cualquier forma farmacéutica de administración apropiada en función de la vía de administración elegida, por ejemplo, oral, parenteral o tópica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, 1ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Por tanto, la invención también se relaciona con el empleo de un compuesto de fórmula (I) en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por organismos patógenos de humanos o animales cuyas membranas celulares contienen ergosterol, por ejemplo, parásitos de humanos o animales o bien hongos patógenos de humanos o animales. En una realización particular, dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

Asimismo, en otro aspecto, la invención también proporciona un método para prevenir y/o tratar infecciones causadas por organismos patógenos de humanos o animales cuyas membranas celulares contienen ergosterol, por ejemplo, parásitos de humanos o animales o bien hongos patógenos de humanos o animales, que comprende la etapa de administrar a un animal o a un ser humano, en necesidad de tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica proporcionada por esta invención.

2.2 Aplicaciones agrícolas

Otro sector importante en el que encuentran aplicación los compuestos de fórmula (I), en particular, los compuestos rimocidina B (Ia) y/o CE-108B (Ib), es en el sector agrícola. En este sentido, la invención proporciona una

composición antifúngica útil para controlar la infección causada por hongos fitopatógenos (tales como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solana*, *Rhizoctonia meloni*, *Ustilago maydis*, entre otros) cuyas membranas celulares contienen ergosterol, que comprende un compuesto de fórmula (I), tal como un compuesto seleccionado entre los compuestos rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas, junto con, opcionalmente, uno o más vehículos inertes agrícolamente aceptables. La aplicación se extiende a tratamiento, fundamentalmente preventivo, para evitar o controlar infecciones fúngicas en condiciones de almacenamiento de productos agroalimentarios (infecciones post-cosecha), causadas por diversos hongos cuyas membranas contienen ergosterol.

Tal como aquí se utiliza, el término “controlar” incluye la inhibición, reducción o paralización de la germinación de las esporas y/o del crecimiento del micelio de hongos que puede resultar en la eliminación de dichos hongos o en la disminución de los daños causados por éstos.

La expresión “vehículo inerte agrícolamente aceptable” tal como aquí se utiliza se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector agrícola, utilizadas para vehiculizar compuestos de interés, e incluye adyuvantes, sólidos o líquidos, diluyentes, disolventes, tensioactivos, etc.

En una realización particular, dicha composición antifúngica comprende, además de dicho compuesto de fórmula (I), por ejemplo, un compuesto seleccionado entre rimocidina B, CE-108B y sus mezclas, uno o más compuestos con actividad antifúngica, por ejemplo, uno o más compuestos que alteran la membrana celular de los hongos, o uno o más compuestos que inhiben la síntesis de ergosterol, tales como los compuestos mencionados previamente, o bien uno o más compuestos con actividades enzimáticas requeridas para la modificación o degradación de paredes celulares, por ejemplo, una o más enzimas líticas capaces de modificar o degradar paredes celulares de hongos, tales como enzimas con actividad celulolítica, mananolítica, quitinolítica o proteolítica (e.g., celulasas, α -(1,3)-glucanasas, β -(1,6)-glucanasas, β -(1,3)-glucanasas, mananasas, endo- o exo- quitinasas, quitosanasas, proteasas, α - o β -manosidasas, etc.

El compuesto de fórmula (I) estará presente en dicha composición antifúngica en una cantidad antifúngica eficaz, es decir, en una cantidad apropiada para controlar la infección causada por hongos fitopatógenos. En una realización particular, la composición antifúngica útil para controlar hongos fitopatógenos proporcionada por esta invención, contiene entre 0,01% y 100% en peso de dicho compuesto de fórmula (I), por ejemplo, de dichos compuestos rimocidina B (Ia) y/o CE-108B (Ib). Dicha composición puede prepararse por métodos convencionales y puede presentarse en forma líquida o sólida, por ejemplo, en forma de un granulado. Adicionalmente, dicha composición puede contener aditivos, por ejemplo, conservantes y estabilizantes que prolonguen la conservación y estabilidad de la misma.

Dicha composición antifúngica puede ser usada, por ejemplo, para controlar infecciones causadas por hongos fitopatógenos en plantas y/o en frutos. Por tanto, la invención proporciona un método para controlar la infección causada por un hongo fitopatógeno en una planta, en particular, un hongo fitopatógeno cuya membrana celular contiene ergosterol, que comprende aplicar a dicha planta, o al medio que la rodea, dicha composición para controlar dicho hongo fitopatógeno. En una realización particular, dicho método comprende la aplicación de dicha composición, en una cantidad adecuada, sobre las partes aéreas de la planta con el fin de prevenir y/o tratar una infección fúngica causada por un hongo fitopatógeno.

La invención también proporciona un método para controlar la infección causada por hongos fitopatógenos en un fruto, en particular, un hongo fitopatógeno cuya membrana celular contiene ergosterol, que comprende aplicar a dicho fruto dicha composición para controlar hongos fitopatógenos. En una realización particular de dicho método, la aplicación de dicha composición, en una cantidad eficaz, sobre el fruto se realiza antes de la recogida del mismo (pre-cosecha) mientras que en otra realización alternativa la aplicación de la composición se efectúa sobre el fruto ya recogido (post-cosecha).

2.3 Aplicaciones agroalimentarias

Los compuestos de fórmula (I), en particular rimocidina B (Ia) y/o CE-108B (Ib), tienen también aplicación en el sector agroalimentario. En este sentido, la invención proporciona una composición antifúngica útil para el control de hongos que eventualmente puedan desarrollarse sobre preparados alimentarios, por ejemplo, sobre la superficie de preparados alimentarios, tales como derivados lácteos, por ejemplo, quesos, etc., que comprende un compuesto de fórmula (I), tal como un compuesto seleccionado entre los compuestos rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas, junto con, opcionalmente, uno o más vehículos inertes aceptables desde el punto de vista agroalimentario, tales como suspensiones liposómicas, en agua, etc., entre otras.

El término “control” incluye la inhibición, reducción o paralización de la germinación de esporas y/o el crecimiento del micelio de hongos que puede resultar en una notable disminución de los daños causados por éstos; de este modo se puede prevenir o tratar el expolio de alimentos causado por el crecimiento de hongos.

El término “vehículo inerte aceptable desde el punto de vista agroalimentario” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector agroalimentario, utilizadas para vehiculizar compuestos de interés, e incluye adyuvantes, sólidos o líquidos, diluyentes, disolventes, tensioactivos, etc.

En una realización particular, dicha composición antifúngica comprende, además de dicho compuesto de fórmula (I), por ejemplo, un compuesto seleccionado entre rimocidina B, CE-108B y sus mezclas, uno o más compuestos con actividad antifúngica, por ejemplo, uno o más compuestos que alteran la membrana celular de los hongos, o uno o más compuestos que inhiben la síntesis de ergosterol, tales como los compuestos mencionados previamente, o bien uno o más compuestos con actividades enzimáticas requeridas para la modificación o degradación de paredes celulares, por ejemplo, una o más enzimas líticas capaces de modificar o degradar paredes celulares de hongos, tales como enzimas con actividad celulolítica, mananolítica, quitinolítica o proteolítica (e.g., celulasas, α -(1,3)-glucanasas, β -(1,6)-glucanasas, β -(1,3)-glucanasas, mananasas, endo- o exo- quitinasas, quitosanasas, proteasas, α - o β -manosidasas, etc.

El compuesto de fórmula (I) estará presente en dicha composición antifúngica en una cantidad antifúngica eficaz, es decir, en una cantidad apropiada para controlar la infección causada por hongos susceptibles de desarrollarse sobre preparados alimentarios. En una realización particular, dicha composición antifúngica útil para controlar hongos capaces de desarrollarse sobre preparados alimentarios proporcionada por esta invención, contiene entre 0,01% y 100% en peso de dicho compuesto de fórmula (I), por ejemplo, de dichos compuestos rimocidina B (Ia) y/o CE-108B (Ib). Dicha composición puede prepararse por métodos convencionales y puede presentarse en forma líquida o sólida, por ejemplo, en forma de un granulado. Adicionalmente, dicha composición puede contener aditivos, por ejemplo, conservantes y estabilizantes que prolonguen la conservación y estabilidad de la misma.

