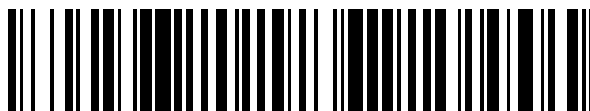


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 618**

51 Int. Cl.:

C07H 17/08 (2006.01)

A61K 31/7034 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2008** **E 08775793 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2176276**

54 Título: **Derivados de nistatina y su uso como agentes antifúngicos**

30 Prioridad:

03.07.2007 GB 0712881

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

17.11.2014

73 Titular/es:

**BIO SERGEN AS (100.0%)
S.P. Andersens Vei 5
7031 Trondheim, NO**

72 Inventor/es:

**ZOTCHEV, SERGEY, BORISOVICH;
BORGOS, SVEN, EVEN, FINN;
BRAUTASET, TRYGVE;
ELLINGSEN, TROND, ERLING;
OLSUFYEVA, EVGENIA, NIKOLAEVNA;
PREOBRAZHENS KAYA, MARIA, NIKOLAEVNA y
SLETTA, HAVARD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 522 618 T3

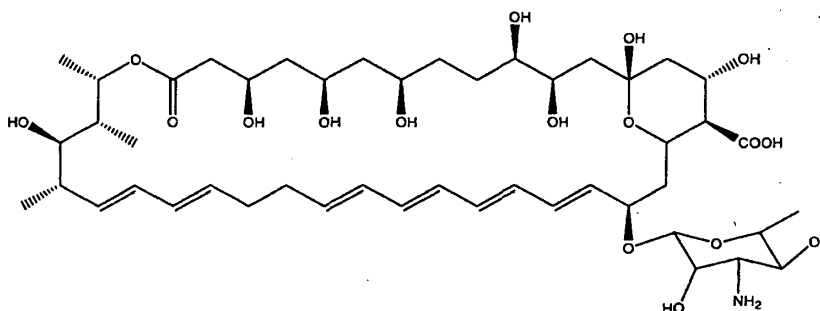
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Derivados de nistatina y su uso como agentes antifúngicos

La presente invención se refiere a nuevos derivados de nistatina y a procedimientos para la preparación de los mismos. La invención se refiere particularmente al uso de los nuevos derivados de nistatina en medicina, especialmente como agentes antifúngicos.

La nistatina es un complejo de origen natural de sustancias antifúngicas producido por ciertas cepas de la bacteria grampositiva *Streptomyces noursei*. El principal componente de la nistatina es nistatina A₁, que es un macrólido poliénico que tiene la estructura mostrada a continuación:



La nistatina es el agente activo presente en un número de preparaciones patentadas (por ejemplo Infestat, Nyspes, Nystamont, Nystan, Mycostatin y Nilstat) para uso en el tratamiento de candidiasis de la piel y membranas mucosas. Habitualmente se administra de forma oral o tópica incluso aunque sólo se absorbe pobremente desde el tubo digestivo o a través de la piel y las membranas. Esto es debido a que es tóxica cuando se administra parenteralmente.

La nistatina es una parte de una familia de antibióticos macrólidos poliénicos. Otros miembros de la familia incluyen pimamicina, rimocidina, candicidina, aureofacina, levorina y anfotericina. La anfotericina es el agente antifúngico usado más habitualmente, ya que se considera generalmente que es el más eficaz. Tiene actividad antifúngica de amplio espectro pero, al igual que la nistatina, tiene la importante desventaja de la toxicidad, lo que limita las vías de administración y las dosis que se pueden usar.

Los esfuerzos de investigación sobre antibióticos policétidos macrólicos se han centrado por lo tanto en anfotericina y, en particular, en la identificación de nuevos análogos de anfotericina con menor toxicidad. Se han adoptado generalmente dos enfoques distintos. En un primer enfoque, los investigadores han usado modificaciones químicas para tratar de reducir la toxicidad y/o para mejorar la actividad antifúngica de anfotericina. Puesto que la síntesis total de anfotericina no es económicamente factible, sin embargo, el material de partida es habitualmente anfotericina B obtenida a partir de cultivos de *Streptomyces nodosus*. Como resultado, las modificaciones químicas se han concentrado en la derivatización de los grupos funcionales presentes en el anillo de anfotericina B.

Mucho más recientemente, los investigadores han adoptado un enfoque diferente que se dirige a la ruta biosintética de anfotericina, que está compuesta de una línea de ensamblaje de diferentes enzimas. La cadena de carbono de anfotericina se ensambla a partir de unidades de acetato y propionato mediante policétido sintetas modulares (tipo 1), y el macrólido resultante se modifica subsiguientemente por otras enzimas que provocan oxidación, glucosilación e hidroxilación. Se han identificado los genes que codifican las enzimas implicadas en esta biosíntesis, y de este modo los investigadores han sido capaces de introducir cambios a la ruta biosintética natural, por ejemplo, eliminando, añadiendo o modificando un gen, y de ese modo eliminando, añadiendo o modificando una enzima implicada en la síntesis. El resultado neto son moléculas de anfotericina modificadas.