Dicha composición antifúngica puede ser usada para controlar infecciones causadas por hongos susceptibles de desarrollarse en preparados alimentarios, por ejemplo, sobre la superficie de preparados alimentarios. Por tanto, la invención también proporciona un método para controlar la infección causada por un hongo capaz de desarrollarse en un preparado alimentario, en particular, un hongo susceptible de desarrollarse en un preparado alimentario cuya membrana celular contiene ergosterol, que comprende aplicar a dicho preparado alimentario, o al medio que rodea, dicha composición antifúngica para controlar dicho hongo capaz de desarrollarse en un preparado alimentario. En una realización particular, dicho método comprende la aplicación de dicha composición, en una cantidad adecuada, sobre la superficie del preparado alimentario con el fin de prevenir y/o tratar el expolio de alimentos debido al crecimiento fúngico. Dicha composición antifúngica se aplica externamente sobre la superficie del preparado alimentario.

3. Obtención de los nuevos polienos amidados

Compuestos de fórmula (I), en particular, los compuestos rimocidina B (Ia) y/o CE-108B (Ib) están presentes en el caldo de fermentación de los microorganismos recombinantes identificados en esta descripción como *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B y *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, obtenidos por transformación de *Streptomyces diastaticus* var. 108 (Pérez-Zuñiga F.J., et al., 2004, J. Antibiot. (Tokyo) 57:197-204) con los plásmidos identificados en esta descripción como pSM743B y pSM784, respectivamente, o del microorganismo recombinante identificado como *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B obtenido por transformación de *Streptomyces diastaticus* var. 108/PM1-500 (Seco E.M., et al., 2004, Chem. Biol. 11:357-366) con el plásmido identificado como pSM743B, tal como se describe en el Ejemplo que acompaña a esta descripción y se recoge en la Tabla 1. Dichos compuestos pueden ser obtenidos directamente a partir de dichos caldos de fermentación y purificados con facilidad por procedimientos convencionales relativamente sencillos, por ejemplo, mediante el empleo de columnas de intercambio iónico y/o columnas de interacción hidrofóbica o fase reversa.

El plásmido pSM743B (Tabla 1) (Figura 1A) deriva del plásmido pIJ922 y comprende el gen *rimA* (fragmento de ADN comprendido entre los nucleóticos 9336 a 14445 de la secuencia depositada en Bancos de Genes de acceso público con el número de acceso AY442225) y el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*). El plásmido pSM784 (Tabla 1) (Figura 1B) deriva del plásmido pIJ941 y comprende el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*).

Dichos plásmidos pIJ922 y pIJ941 (Lydiat D.J. et al., 1985, Gene 35:223-235) son vectores derivados del replicón SCP2*, un plásmido de bajo número de copias procedente de *Streptomyces coelicolor*.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula (I), que comprende cultivar un microorganismo seleccionado entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B y combinaciones de los mismos, bajo condiciones que permitan la producción de compuestos de fórmula (I), y, si se desea, aislar y purificar dichos compuestos. En una realización particular, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

4. Microorganismos recombinantes y aplicaciones

Los microorganismos recombinantes *Streptomyces diastaticus* var. 108/784 (depositado en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania, el 14 de marzo de 2005, correspondiéndole el número de acceso DSM 17187), *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B y *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B (puede ser obtenido por técnicos de laboratorio con habilidades medias en manipulaciones genéticas rutinarias, por transformación del disruptante *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500, E.M., Seco E.M.

et al., 2004, Chem. Biol. 11:357-366) con el plásmido pSM743B, Tabla 1 y Figura 1A), forman parte de la presente invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo seleccionado entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784 y *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B, y proporciona un cultivo de un microorganismo seleccionado entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B y combinaciones de los mismos.

Asimismo, la invención se relaciona con el empleo de un microorganismo seleccionado entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B y combinaciones de los mismos, o de dicho cultivo de microorganismos seleccionados entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B y combinaciones de los mismos, en la obtención de un compuesto de fórmula (I). En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

Además, los ensayos realizados por los inventores pusieron de manifiesto que el caldo de fermentación de dichos microorganismos recombinantes *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784 y *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B también contiene, además de los polienos amidados rimocidina B (Ia) y/o CE-108B (Ib), los polienos no amidados rimocidina (IIa) y/o CE-108 (IIb), los cuales contienen un grupo carboxilo libre.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de un compuesto seleccionado entre un compuesto de fórmula (I), rimocidina (IIa), CE-108 (IIb) y sus mezclas, que comprende cultivar un microorganismo seleccionado entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B y combinaciones de los mismos, bajo condiciones que permitan la producción de un compuesto seleccionado entre un compuesto de fórmula (I), rimocidina (IIa), CE-108 (IIb) y sus mezclas, y, si se desea, aislar y purificar dicho compuesto. En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un microorganismo seleccionado entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B y combinaciones de los mismos, en la obtención de un compuesto seleccionado entre un compuesto de fórmula (I), rimocidina (IIa), CE-108 (IIb) y sus mezclas.

El caldo de fermentación de un microorganismo seleccionado entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B y combinaciones de los mismos, que comprende un compuesto seleccionado entre un compuesto de fórmula (I), rimocidina (IIa), CE-108 (IIb) y sus mezclas, puede ser potencialmente útil como biocida y constituye un aspecto adicional de esta invención. En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

El medio de cultivo de dichos microorganismos recombinantes comprende, en general, una o más fuentes de carbono, una o más fuentes de nitrógeno, una o más sales inorgánicas asimilables por el microorganismo, y, si es necesario, uno o más nutrientes orgánicos, tales como vitaminas y aminoácidos, disueltos en un medio acuoso. Dichos medios, al igual que las condiciones apropiadas (aireación/agitación, temperatura y tiempo de fermentación, etapas, etc.), son conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de los medios y condiciones para crecer dichos microorganismos recombinantes se mencionan en el Ejemplo (apartado "Procedimientos experimentales"). El caldo de fermentación de dichos microorganismos recombinantes seleccionados entre *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B, *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B y combinaciones de los mismos, comprende un compuesto seleccionado entre un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib), rimocidina (IIa), CE-108 (IIb) y sus mezclas, y puede utilizarse como tal o bien puede ser tratado posteriormente para separar el compuesto o compuestos de interés, los cuales pueden aislarse por métodos convencionales. A modo ilustrativo, en una realización particular, el cultivo celular se centrifuga para separar el sobrenadante y el extracto celular y el sobrenadante se utiliza para aislar y, si se desea, purificar, el polieno, amidado o no-amidado, de interés. El estudio de las características físico-químicas de dichos compuestos permite diseñar un procedimiento para su purificación a partir del sobrenadante.

5. Vectores y aplicaciones

El plásmido pSM784, derivado del vector pIJ941 sobre el cual se ha clonado el gen de resistencia a eritromicina, cuando es introducido en *S. diastaticus* var. 108, da lugar a una cepa (*S. diastaticus* var. 108/784) productora de los nuevos polienos amidados rimocidina B y CE-108B, además de rimocidina y CE-108.

Asimismo, cuando el plásmido pSM743B, derivado de un vector SCP2* más el gen *ermE* y portador, además, de un fragmento del cluster *rim* (comprendido entre los nucleóticos 9336 y 15445, de la secuencia de ADN con número de Acceso AY442225, que comprende el gen *rimA*) expresado bajo un promotor, endógeno o exógeno, tal como el promotor del gen *xyxA* (fragmento de ADN *BglIII-SmaI* de 547 pares de bases, *xyxA*) del gen de la xilanasa de *Streptomyces halstedii* JM8 (Ruiz-Arribas A., *et al.*, 1997, Appl. Environ. Microbiol., 63:2983-2988), es introducido en *S. diastaticus* var. 108 o en *S. diastaticus* var. 108::PM1-500, se ha observado un incremento en la producción

ES 2 323 253 B1

total tanto de polienos amidados (rimocidina B y CE-108B) como de polienos no amidados (rimocidina y CE-108). Este hecho podría ser utilizado para incrementar la producción total de polienos con grupo carboxílico y/o polienos amidados en otros organismos productores de dichos polienos.

Prácticamente cualquier vector derivado del vector SCP2* puede ser utilizado, por ejemplo, pIJ922, pIJ941, etc. El gen *ermE* es un gen conocido (Uchiyama *et al.*, (1985), Gene 38:103-110). Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que un ácido nucleico que comprende uno o más fragmentos del vector SCP2*, junto con el gen *ermE*, es necesario y suficiente para que en los microorganismos recombinantes se generen los polienos amidados.

Ejemplo 1

Producción y caracterización de rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib)

I. Procedimientos experimentales

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos se describen en la Tabla 1.

Streptomyces diastaticus var. 108 y sus derivados por modificación genética se crecieron de forma rutinaria en medio líquido y sólido SYM2 (Atlas R.M., Microbiological Media. CRC Press, Boca Ratón, Florida) para el análisis de la producción de tetraenos, y en un medio líquido TSB (Oxoid) para la extracción de plásmidos y de ADN total.

Streptomyces lividans TK21 se utilizó como hospedador general de clonación y se creció en un medio sólido R5 y en medio líquido YEME tal como se describe en manuales de campo (Kieser T. *et al.*, 2000, Practical *Streptomyces* Genetics, Norwich).

Las cepas de *E. coli* se crecieron en agar Luria-Bertani (LB) o en caldos LB según se describe en la literatura especializada (Maniatis T. *et al.*, 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

P. chrysogenum, *C. krusei*, *A. niger*, *C. albicans* y *C. neoformans*, hongos empleados para ensayar la actividad antifúngica, se crecieron en medio MPDA (composición: 2% de extracto de malta, 2% de glucosa, 0,1% de Bactopeptona).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 323 253 B1

TABLA 1

Cepas bacterianas y plásmidos empleados en la invención

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Cepa o plásmido	Propiedades	Referencia
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108	Cepa silvestre, productora de rimocidina y CE-108	(a)
<i>S. diastaticus</i> var.108/922	Cepa derivada de la silvestre <i>S. diastaticus</i> var. 108 por transformación con el plásmido pIJ922 (control)	Esta invención
<i>S. diastaticus</i> var.108/PM1-500	Cepa derivada de la silvestre con el gen <i>rimA</i> interrumpido por integración del fago PM1-500; no productora de tetraenos	(b)
<i>S. diastaticus</i> var.108/743B	Cepa derivada de la silvestre por transformación con el plásmido pSM743B; productora de CE-108, rimocidina, CE-108B y rimocidina B	Esta invención
<i>S. diastaticus</i> var.108::PM1- 500/743B	Cepa derivada de la silvestre con el gen <i>rimA</i> interrumpido por integración del fago PM1-500 y transformada con el plásmido pSM743B; productora de CE-108, rimocidina, CE-108B y rimocidina B	Esta invención
<i>S. diastaticus</i> var. 108/784	Cepa derivada de la silvestre por transformación con el plásmido pSM784; productora de CE-108, rimocidina, CE-108B y rimocidina B	Esta invención
<i>S. sp.</i> RGU5.3	Cepa silvestre; productora de pimarcina y AB-400	Esta invención
<i>E. coli</i> JM101	Hospedador general de clonaje	(c)
<i>S. lividans</i> TK21	Hospedador general de clonaje	(d)
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC10003	Ensayos de actividad antifúngica	ATCC
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	Ensayos de actividad antifúngica	ATCC
<i>Candida krusei</i> ATCC14243	Ensayos de actividad antifúngica	ATCC
<i>Aspergillus niger</i> ATCC1004	Ensayos de actividad antifúngica	ATCC
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC10226	Ensayos de actividad antifúngica	ATCC
pIJ922	Vector basado en el replicón SCP2*, <i>tsr</i> , 24 kb	(e)
pIJ941	Vector basado en el replicón SCP2*, <i>tsr</i> , <i>hyg</i> , 25 kb	(e)
pNAe-1	Gen <i>ermE</i> clonado en pUK21	Esta invención
pHis1	Vector replicativo en <i>E. coli</i> transportando el promotor xilanas <i>xysA</i> (<i>xysAp</i>), Ap ^R , 3,7 kb	(f)
pSM736	Fragmentos de 1,2 kb SacI-DraIII y 4,9 kb DraIII-BglIII que contienen <i>rimA</i> clonado simultáneamente en sitios SacI/BamHI de pIJ2925	Esta invención
pSM738	Fragmento de 6,1 kb BglIII-PstI de pSM736 (gen <i>rimA</i>) y fragmento de 1,7 kb PstI-SphI de pNAe-1 (gen <i>de</i> resistencia <i>ermE</i>) clonados simultáneamente en sitios SmaI/SphI de pHis1	Esta invención
pSM743B	Fragmento de 8,4 kb BglIII de pSM738 (que contiene <i>xysAp</i> , <i>rimA</i> y <i>ermE</i>) clonado dentro del sitio EcoRV de pIJ922 (ver Figura 1)	Esta invención
pGAe-1	Gen <i>ermE</i> clonado en pSL1180	Esta invención

pSM784

Fragmento de 1,8 kb SspI-EcoRV de pGAe-1 (gen de resistencia *ermE*) clonado dentro del sitio EcoRV de pIJ941 (ver Figura 1)

Esta invención

Ap, ampicilina; Km, kanamicina; *ermE*, *tsr* y *hyg*: genes de resistencia a eritromicina, tioestreptona e higromicina B
 (a) Pérez-Zúñiga F.J., et al., 2004, J. Antibiot. (Tokyo) 57:197-204
 (b) Seco E.M. et al., 2004, Chem. Biol. 11:357-366
 (c) Yanisch-Perron C., et al., 1985, Gene 33:103-119
 (d) Kieser T., et al., 2000, Practical Streptomyces Genetics, Norwich
 (e) Lydiate D.J., et al., 1985, Gene 35:223-235
 (f) Ruiz-Arribas A., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63:2983-2988

Procedimientos genéticos

Las cepas de *E. coli* se crecieron y transformaron tal como se describe en Maniatis *et al.* (1982). Las cepas de *Streptomyces* se manipularon tal como se ha descrito previamente (Kieser T., *et al.*, 2000, citado *supra*). La conjugación intraespecífica se llevó a cabo creciendo conjuntamente las cepas donadoras y receptoras en un medio sólido R5 sin selección y posteriormente seleccionando en base a las correspondientes resistencias a antibióticos de los plásmidos y a los marcadores genéticos. La manipulación del ADN se realizó tal como se ha descrito previamente (Maniatis T., *et al.*, 1982, citado *supra*).

Ensayos para la producción de tetraenos

La producción de tetraenos se analizó extrayendo la totalidad de una alícuota del cultivo con metanol tal como se ha descrito previamente (Seco E.M. *et al.*, 2004, citado *supra*). Los extractos se filtraron y se sometieron a análisis de HPLC con un equipo Waters 600S Controller, equipado con Waters 996 PDA; la determinación cuantitativa y las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las descritas previamente (Pérez-Zúñiga F.J., *et al.*, 2004, citado *supra*).

Ensayos de HPLC-MS

Los espectros de masas se determinaron en un equipo 1100MSD HPLC conectado a un detector cuadrupolo Agilent Technology Detector, usando electrospray como fuente y un modo de ionización positiva. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las descritas previamente (Pérez-Zúñiga F.J., *et al.*, 2004, citado *supra*).

Purificación de los nuevos compuestos

Streptomyces diastaticus var. 108/784, o microorganismos eventualmente modificados con construcciones capaces de producir los polienos amidados (tal como se ha indicado anteriormente) se cultivó o cultivaron bien en medio SYM2, sólido o líquido (Pérez-Zúñiga F.J., *et al.*, 2004, citado *supra*). Transcurridos seis días, el medio sólido completo donde se cultivaron los microorganismos, se fragmentó por cizalla haciéndolo pasar por una jeringuilla de 50 mL; el medio sólido así fragmentado se extrajo con cuatro volúmenes de metanol, previamente acidificado con ácido fórmico 25 mM. Los cultivos procedentes de medio líquido fueron liofilizados antes de realizar extracciones similares con metanol. La suspensión acuosa se agitó durante 1 hora y se centrifugó a 5.000 g durante 20 minutos para eliminar las partículas sólidas en suspensión. El sobrenadante transparente se concentró mediante roto-evaporación a 10-20 X 10⁶ unidades por microlitro (μL) medidas a una longitud de onda de 304 nanómetros (nm). La muestra fue posteriormente almacenada en 80% metanol/agua hasta su empleo. Doscientos mililitros del cultivo líquido celular o una placa (24 x 24 cm) cuyo cultivo fue previamente extraído con 5 volúmenes de metanol, dieron lugar a una producción de hasta 40 mg de la mezcla de tetraenos amidados. Las muestras extraídas en metanol se llevaron a 20% de metanol con agua y se filtraron para eliminar el material precipitado. El filtrado se aplicó lentamente a una columna Omnifit (250 x 25 mm, Supelco Cat No. 56010) previamente rellena con una resina de intercambio iónico, tal como SP-Sepharose, Phast Flow (Pharmacia) que previamente se equilibró con la misma disolución. Bajo estas condiciones, la rimocidina y el compuesto CE-108 eluyeron con el frente no unido al relleno de la columna, al igual que pigmentos procedentes del cultivo; los correspondientes polienos amidados rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib) quedaron completamente retenidos. La columna, conteniendo los compuestos de interés retenidos en la fase sólida, se lavó exhaustivamente con la misma solución para eliminar aquellos compuestos que no interaccionan con el relleno de SP Sepharosa. Los polienos amidados rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib), retenidos por interacción en la columna, se eluyeron con acetato amónico 300 mM pH 5 en 20% de metanol recogiendo fracciones a intervalos de tiempo regulares. De las fracciones eluidas se seleccionaron aquellas que contenían las mezclas de las amidas de interés; éstas se juntaron en y se sometieron a un proceso físico de desalinización, empleando para ello cartuchos Sep-Pak (Waters). Finalmente las fracciones desalinizadas se disolvieron en 20% de metanol. La fracción conteniendo la mezcla de polienos amidados (15 mg)