Por lo tanto, se ha obtenido y ensayado un gran número de moléculas de anfotericina modificadas, especialmente derivados modificados químicamente. A pesar de estos esfuerzos, sin embargo, se han identificado pocos candidatos farmacéuticos prometedores que tengan un balance apropiado de propiedades farmacológicas, principalmente actividad antifúngica elevada, baja toxicidad, y solubilidad en agua. Por tanto, todavía existe la necesidad de nuevos antibióticos para tratar enfermedades infecciosas, y en particular infecciones fúngicas sistémicas agudas que están creciendo en incidencia. Este requisito se hace cada vez más urgente a medida que se desarrolla resistencia a los agentes antifúngicos existentes.

En comparación con la anfotericina, se ha llevado a cabo muy poca investigación sobre la modificación de nistatina, presuntamente debido a que tiene una actividad menor que la anfotericina, aunque sufre de las mismas desventajas de toxicidad e insolubilidad en agua. Como resultado, no se ha considerado una molécula de partida atractiva para tal trabajo.

En un estudio reciente (Organic Letters, 2006, 8 (9), 1807-1809), se prepararon dos derivados de nistatina mediante alquilación reductora del grupo amino de micosamina. Se encontró que los derivados resultantes tienen mayor

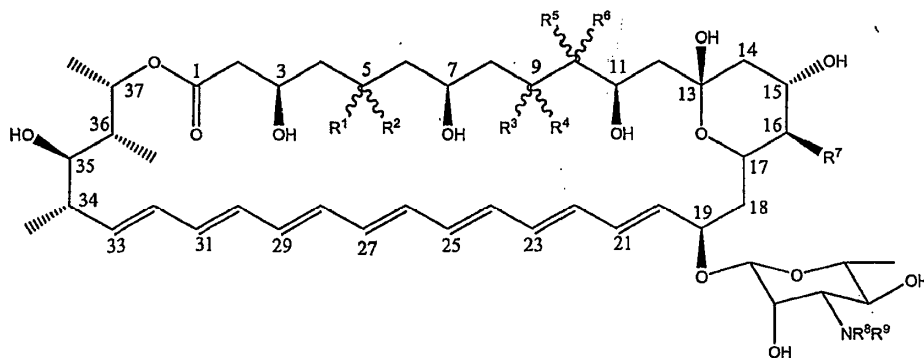
actividad antifúngica que la nistatina, pero fueron menos activos que los derivados de anfotericina B preparados de la misma manera. La modificación de anfotericina B se consideró por lo tanto más prometedora, y la toxicidad de estos derivados se ensayó y se demostró que es considerablemente menor en comparación con la molécula progenitora.

En el documento WO01/59126 se describe la clonación y secuenciación del agrupamiento génico que codifica la policétido sintasa y otras enzimas responsables de la síntesis de nistatina. El documento WO01/59126 también continúa sugiriendo una plétora de manipulaciones potenciales que se podrían llevar a cabo en teoría sobre el agrupamiento génico para producir estructuras de nistatina modificadas. Éstas incluyen modificaciones para eliminar o añadir enlaces dobles del fragmento poliénico de nistatina, modificaciones para eliminar o reponer el grupo carboxilo de C16, modificaciones para añadir otros grupos hidroxilo, y modificaciones para truncar el anillo de macrolactona.

Estará claro inmediatamente de lo anterior que se podrían preparar un gran número (aproximadamente 10^{17}) de estructuras de nistatina modificadas diferentes llevando a cabo una o más de las modificaciones sugeridas en el documento WO01/59126. La posibilidad de modificar entonces además cualesquiera de los compuestos producidos mediante manipulación genética con modificaciones químicas adicionales significa que son teóricamente posibles quintillones de compuestos. Puesto que se ha llevado a cabo tan poco trabajo sobre la nistatina, sin embargo, no hay datos para sugerir cuál de este vasto número de compuestos puede mostrar menor toxicidad en comparación con nistatina y/o anfotericina (es decir, esos agentes activos usados actualmente).

Sin embargo, ahora se ha encontrado sorprendentemente que ciertos derivados de nistatina tienen una toxicidad significativamente menor que anfotericina, y ventajosamente, también se ha encontrado que los mismos derivados muestran actividad antifúngica útil. A diferencia de la inmensa mayoría de compuestos de anfotericina modificados que se han preparado, los derivados de nistatina que se han identificado ahora son derivados de "segunda generación". En otras palabras, estos compuestos son derivados de un derivado de nistatina, y de este modo comprenden dos o más modificaciones con respecto a la estructura de nistatina A₁.

De este modo, visto desde un primer aspecto, la invención proporciona un compuesto que es un derivado de nistatina que tiene un doble enlace adicional presente entre C28 y C29 y que está modificado además con respecto a nistatina en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10 o en el grupo amino de micosamina, que tiene la fórmula I,



en la que,

R¹ y R² representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo, o juntos forman un grupo carbonilo (por ejemplo R¹ y R² representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, o juntos forman un grupo carbonilo;

R³ y R⁴ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo, o juntos forman un grupo carbonilo (por ejemplo, R³ y R⁴ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, o juntos forman un grupo carbonilo;

R⁵ y R⁶ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo (por ejemplo, un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo);

R⁷ representa un grupo alquilo o un grupo amida;

R⁸ y R⁹ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo alquilamino, un grupo de azúcar o un grupo acilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

por "grupo alquilo" se quiere decir un grupo de hidrocarburo saturado cíclico o acíclico, de cadena lineal o ramificado, que contiene hasta 20 átomos de carbono, que puede estar no sustituido o sustituido con un sustituyente seleccionado de los grupos hidroxilo, alcoxi, aciloxi y amino, y que puede estar interrumpido con uno o más grupos seleccionados de -arilo-, -O-, -NR¹²- y -S-, en el que R¹² representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₆;

por "grupo alcoxi" se quiere decir un grupo -OR¹³, en el que R¹³ es un grupo alquilo como se define aquí antes;