que habían sido desaladas, se fraccionaron finalmente por HPLC (con el fin de separar los polienos amidados); para ello se empleó una columna semi-preparativa (Supelcosil PLC-8, 250 x 21,2 mm). Los parámetros cromatográficos y las fases móviles, controlados con un controlador de gradiente automático (Waters Automated Gradient Controller), fueron: 12 minutos con 100% de B (acetato amónico 20 mM pH 5, etanol 20%), 43 minutos de un gradiente binario hasta 50% de A (metanol) y 50% de B (curva 6 especificada en los controladores cromatográficos de Waters); 35 minutos de un gradiente binario hasta 100% de A (curva 8, de los mismos controladores señalados anteriormente), y un flujo constante de 5 mL/min. Las fracciones se recogieron a intervalos regulares (5 mL por fracción) y aquéllas que llevaban los compuestos aislados purificados se juntaron y se sometieron a una etapa de desalinización adicional, como la descrita anteriormente y, finalmente, se liofilizaron dos veces.

Ensayos de actividad hemolítica

Los ensayos se llevaron a cabo según el método descrito por Gómez-Gómez *et al.* (Gómez-Gómez J.M. *et al.*, 1996, Mol. Microbiol. 19:909-910). Las muestras de polienos se desecaron previamente y se disolvieron en DMSO a una concentración estimada de 10 a 30 mg/mL. Cantidades crecientes de los diferentes polienos se llevaron a un volumen final de 100 μ L de DMSO y se mezclaron mediante agitación suave con 500 μ L de tampón PBS (Gómez-Gómez J.M. *et al.*, 1996, citado *supra*) conteniendo 2,5% de sangre humana o, eventualmente, de caballo. Tras la incubación a 37°C durante 30 minutos sin agitación, las células se sedimentaron mediante centrifugación y el grado de hemólisis se evaluó mediante la medida de la absorbancia a 545 nm. Los valores correspondientes a la hemólisis total se estimaron con una suspensión de un 2,5% de sangre de caballo en agua destilada. La sangre humana (fundamentalmente eritrocitos) se obtuvo de Bancos de sangre local (Hospital Ramón y Cajal (Madrid)); la sangre de caballo procedía de Oxoid (sangre defibrinada). La anfotericina B y la nistatina A se obtuvieron de Sigma (números de catálogo A-4888 y N-3503, respectivamente); y, la pimelicina, de Calbiochem (527962). Todos estos polienos se ensayaron directamente de las muestras comerciales, sin purificación adicional.

II. Resultados

Generación del gen *rimA* recombinante

El gen *rimA* (Seco E.M. *et al.*, 2004, Chem. Biol. 11:357-366), codificado dentro de un ARNm policistrónico, fue clonado bajo el control del promotor *xysA* (*xysAp*) del gen de la xilanas de *Streptomyces halstedii* JM8 (Ruiz-Arribas A., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63:2983-2988). Para ello, el promotor *xysAp* fue rescatado a partir de pHis1 como un fragmento *Bgl*II/*Sma*I de 547 pares de bases que, además, lleva el terminador del gen de resistencia a metilenomicina (Ti: Adham S.A. *et al.*, 2001, Arch. Microbiol. 177:91-97) situado en posición anterior al promotor *xysAp*. Siguiendo los procedimientos habituales de clonaje de ADN y de acuerdo con las propiedades de los plásmidos empleados en la invención descritas en la Tabla I, el fragmento de ADN que contenía el gen *rimA* y el extremo 3' del gen *rimI* (posiciones 9336 a 15445 pares de bases a partir de la secuencia depositada en GenBank bajo el número de acceso AY442225, tal como se indica en la Figura 1; Seco E.M. *et al.*, 2004, citado *supra*) se fusionó con *xysAp* en la orientación adecuada que permitía expresar el *rimA* bajo el promotor *xysAp* (recombinante *rimA*). Finalmente el gen *ermE* de pNAe-1 (Tabla 1) se rescató por digestión con las enzimas flanqueantes y el fragmento de ADN resultante se clonó, en etapas intermedias, a continuación del gen "recombinante *rimA*" para generar, en la construcción final, un fragmento de ADN conteniendo (ver Figura 1A), de izquierda a derecha: el gen *rimA* bajo el control del promotor *xysAp*, el fragmento del gen *rimI* truncado y finalmente el gen *ermE* completo. El fragmento de ADN resultante se clonó, vía extremos romos, según la técnica habitual en Biología Molecular, en el sitio de restricción único *EcoRV*, localizado dentro del gen de resistencia a tioestreptona, del vector de *Streptomyces* pIJ922. El plásmido resultante (pSM743B, Figura 1A) confiere resistencia a eritromicina pero no a tioestreptona al tener el correspondiente gen de resistencia a tioestreptona interrumpido por inserción del fragmento de ADN descrito anteriormente.

La correcta funcionalidad del gen *rimA* recombinante, clonado en pSM743B, tal como se indica más arriba, se comprobó por introducción del plásmido pSM743B en un mutante de *Streptomyces diastaticus* var. 108 generado previamente por disrupción del gen nativo *rimA* (*Streptomyces diastaticus* var. 108/PM1-500, descrito en Seco E.M. *et al.*, 2004, citado *supra*). El recombinante genético resultante (generado por introducción del plásmido pSM743B en el mutante de *Streptomyces diastaticus* var. 108 con el gen *rimA* previamente interrumpido) es capaz de producir los macrólidos poliénicos nativos (rimocidina y CE-108), así como los nuevos macrólidos amidados (rimocidina B y CE-108B). Asimismo, el plásmido pSM743B introducido en la cepa silvestre indujo también la producción de los cuatro tetraenos (amidados y carboxilados) pero con un incremento en la producción total de polienos probablemente debida a la expresión de genes biosintéticos del cluster *rim*. Paralelamente se construyó el plásmido pSM784. Para ello el gen *ermE* se clonó, siguiendo la tecnología habitual en Biología Molecular y, en sucesivas etapas, en vectores adecuados de *Escherichia coli* como para obtener el gen *ermE* completo susceptible de ser rescatado como un fragmento de ADN de extremos romos. Finalmente el fragmento de ADN conteniendo el gen *ermE* en un fragmento de ADN con extremos romos, se clonó en el sitio único de restricción *EcoRV* del vector pIJ941. El vector resultante confiere resistencia a eritromicina e higromicina B aunque es sensible a tioestreptona al tener interrumpido el gen de resistencia a éste por la inserción inactivante del fragmento del gen *ermE* (ver Figura 1B). Cuando el plásmido pSM784 es introducido en la cepa silvestre *Streptomyces diastaticus* var. 108, el microorganismo recombinante resultante es capaz de producir, además de los macrólidos rimocidina y CE-108, los nuevos polienos amidados CE-108B y rimocidina B.

Por tanto, los modificados genéticos de *Streptomyces diastaticus* var. 108 conteniendo el vector pSM743B o el vector pSM784 producen tanto los polienos originales (rimocidina B y CE-108) como los nuevos polienos amidados (CE-108 y rimocidina B), con un perfil cromatográfico, analizado en HPLC, semejante, tal como se indica en la Figura 1C. Pese a que cualitativamente ambos recombinantes genéticos producen los mismos polienos, la producción de ellos es significativamente mayor en aquellos recombinantes que contienen el gen *rimA* y el gen de eritromicina (plásmido pSM743B).