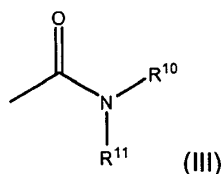
por "grupo aciloxi" se quiere decir un grupo -OCOR¹⁴, en el que R¹⁴ es un grupo alquilo como se define aquí antes;

por "grupo alquilamino" se quiere decir un grupo -(CH₂)_xNR¹⁶R¹⁷ en el que x es 1 a 10 y R¹⁶ y R¹⁷ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₆;

por "grupo de azúcar" se quiere decir un sacárido, preferiblemente un oligo- o monosacárido;

por "grupo acilo" se quiere decir un grupo -COR¹⁸ en el que R¹⁸ es un grupo alquilo como se define antes;

por "grupo amida" se quiere decir un grupo de fórmula (III):



en la que R¹⁰ y R¹¹ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido como se define aquí antes, o juntos forman un anillo alquilo.

Visto desde un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para obtener compuestos como se describen aquí anteriormente, que comprende:

(i) modificar un agrupamiento génico que codifica el sistema de poliketido sintasa responsable de la síntesis de nistatina, para producir un derivado de nistatina que tiene un doble enlace entre C28 y C29; y

(ii) modificar adicionalmente dicho agrupamiento génico para producir derivado de nistatina que está modificado en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina,

o

(iii) modificar el derivado resultante en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina mediante una reacción química.

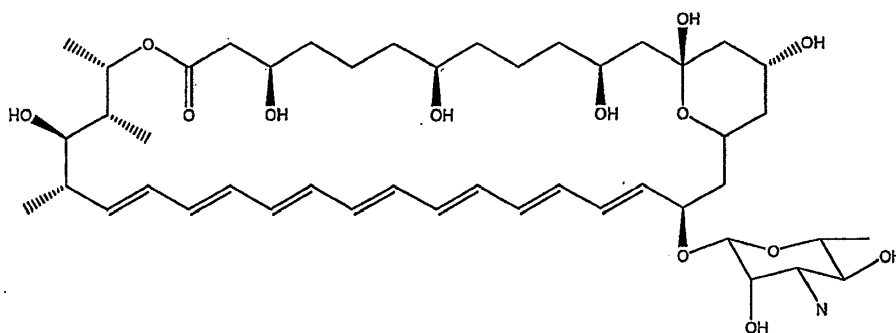
Visto desde todavía un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se describe aquí anteriormente y un vehículo, diluyente o excipiente.

Visto desde aún un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto como se describe aquí anteriormente para uso en terapia.

Un compuesto como se describe aquí para uso en el tratamiento de infecciones fúngicas forma un aspecto adicional de la invención.

También se describe un método de tratamiento de una infección fúngica en un animal (por ejemplo, ser humano), que comprende administrar a dicho animal un compuesto como se define aquí anteriormente.

Como se usa aquí, la expresión "derivado de nistatina" pretende englobar compuestos que tienen una estructura idéntica a nistatina A₁ distinta de las modificaciones específicas especificadas. De este modo, los derivados preferidos tienen el mismo anillo de macrolactona que la nistatina, con la excepción del doble enlace adicional en C28-C29, y tienen los mismos grupos funcionales que la nistatina, con la excepción de una modificación en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina. Por lo tanto, los derivados preferidos comprenden el esqueleto de anillo de macrolactona glucosilado mostrado más abajo:



Se apreciará que, en esta fórmula, puede haber modificaciones en C5, C9, C10, C16 y en el N de la micosamina. Lo que se muestra son por lo tanto sólo los átomos que deben de estar presentes. La figura muestra el esqueleto químico que puede estar presente.

- 5 Como se usa aquí, la expresión “sistema de policétido sintasa” representa la colección de enzimas que son responsables de la síntesis y modificaciones de policétidos. Esto incluye policétido sintasas, monooxigenasas, glucosiltransferasa y aminotransferasa.

La expresión “grupo alquilo” se usa aquí para representar un grupo de hidrocarburo saturado, cíclico o acíclico, de cadena lineal o ramificado. Tales grupos pueden contener hasta 20 átomos de carbono, pero se prefieren grupos que contienen 1 a 12 átomos de carbono, más preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono.

Los grupos alquilo pueden estar no sustituidos o sustituidos. Los sustituyentes que pueden estar presente en los grupos alquilo sustituidos son hidroxilo, alcoxi, aciloxi y amino.

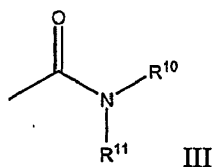
Los grupos alquilo pueden también estar interrumpidos con uno o más grupos seleccionados de -aril- (tal como Ph), -O-, -NR¹²- y -S-, en el que R¹² representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₆.

- 15 El término “alcoxi” se usa aquí para representar un grupo -OR¹³, en el que R¹³ es un grupo alquilo como se define aquí antes. En grupos alcoxi preferidos, R¹³ contiene 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente 1 a 4 átomos de carbono. Un grupo alcoxi preferido es -OC₁₋₆, por ejemplo -OCH₃.