La producción de ambos tetraenos (rimocidina y CE-108) se restauró en el mutante *Streptomyces diastaticus* var. 108 con el gen *rimA* interrumpido, al introducir el plásmido pSM743B, indicando que el gen *rimA* recombinante es funcional. Sin embargo, la producción de polienos fue significativamente más baja en este mutante complementado que en la cepa sivestre portando el mismo plásmido pSM743B (Tabla 1); esta producción más baja no se alteró significativamente cuando se añadieron al medio tanto glucosa como xilano. Estos resultados parecen sugerir que la expresión de *rimA* sería una etapa limitante en la producción de los polienos; esta etapa limitante está claramente superada por el incremento de la dosis génica.

Estos resultados indican claramente que el gen *ermE* en el vector derivado de SCP2* juega un papel fundamental para generar los nuevos polienos. Se ha de destacar que, ni el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*), donado en otros vectores tales como pHJL401 (Larson J.L. *et al.*, (1986) Plasmid 15:199-209), ni un vector derivado del SCP2*, independientemente, son suficientes para producir las nuevas estructuras.

Caracterización de los nuevos polienos

Análisis HPLC-MS

Se llevaron a cabo análisis por HPLC combinado con espectrometría de masas del caldo de fermentación de *S. diastaticus* var. 108/743B y *S. diastaticus* var. 108::PM1-500/743B; las masas deducidas para los 2 nuevos tetraenos fueron 738 y 766 para los tiempos de retención más bajos y más altos, respectivamente. En ambos casos, las masas de los nuevos polienos son una unidad más baja que la de los polienos con el tiempo de retención más cercano, CE-108 (739) y rimocidina (767). Tanto la diferencia de masas como la movilidad cromatográfica apoyaban la idea de que los nuevos polienos derivaban de los macrólidos naturales.

Elucidación de la estructura química

Con el objetivo de elucidar la estructura química, se caracterizaron preliminarmente los dos nuevos polienos con el fin de desarrollar un procedimiento para su purificación. Ambos compuestos interaccionan no sólo con sílica gel en fase reversa como C8 y C18 sino también con una resina de intercambio fónico tal como SP-Sepharaosa, sugiriendo que estos compuestos tenían una carga positiva accesible. Esta primera caracterización permitió diseñar un procedimiento de purificación sencillo a partir del caldo de fermentación de *Streptomyces diastaticus* var. 108/pSM743B o *Streptomyces diastaticus* var. 108/784 indistintamente (véase el apartado relativo a los Procedimientos Experimentales).

El compuesto CE-108B (Ib) se obtuvo como un polvo con un espectro UV/visible típico de tetraenos ($\lambda_{\max} = 317, 302, 289 \text{ nm}$), similar al de CE-108 (IIb) (Pérez-Zúñiga F.J. *et al.*, 2004, J. Antibiot. (Tokio) 57:197-204). El espectro de ^1H -RMN con tres señales en el rango de sp^2 a $\delta 6,25$ (dd, 14,9, 10,9 Hz), un multiplete a $\delta 6,00$ -6,15 y un doblete de doblete a $\delta 5,87$ (15,2, 8,4 Hz) era similar al de CE-108. Dos protones intercambiables aparecieron en a $\delta 7,30$ y 6,83 como singletes anchos. En el rango alifático de $\delta 1,40$ -2,50, el espectro mostraba un patrón multiplete complejo, y las señales de tres tripletes de metilos y dobletes, respectivamente, aparecieron en $\delta 1,17$, 1,15, y 0,83. El espectro de masas (+)-ESI MS puso de manifiesto la existencia de iones pseudo-moleculares a m/z 739 ([M+H]⁺) y 761 ([M+Na]⁺), que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{13}$ mediante alta resolución (encontrado 739,40110, calculado 739,401715 para [M+H]⁺). El espectro de resonancia magnética ^{13}C -RMN indicó 37 señales de carbono como en CE-108, tal como exige la fórmula molecular. Los datos de ^{13}C -RMN de CE-108 y CE-108B estaban próximamente relacionados (Tabla 2) y permitieron concluir que CE-108 y CE-108B poseían el mismo esqueleto de carbono incluyendo el amino-azúcar. Según estos datos, el segundo nitrógeno debe ser atribuido a una función amida, que identifica a CE-108B (Ib) como la amida de CE-108 (IIb).

El polvo de rimocidina B (Ia) se disolvió en DMSO. El espectro de masas (+)-ESI MS fijó el peso molecular de rimocidina B (Ia) como 766, que corresponde, mediante alta resolución, a la fórmula molecular $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{13}$ (encontrado 767,43254, calculado 767,43301 para [M+N]⁺). El espectro de ^1H -RMN fue similar al de CE-108B (Ib) y mostró dos protones intercambiables H/D en $\delta 7,30$ y 6,83, dos dobletes de doblete y un multiplete en el intervalo de $\delta 6,40$ -5,80. La región alifática era muy compleja debido a la menor resolución, pero se identificaron fácilmente un triplete y un doblete en $\delta 1,83$ y 1,16 atribuidos a señales metilo. El espectro de ^{13}C -RMN indicó la presencia de 39 señales de carbono. La comparación con el de CE-108B (Ib) reveló la presencia de tres señales carbonilo en 208,8, 174,1 y 172,1, además de señales sp^2 de 8 átomos de carbono en el intervalo 136,7-128,3 y de dos grupos acetal. La similitud estrecha con CE-108B (Ib) identificó este compuesto finalmente como la amida de rimocidina, identificada en esta descripción como rimocidina B (Ia).

TABLA 2

Desplazamientos químicos del espectro ^{13}C -RMN de rimocidina B (Ia), CE-108 (IIb) y CE-108B (Ib) en $\text{DMSO}-d_6$

	Número de carbono	IIb	Ib	Ia	Número de carbono	IIb	Ib	Ia
5	1	173,4	173,3	172,1	17	78,2	78,2	74,2
10	2	56,3	57,4	56,0	18	136,0	137,4	136,7
	1"	22,4	23,4	22,6	19	133,6	134,6	133,1
15	2"	10,9	12,0	11,7	20	129,3	130,0	128,3
	3	68,5	69,7	68,3 ^a	21	133,4	133,6	132,8
20	4	48,8	49,6	48,3	22	132,3	134,4	131,3
	5	210,6	211,5	208,8	23	132,3	133,2	131,5
	6	44,3	45,2	43,5	24	132,6	134,4	131,8
25	7	19,6	20,6	21,8	25	131,1	132,2	130,8
	8	37,6	38,6	37,6	26	40,0	41,0	37,4
30	9	68,4	69,5	67,5	27	70,8	71,8	72,4
	10	46,5	47,1	44,7	28	20,0	21,0	37,1 ^a
35	11	97,8	98,8	96,9	29	-	-	17,7
	12	44,1	45,1	45,3 ^a	30	-	-	13,7
40	13	69,9	69,9	69,6	1'	98,2	99,0	97,1
	14	60,5	58,6	56,7	2'	68,0	69,4	64,7
	14- COOH	179,3	-	-	3'	56,1	57,4	56,5
45	14-CONH ₂	-	177,7	174,1	4'	69,5	71,2	72,9
	15	66,6	66,8	65,3	5'	73,5	74,6	73,0
50	16	38,7	39,0	36,4	6'	16,7	17,8	17,9

^a valor esperado según Sowinski et al., 1995, J. Antibiot. (Tokyo) 48:1288-1291; en la medición efectuada por los inventores, la señal estaba ausente

Actividades biológicas de los nuevos compuestos

Ensayos de actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los nuevos tetraenos amidados [rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib)] se ensayó frente a varios hongos: *Penicillium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Candida krusei* y *Cryptococcus neoformans*. Cantidades crecientes de los diferentes tetraenos, disueltos en metanol, se aplicaron sobre discos de papel (9 mm de diámetro); después de la aplicación, los discos se secaron y se colocaron sobre las placas de bioensayo en las que previamente se había extendido los correspondientes hongos testigos. La actividad de estos tetraenos amidados se comparó con la de las moléculas de las que proceden [rimocidina (IIa) y CE-108 (IIb)], mostrando que la actividad biológica de los polienos amidados fue sustancialmente mayor que la de los correspondientes tetraenos de los que proceden (Figura 2) en todos los hongos ensayados. En todos los casos, la sustitución del grupo carboxilo libre por el grupo amida incrementó la actividad antifúngica aproximadamente cuatro veces.