El término “aciloxi” se usa aquí para representar un grupo -OCOR¹⁴, en el que R¹⁴ es un grupo alquilo como se define aquí antes. En grupos aciloxi preferidos, R¹⁴ contiene 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente 1 a 4 átomos de carbono. Un grupo aciloxi preferido es -OCOC₁₋₆, por ejemplo -OCOCH₃.

- 20

La expresión “grupo amida” se usa aquí para representar un grupo de fórmula III:



en la que R¹⁰ y R¹¹ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido como se define aquí antes, o juntos forman un anillo alquilo como se define aquí antes.

- 25 La expresión “grupo alquilamino” se usa aquí para representar un grupo -(CH₂)_xNR¹⁶R¹⁷ en el que x es 1 a 10, preferiblemente 2 a 6 (por ejemplo 3) y R¹⁶ y R¹⁷ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₆.

El término “azúcar” se usa aquí para representar sacáridos, especialmente oligo- y monosacáridos. Los azúcares presentes en los compuestos de la invención pueden comprender cualquier número de unidades de sacárido, pero los compuestos preferidos comprenden 1 a 10 unidades de sacárido, por ejemplo 1 ó 2 unidades de sacárido.

- 30

El término “acilo” se usa aquí para representar un grupo -COR¹⁸ en el que R¹⁸ es un grupo alquilo como se define aquí antes. En grupos acilo preferidos, R¹⁸ es un grupo alquilo sustituido, por ejemplo un grupo alquilo sustituido con amino. Grupos acilo particularmente preferidos son los grupos amino acilo.

- 35 Como se describe aquí anteriormente, los compuestos de la presente invención son derivados de nistatina que tienen un doble enlace adicional presente entre C28 y C29 y que además están modificados con respecto a la nistatina en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina.

Compuestos preferidos de la presente invención están modificados en C5 con respecto a nistatina. En nistatina, C5

está sustituido con un grupo hidroxilo y un átomo de hidrógeno, y es un estereocentro R. De este modo, en compuestos preferidos de la invención, C5 está sustituido con grupos distintos de un grupo hidroxilo y un átomo de hidrógeno, y/o C5 es un estereocentro S. En compuestos preferidos, diferentes grupos están presentes en C5, por ejemplo C5 puede estar sustituido con dos grupos hidroxilo o con dos átomos de hidrógeno. En compuestos particularmente preferidos, C5 está sustituido con un grupo carbonilo.

Los compuestos de la invención están modificados en C16 con respecto a nistatina. En nistatina, C16 está sustituido con un ácido carboxílico y un átomo de hidrógeno, y es un estereocentro R. Por tanto, en los compuestos de la invención, C16 está sustituido con grupos distintos de un grupo ácido carboxílico y un átomo de hidrógeno, y/o C16 es un estereocentro S. En compuestos preferidos, están presentes diferentes grupos, por ejemplo un grupo alquilo (por ejemplo metilo) y un átomo de hidrógeno, o un grupo amida y un átomo de hidrógeno. En compuestos particularmente preferidos, C16 está sustituido con un grupo metilo y un átomo de hidrógeno. En compuestos preferidos, C16 es un estereocentro R.

Compuestos preferidos adicionales de la invención están modificados en C9 con respecto a nistatina. En nistatina, C9 está sustituido con dos átomos de hidrógeno. Por tanto, en compuestos preferidos de la invención, C9 está sustituido con grupos distintos de dos átomos de hidrógeno. En compuestos preferidos, están presentes diferentes grupos, por ejemplo un grupo hidroxilo y un átomo de hidrógeno, o un grupo carbonilo.

Todavía otros compuestos preferidos de la invención están modificados en C10 con respecto a nistatina. En nistatina, C10 está sustituido con un grupo hidroxilo y un átomo de hidrógeno, y es un estereocentro R. Por tanto, en compuestos preferidos de la invención, C10 está sustituido con grupos distintos de un grupo hidroxilo y un átomo de hidrógeno, y/o C10 es un estereocentro S. En compuestos preferidos, están presentes diferentes grupos, por ejemplo dos átomos de hidrógeno.

Aún otros compuestos preferidos de la invención están modificados en el grupo amino de micosamina con respecto a nistatina. En nistatina, el grupo amino de micosamina no está sustituido, es decir, es -NH_2 . Por tanto, en compuestos preferidos de la invención, el grupo amino de micosamina está sustituido, por ejemplo con uno o más grupos alquilamino o azúcar.

Cuando los compuestos de la invención tienen un carbonilo en C5, se prefiere especialmente si también están presentes otras modificaciones del compuesto en C9, C10, o del N de la micosamina con respecto a nistatina. Por ejemplo, la amina de la micosamina se podría funcionalizar para que tuviese al menos un sustituyente R^8/R^9 que sea distinto de hidrógeno.

Mientras que los compuestos de la invención pueden contener sólo un cambio con respecto a materiales conocidos tales como S44HP, idealmente en cualquier compuesto de la invención comprenderá dos cambios en C5, C9, C10, C16 o del N de la micosamina con respecto a nistatina. Compuestos preferidos pueden comprender tres cambios en C5, C9, C10, C16 o del N de la micosamina con respecto a nistatina. Compuestos preferidos adicionales comprenderán al menos dos cambios en C5, C9, C10, C16 o del N de la micosamina con respecto a S44HP. Otros compuestos preferidos comprenderán al menos dos cambios en C5, C9, C10, C16 o del N de la micosamina con respecto a micoheptina. Compuestos preferidos adicionales comprenderán al menos dos cambios en C5, C9, C10, C16 o del N de la micosamina con respecto a candidina.

Compuestos especialmente preferidos comprenderán al menos dos cambios en C5, C9, C10, C16 o del N de la micosamina con respecto a todos de nistatina, S44HP, micoheptina y candidina.

En los compuestos de fórmula (I), R^1 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo. Aún más preferiblemente, R^1 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi (por ejemplo un grupo -OC_{1-6}), especialmente un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (por ejemplo un grupo hidroxilo). En compuestos preferidos, R^2 es un átomo de hidrógeno. En compuestos preferidos alternativos, R^1 y R^2 forman juntos un grupo carbonilo. Cuando C5 es un estereocentro, es preferiblemente un centro R.

Los compuestos preferidos de fórmula (I) son también aquellos en los que R^3 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo. Aún más preferiblemente, R^3 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi (por ejemplo un grupo -OC_{1-6}), especialmente un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (por ejemplo un átomo de hidrógeno). En compuestos preferidos, R^4 es un átomo de hidrógeno. En compuestos preferidos alternativos, R^3 y R^4 forman juntos un grupo carbonilo. Cuando C9 es un estereocentro, es preferiblemente un centro R.

Los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que R^5 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo. Aún más preferiblemente, R^5 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi (por ejemplo un grupo -OC_{1-6}), especialmente un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (por ejemplo un grupo hidroxilo). En compuestos preferidos, R^6 es un átomo de hidrógeno. Cuando C10 es un estereocentro, es preferiblemente un centro R.

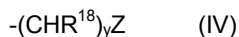
Los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que R^7 representa un grupo alquilo o un grupo amida.

Grupos alquilo preferidos son alquilo de C₁₋₆, por ejemplo metilo, etilo, propilo o butilo, especialmente metilo.

Los grupos amida son los de fórmula III como se define aquí antes.

- 5 Amidas particularmente preferidas son aquellas en las que R¹⁰ y R¹¹ representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₁₀ ramificado o C₁₋₁₀ no ramificado opcionalmente sustituido con hidroxilo, éster de ácido carboxílico o grupos amino, y opcionalmente interrumpidos con átomos de oxígeno o nitrógeno, o R¹⁰ y R¹¹ forman juntos un grupo alquilo de C₁₋₈ cíclico, opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo, aciloxi o amino, y opcionalmente interrumpido con átomos de oxígeno o nitrógeno.

En algunas amidas preferidas, R¹⁰ es hidrógeno. En otras amidas preferidas, R¹¹ es un grupo de fórmula IV:



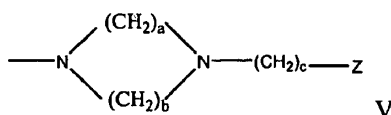
- 10 en la que R¹⁸ es hidrógeno o un grupo alquilo que contiene hasta 6 átomos de carbono (por ejemplo metilo o CH(CH₃)₂);

y es 1 a 6, preferiblemente 2-4, por ejemplo 3; y

Z es OH, NR¹⁹R²⁰ o COOR²¹, en los que R¹⁸, R¹⁹ y R²¹ son, cada uno independientemente, hidrógeno o alquilo de C₁₋₆ (por ejemplo metilo).

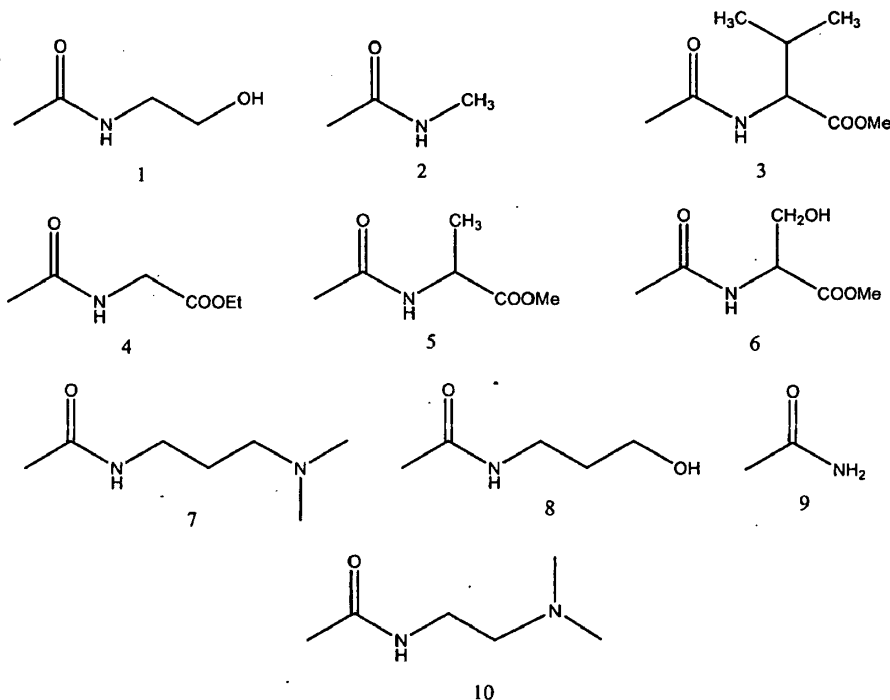
- 15 En amidas especialmente preferidas, R¹⁸ es hidrógeno.