Ensayos de toxicidad

En los experimentos anteriores es claro que la modificación de los nuevos polienos amidados, producidos por los recombinantes genéticos de *Streptomyces diastaticus* var. 108, daba lugar a compuestos con alta actividad antifúngica. Con el objetivo de determinar si la toxicidad también estaba incrementada, se llevaron a cabo determinaciones de la actividad hemolítica de los nuevos compuestos polienos amidados, en comparación con los compuestos que la cepa silvestre produce. Se utilizaron eritrocitos humanos como modelos celulares para este estudio (Cybulska B. *et al.*, 2000, Acta Biochim. Pol. 47:121-131; Gómez-Gómez J.M. *et al.*, 1996, Mol. Microbiol. 19:909-910). La actividad hemolítica de los nuevos compuestos se evaluó (véase el apartado relativo a los Procedimientos Experimentales) frente a rimocidina y CE-108; también se incluyeron anfotericina B y nistatina A. Como se muestra en la Tabla 3, la actividad hemolítica de los tetraenos amidados [rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib)] no fue significativamente diferente de la de los correspondientes tetraenos de los que procedían, mientras que su actividad antifúngica era claramente mayor. Merece la pena destacar las diferencias en toxicidad observadas entre CE-108 (IIb) y CE-108 B (Ib) con rimocidina (IIa) y rimocidina B (Ib); mientras que se alcanza el 50% de la hemólisis con 40 a 60 nanomoles de los dos últimos polienos, se necesita una concentración de CE-108 y su amida de 6 a 7 veces mayor para alcanzar el mismo grado de hemólisis. Por tanto, las propiedades farmacológicas del polieno amidado CE-108B están significativamente mejoradas: mientras que CE-108 muestra una baja actividad antifúngica, su correspondiente derivado amidado (CE-108B), tiene una actividad antifúngica incrementada a niveles casi tan altos como los de la rimocidina, en tanto que su actividad hemolítica que es de 6 a 7 veces menor. Estos ensayos también se llevaron a cabo con sangre de caballo mostrando resultados similares (datos no mostrados).

TABLA 3

Actividad hemolítica comparativa de varios polienos. Los valores probados para cada polieno se dan en nanomoles (columna de la izquierda) y las correspondientes actividades hemolíticas como porcentaje total de hemólisis (ver Procedimientos Experimentales)

	Anfotericina B	Nistatina A	Rimocidina (IIa)	Rimocidina B (Ia)	CE-108 (IIb)	CE-108B (Ib)
1	1,97					
2	4,47					
3	82,26					
4	100					
20		2,20	10,00	10,00		
40		49,53	21,18	33,51		
60		76,80	65,02	84,80		
80		92,79	95,59	94,80		
100		100,00	100,00	100,00		
120					11,72	12,01
160					14,48	15,86
200					16,60	23,29
240					26,89	30,22
280					32,47	34,86
320					44,25	40,39
360					63,56	61,34
400					82,12	88,26
440					100,00	100,00

III. *Discusión*

Se describe la biosíntesis de dos nuevos polienos amidados con cambios en el grupo carboxílico producidos mediante manipulación genética de un organismo natural productor de dos polienos mayoritarios no amidados: rimocidina y CE-108.

Streptomyces diastaticus var. 108, un productor de dos tetraenos naturales (rimocidina y CE-108), adquiere la capacidad de producir, de forma natural y como principales compuestos, las correspondientes amidas (rimocidina B y CE-108B) si es modificado adecuadamente mediante manipulación genética. Al igual que otros derivados poliénicos semi-sintéticos, la conversión del grupo carboxílico libre en un grupo amida conlleva una mejora clara en alguna de sus propiedades farmacológicas (aumento sustancial de actividad antifúngica pero no en las actividades hemolíticas), proporcionando así una ventaja significativa, como agentes antifúngicos, frente a los tetraenos nativos. Esta modificación química en ambos derivados conlleva un aumento en la toxicidad selectiva para las membranas de organismos en cuya composición interviene el ergosterol. Los inventores han puesto de manifiesto que se obtiene un resultado similar con pimarcina y su derivado AB-400, que refuerza la idea de que la sustitución del grupo carboxílico en los polienos por un grupo amida aumentará también la toxicidad relativa de otros polienos.

Aunque el mecanismo preciso de la biosíntesis de estos nuevos polienos amidados permanece desconocido hasta el presente, pueden postularse, al menos, dos posibles mecanismos: (a) las amidas serían el resultado de una actividad amidotransferasa posterior al ensamblaje de la cadena policetónica de la aglicona (actividad de “adorno” o modificación post-PKS), la cual bajo las condiciones experimentales descritas en esta invención podría activarse, o (b) una actividad malonamil-CoA transferasa incorporaria, mediante el módulo 7 de condensación de la correspondiente PKS (Seco E.M. *et al.*, 2004, Chem. Biol. 11:357-366), malonamil-CoA en lugar de la metilmalonil-CoA como se propone en el modelo biosintético para la producción de CE-108 y rimocidina. En este último caso, se requeriría una de condensación no decarboxilante tipo Claysen, tal como sucede en las tiolasas biosintéticas (Heath & Rock, 2002, Nat. Prod. Rep. 19:581-596), para la incorporación de malonamida en la cadena policetónica; en este caso la disponibilidad *in vivo* de malonamida como unidad condensante sería crucial para una buena incorporación en la cadena policetónica creciente. Merece la pena destacar que la cepa productora también biosintetiza oxitetraciclina, cuya unidad postulada “de arranque” para la cadena policetónica es la malonamida; así pues este metabolito estaría, en esta cepa, fácilmente disponible para la producción de otros metabolitos secundarios, además de oxitetraciclina.

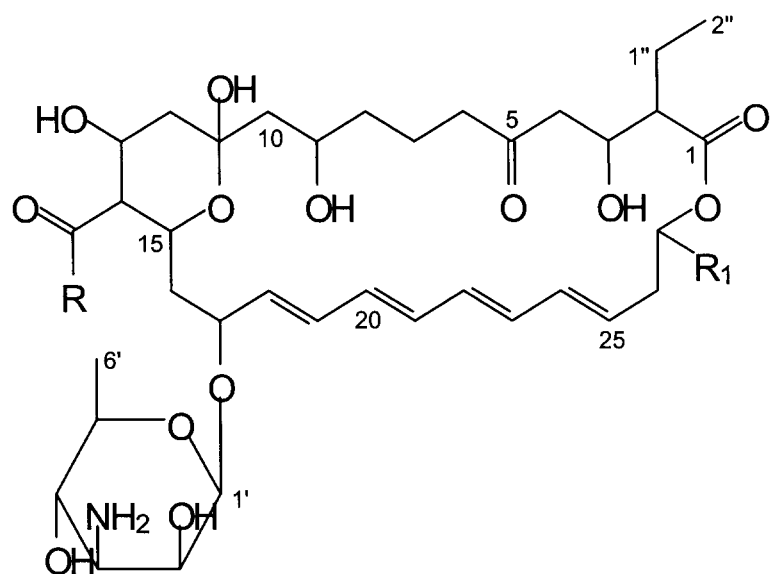
Aunque se desconoce el mecanismo genético que conduce a la producción de CE-108B y rimocidina B, parece claro que se requieren, al menos los plásmidos derivados de SCP2* (tales como pIJ922 o pIJ941) y el gen *ermE*. Recientemente se ha descrito que concentraciones sub-inhedoras de eritromicina pueden modular la transcripción bacteriana (Goh *et al.*, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 17025-17030). No obstante, la posibilidad de que la eritromicina pueda modular la expresión de un posible regulador transcripcional haciendo posible la etapa de amidación en un organismo productor de polieno puede descartarse ya que las amidas también se detectaron en cultivos en los que no se había adicionado eritromicina. Esto abre la posibilidad de que el producto del gen *ermE* (una metilasa) pueda actuar sobre otro gen intermedio, codificado dentro del ADN de los plásmidos derivados de SCP2* (pIJ922 ó pIJ941) cuyo resultado final sería la activación de un gen cromosómico responsable de la amidación de los polienos naturales de *Streptomyces diastaticus* var. 108 (rimocidina y CE-108). La presente invención proporciona un sistema para generar nuevos polienos amidados mediante biotransformación por una cepa modificada genéticamente. Este proceso, aplicado de forma satisfactoria a la ruta biosintética de polienos comerciales, sería indudablemente un proceso sencillo para la producción de compuestos farmacéuticos mejorados. Dada la complejidad de las estructuras poliénicas a que hace referencia esta invención, la biotransformación que se propone en esta invención para generar compuestos poliénicos amidados constituye un proceso indudablemente más eficiente que los descritos hasta el momento por síntesis orgánica para generar algunas estructuras semisintéticas.

Depósito de material biológico

Un cultivo del microorganismo *Streptomyces diastaticus* var. 108 conteniendo el plásmido pSM784, identificado en esta descripción como *Streptomyces diastaticus* var. 108/784, ha sido depositado en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania, el 14 de marzo de 2005, correspondiéndole el número de acceso DSM 17187.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



(I)

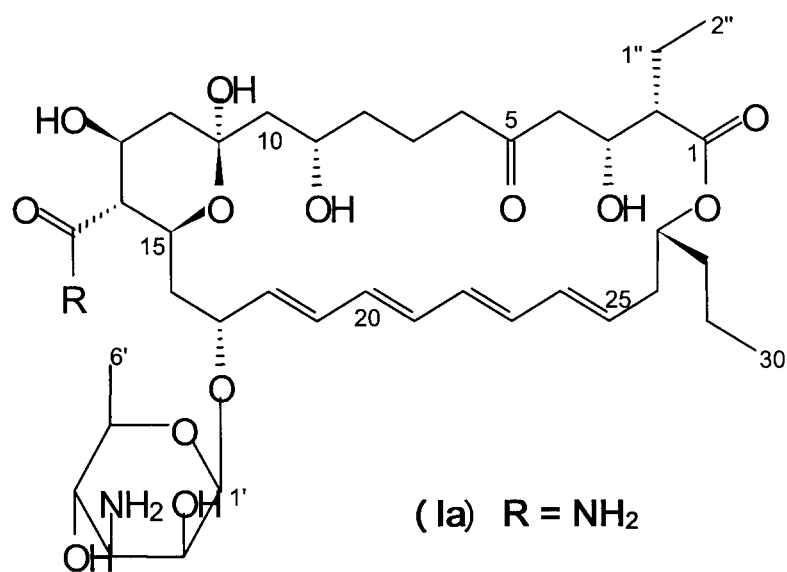
en donde

R es NH₂; y

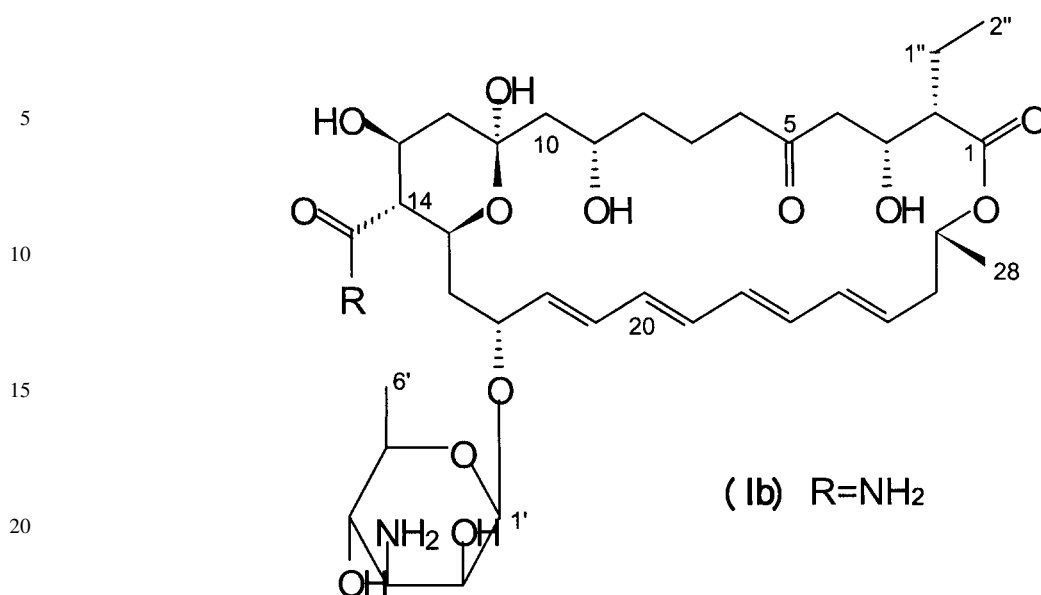
R₁ es alquilo C₁-C₃

sus isómeros, sales, profármacos o solvatos.

2. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado entre los compuestos identificados como rimocidina B (Ia) y CE-108B (Ib):



(Ia) R = NH₂



3. Una composición biocida que comprende un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, junto con un vehículo inerte.

4. Composición según la reivindicación 3, en la que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

6. Composición según la reivindicación 5, en la que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, que comprende, además, uno o más agentes terapéuticos.

8. Empleo de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en la elaboración de un medicamento o composición para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por organismos patógenos de humanos o animales, pertenecientes al siguiente grupo: hongos, microorganismos del género *Trypanosoma* y microorganismos del género *Leishmania*, comprendiendo todos ellos ergosterol en su membrana.

9. Empleo según la reivindicación 8, en la que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

10. Una composición antifúngica que comprende un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más vehículos inertes.

11. Composición según la reivindicación 10, en la que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11, que comprende, además, uno o más agentes antifúngicos.

13. Un método para controlar la infección causada por hongos fitopatógenos en una planta que comprende aplicar a dicha planta, o al medio que la rodea, una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

14. Un método para controlar la infección causada por hongos fitopatógenos en un fruto que comprende aplicar a dicho fruto una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

15. Un método para controlar la infección causada por un hongo capaz de desarrollarse en un preparado alimentario que comprende aplicar a dicho preparado alimentario una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

ES 2 323 253 B1

16. Vector identificado como pSM784 **caracterizado** porque se ha clonado en el sitio EcoRV del vector conocido pIJ941 el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*).

17. Vector identificado como pSM743B **caracterizado** porque se han clonado en el sitio EcoRV del vector conocido pIJ922 los genes *xysAP*, *rimA* y *ermE*.

18. Un microorganismo *Streptomyces diastaticus* var. 108/784 (número de depósito DSM 17187) útil para la producción del compuesto según fórmula (I) **caracterizado** porque se obtiene mediante la transformación de la cepa conocida *Streptomyces diastaticus* var. 108 con el vector pSM784 según la reivindicación 16.

19. Un microorganismo *Streptomyces diastaticus* var. 108/743B útil para la producción del compuesto según fórmula (I) **caracterizado** porque se obtiene mediante la transformación de la cepa conocida *Streptomyces diastaticus* var. 108 con el vector pSM743B según la reivindicación 17.

20. Un microorganismo *Streptomyces diastaticus* var. 108::PM1-500/743B útil para la producción del compuesto según fórmula (I) **caracterizado** porque se obtiene mediante la transformación de la cepa conocida *Streptomyces diastaticus* var. 108 mediante integración del fago PM1-500 y transformación con el vector pSM743B según la reivindicación 17.

21. Empleo de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a la 20 en la obtención de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1.

22. Empleo según la reivindicación 21, en el que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

23. Empleo según la reivindicación 21 en el que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre, rimocidina (IIa), CE-108 (IIb) y sus mezclas.

24. Caldo de fermentación de un microorganismo según las reivindicaciones 18 a la 20 que comprende un compuesto seleccionado entre un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, rimocidina (IIa), CE-108 (IIb) y sus mezclas.

25. Caldo de fermentación según la reivindicación 24, en el que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre rimocidina B (Ia), CE-108B (Ib) y sus mezclas.