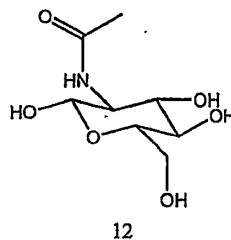
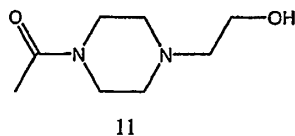
En otras amidas preferidas, R¹⁰ y R¹¹ forman juntos un grupo alquilo cíclico, preferiblemente un grupo alquilo cíclico de fórmula V



- 20 en la que a, b y c representan, cada uno independientemente, 1 a 6, preferiblemente 2-4, por ejemplo 2; y Z es como se define aquí antes en relación con la fórmula IV.

Ejemplos representativos de grupos amida particularmente preferidos de fórmula III son aquellos mostrados a continuación:





Los grupos amida 4, 6, 7, 8 y 10 son especialmente preferidos, especialmente los grupos amida 7 y 10.

Los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que R^8 representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilamino, un grupo de azúcar o un grupo acilo. En compuestos preferidos, R^9 es idéntico a R^8 , o es un átomo de hidrógeno, por ejemplo R^9 es un átomo de hidrógeno.

Grupos alquilamino preferidos son aquellos de fórmula $-(CH_2)_xNH_2$ en la que x es 2 a 6 (por ejemplo 3) o sus análogos alquilados $-(CH_2)_xN-(alquil\ C_{1-6})_2$, por ejemplo $-(CH_2)_xNMe_2$. Otro grupo preferido es un resto de lisina $COCH[(CH_2)_4NH_2]NH_2$.

Los grupos de azúcar preferidos comprenden 1 a 5 unidades de sacárido, más preferiblemente 2 ó 3 unidades de sacárido.

Cuando el grupo de azúcar es un monosacárido, puede estar presente como confórmero lineal, cíclico o mezcla de confórmeros lineales y cíclicos. Cuando el grupo de azúcar comprende más de una unidad de sacárido, cada monosacárido puede ser un confórmero cíclico, lineal o una mezcla de confórmeros lineales y cíclicos. Además, las unidades de sacárido presentes pueden ser iguales o diferentes.

En los compuestos de fórmula (I), los monosacáridos preferidos son pentosas y hexosas, por ejemplo glucosa, galactosa, glucopiranososa, manopiranososa, galactopiranososa, fructopiranososa y tagotopiranososa. Di- y oligosacáridos preferidos incluyen lactosa, melibiosa, sacarosa, maltosa y celobiosa. Se prefieren especialmente D-glucosa, D-galactosa y lactosa.

Grupos acilo preferidos adicionales (para R^8) incluyen $-(CH_2)Ph(CH_2)_xNH_2$ o $-(CH_2)Ph(CH_2)_xNMe_2$, en los que x es 0/1.

Los compuestos particularmente preferidos de la invención son aquellos de fórmula I en la que R^1 y R^2 forman juntos un grupo carbonilo. Más preferiblemente, cuando R^1 y R^2 forman un grupo carbonilo, R^3 , R^4 y R^6 son átomos de hidrógeno, y R^5 es un grupo hidroxilo. En dichos compuestos, preferiblemente al menos uno de R^8 y R^9 (por ejemplo tanto R^8 como R^9) son átomos de hidrógeno. De manera especial, preferiblemente C10 es un estereocentro R.

Otros compuestos particularmente preferidos de la invención son aquellos de fórmula I en la que R^7 es alquilo de C_{1-6} (por ejemplo metilo). Más preferiblemente, cuando R^7 es alquilo de C_{1-6} (por ejemplo metilo), al menos uno de R^8 y R^9 (por ejemplo tanto R^8 como R^9) son átomos de hidrógeno. En dichos compuestos, R^5 es preferiblemente un grupo hidroxilo y R^6 un átomo de hidrógeno. Aún más preferiblemente, R^3 y R^4 son átomos de hidrógeno. De manera especialmente preferible, C10 es un estereocentro R.

Compuestos aún más preferidos de la invención son aquellos de fórmula I en la que R^7 es un grupo amida de fórmula III. Más preferiblemente, cuando R^7 es un grupo amida, al menos uno de R^8 y R^9 (por ejemplo tanto R^8 como R^9) son átomos de hidrógeno. En dichos compuestos, R^5 es preferiblemente un grupo hidroxilo y R^6 un átomo de hidrógeno. Aún más preferiblemente, R^3 y R^4 son átomos de hidrógeno. De manera especialmente preferible, C10 es un estereocentro R.