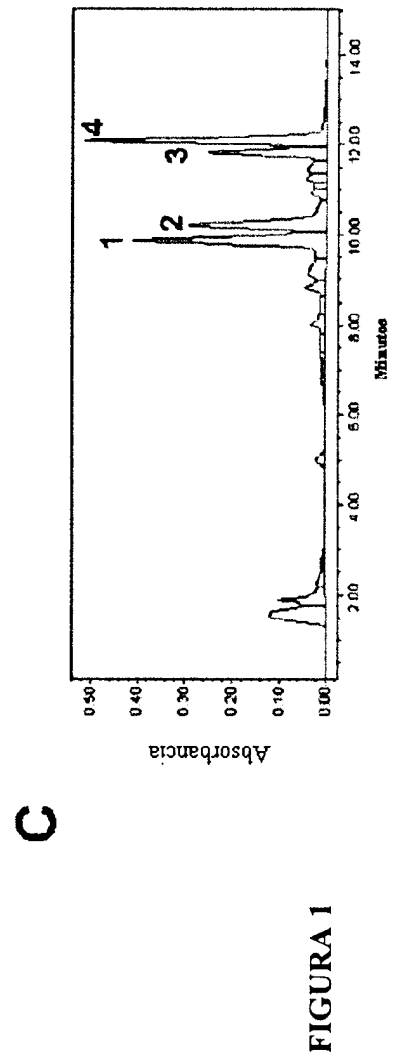
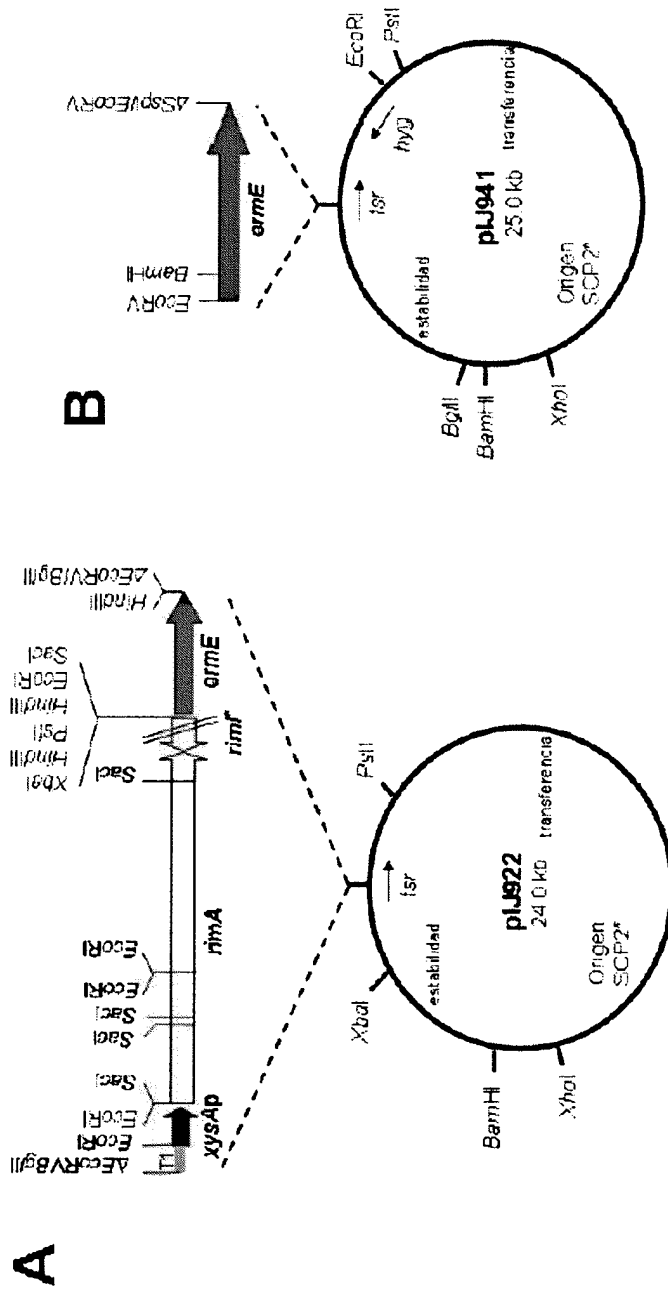


FIGURA 1

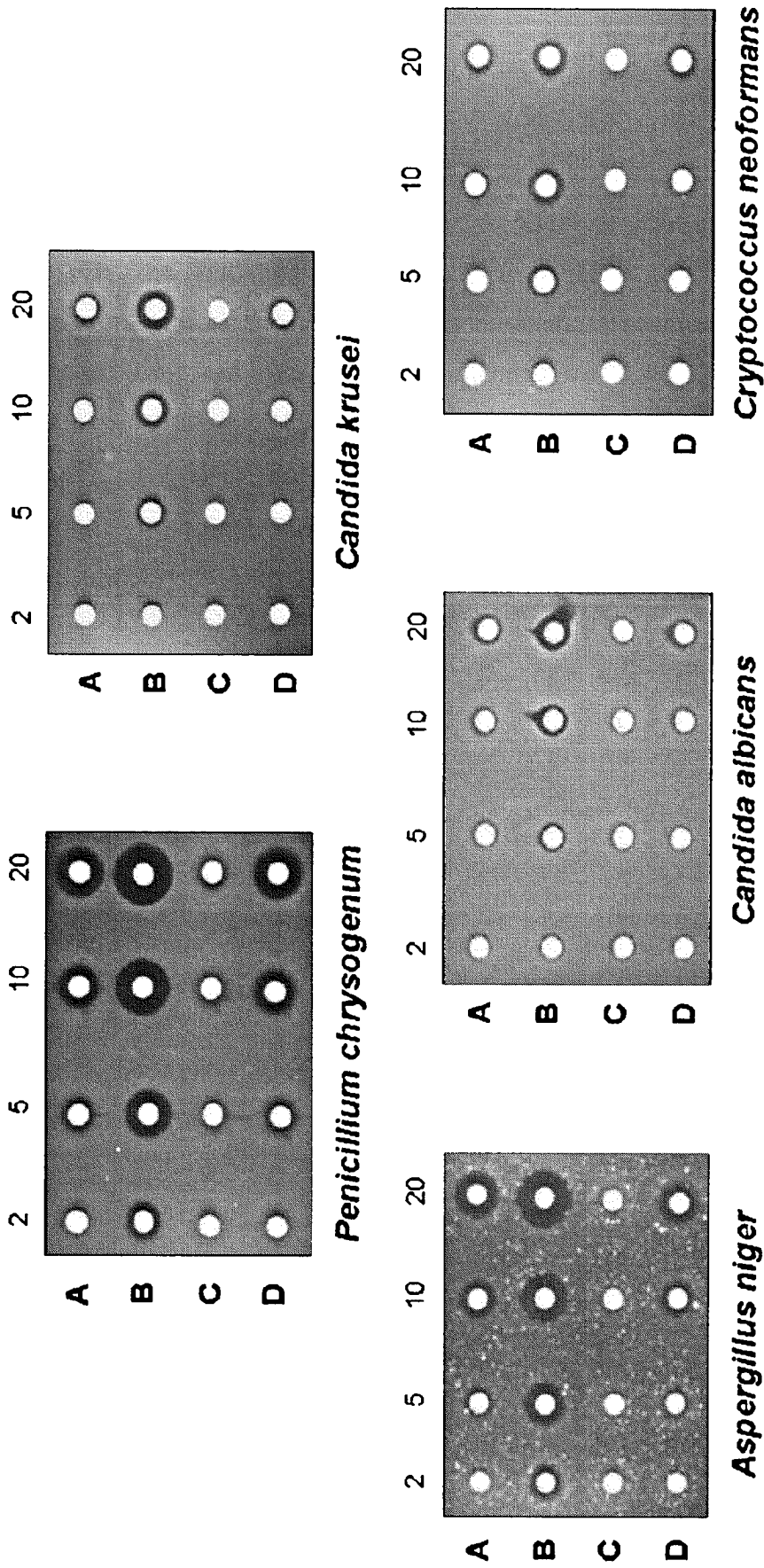


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 323 253

⑫ Nº de solicitud: 200500701

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 23.03.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PANDEY, R. C., RINEHART, K. L. Jr. Polyene antibiotics. VIII. The structure of rimocidin. The Journal of Antibiotics. 1977, Vol. 30, Nº 2, páginas 146-157. ISSN 0021-8820.	1,2
A	US 4783527 A (FALKOWSKI, L. S., JARZEBSKI, A.B., STEFANSKA, B. J. y otros) 08.11.1988, columna 1; columna 2, línea 65 - columna 3, línea 2.	1-15
A	US 4365058 A (FALKOWSKI, L. S., STEANSKA, B. J., TROKA, E. y otros) 21.12.1982, columnas 1,2.	1-15
A	SECO, E. M., PÉREZ-ZÚÑIGA, F. J., ROLÓN, M. S, MALPARTIDA, F. Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in Streptomyces diastaticus var. 108. Chemistry and Biology. Marzo 2004, Vol. 11, Nº 3, páginas 357-366. ISSN 1074-5521.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

25.06.2009

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H 17/08 (2006.01)

C12P 19/62 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)