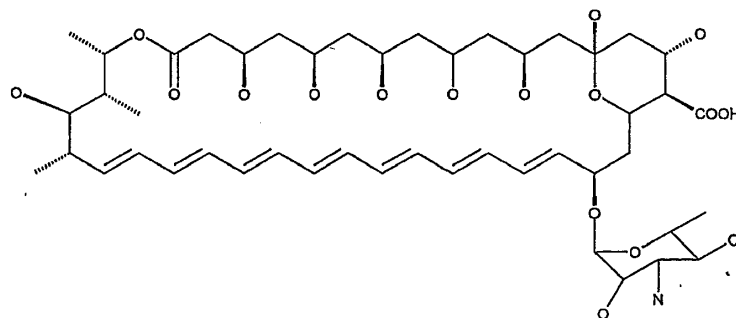
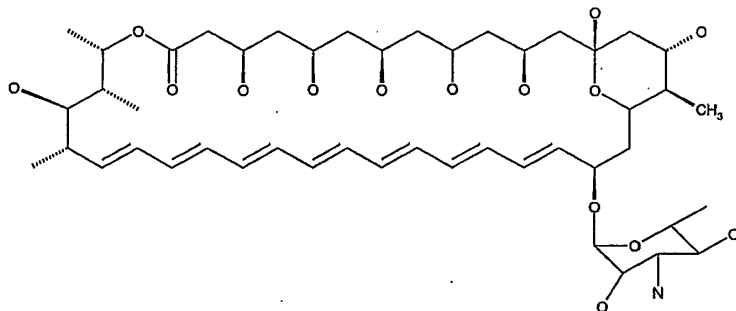
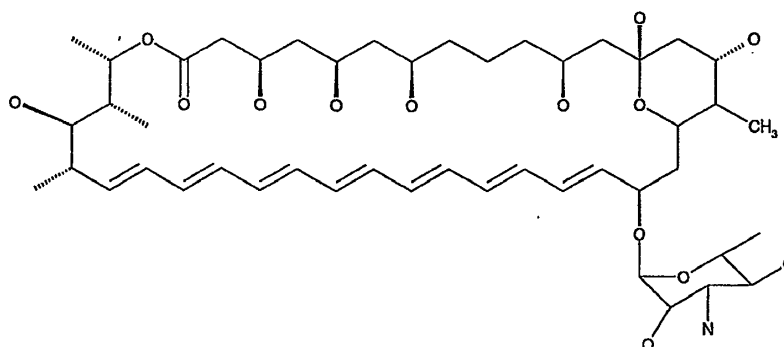
Compuestos todavía más preferidos de la invención son aquellos de fórmula I en la que R^8 es un grupo de azúcar o un grupo alquilamino como se definen aquí antes. Más preferiblemente, cuando R^8 es un grupo de azúcar o un grupo alquilamino, R^9 es un átomo de hidrógeno. Aún más preferiblemente, R^5 es un grupo hidroxilo y R^6 es un átomo de hidrógeno y/o R^3 y R^4 son átomos de hidrógeno. De manera especialmente preferible, C10 es un estereocentro R.

Ejemplos representativos de compuestos preferidos de la invención son los números de compuesto 1, 3 y 5-16 mostrados en la Figura 1. Compuestos particularmente preferidos son los números de compuesto 1, 9, 11, 12, 13, 14, 15, y 16, especialmente los números de compuesto 1, 9, 11, 12, 13, y 14, por ejemplo los números de compuesto 1 y 11.

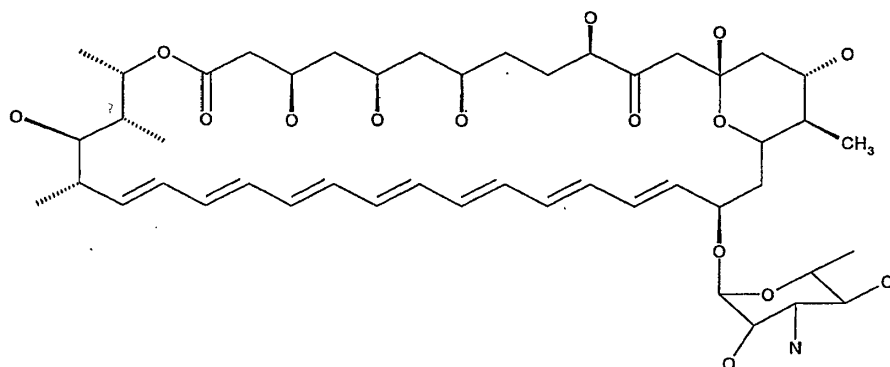
Compuestos preferidos adicionales son aquellos en los que el grupo carboxi de C16 se convierte en dimetiletilamida. También se prefieren compuestos en los que el mismo grupo carboxi se convierte en un grupo metilo. Los compuestos especialmente preferidos incluyen aquellos con una de las alteraciones en C16 anteriores, así como cambios en la región poliólica (C5-C11).

Como se menciona anteriormente, los compuestos de la invención pueden tomar la forma de sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales incluyen sales de adición de ácidos con ácidos orgánicos o inorgánicos fisiológicamente aceptables. Los ejemplos de ácidos adecuados para la formación de tales sales incluyen acético, aspártico, benenosulfónico, benzoico, bicarbónico, bisulfúrico, bitartárico, butírico, edetato de calcio, camsílico, carbónico, clorobenzoico, cítrico, edético, edisílico, estólico, esilo, esílico, fórmico, fumárico, glucéptico, glucónico, glutámico, glucolilarsanílico, hexámico, hexilresorcinoico, hidrabámico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, maleico, málico, malónico, mandélico, metanosulfónico, metilnitríco, metilsulfúrico, mícico, mucónico, napsílico, nítrico, oxálico, p-nitrometanosulfónico, pamoico, pantoténico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, ftálico, poligalacturónico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfónico, sulfúrico, tánico, tartárico, teóclico y toluenosulfónico. Se prefieren especialmente las sales de glutamato. Como alternativa, las sales se pueden formar con bases. Los ejemplos de bases adecuadas para la formación de tales sales incluyen aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, arginina, betaína, cafeína, colina, N,N-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas poliamínicas, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina y tripropilamina. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden estar en forma hidratada. Los procedimientos para la conversión de compuestos de fórmula I en tales sales son convencionales en la técnica.

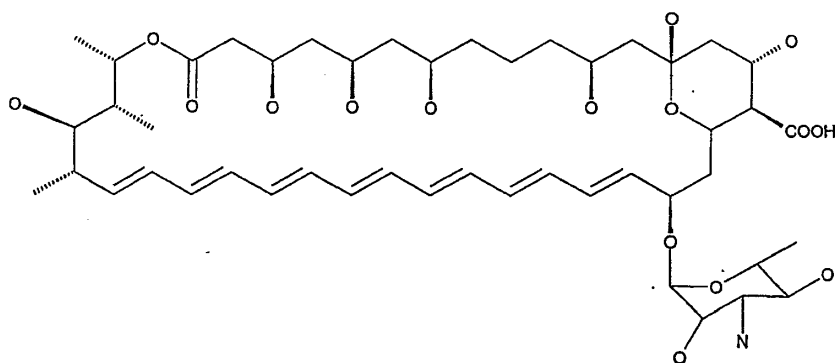
Compuestos muy preferidos de la invención se pueden derivar a partir de los siguientes esqueletos (en los que el grupo COOH en la posición 16 y opcionalmente el grupo amino están funcionalizados según se desea, es decir, cuando COOH está sustituido por R7). Obsérvese que en general los átomos de hidrógeno no están dibujados en estos esqueletos. Se apreciará que éstos todavía están presentes (es decir, para formar grupos hidroxilo en los átomos -O):

B1**B3****B4**

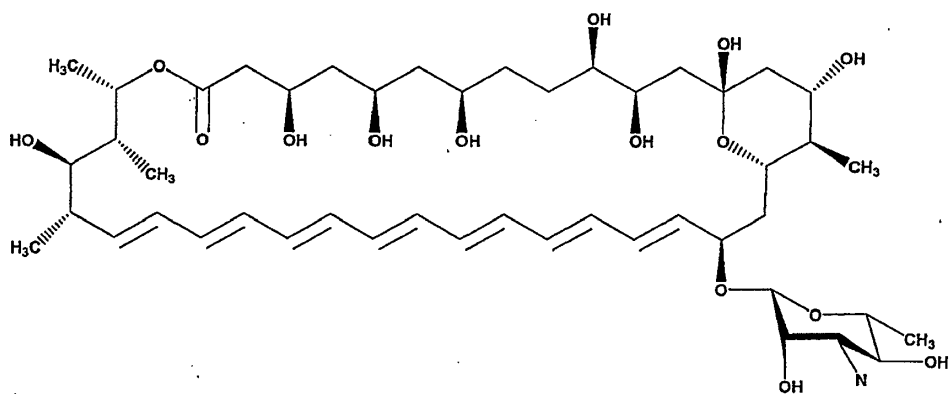
B5



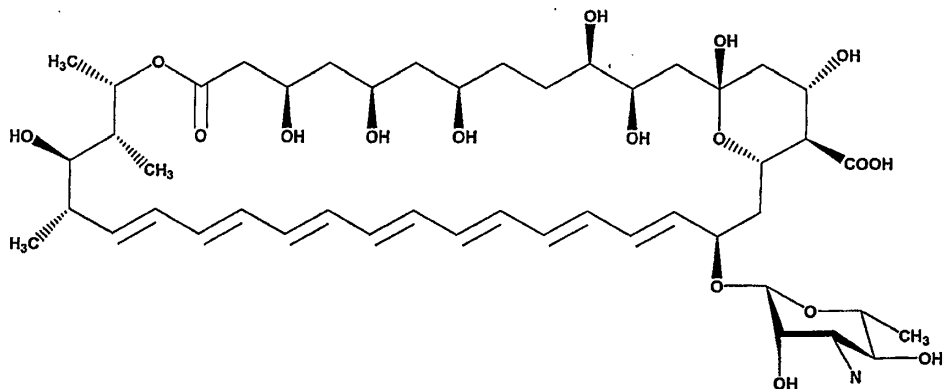
B6



Compuesto 1 (de los Ejemplos)



5 S44HP (en el que el grupo COOH en la posición 16 y opcionalmente el grupo N están funcionalizados)



Se apreciará que hay un número de variables en los compuestos de la invención. Para evitar dudas, se enfatiza que cada descripción de la definición de una variable se considera descrita en relación con todas las definiciones de otras variables en la solicitud. En particular, por lo tanto, opciones preferidas para cada variable se pueden combinar con opciones menos preferidas y opciones preferidas para cualquier otra variable.

- 5 Los compuestos de la invención se pueden preparar usando procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo química sintética convencional, manipulación genética, o una combinación de las mismas.

Como se menciona anteriormente, un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para obtener compuestos como se describen aquí anteriormente, que comprende:

- 10 (i) modificar un agrupamiento génico que codifica el sistema de policétido sintasa responsable de la síntesis de nistatina, para producir un derivado de nistatina que tiene un doble enlace entre C28 y C29; y
- (ii) modificar adicionalmente dicho agrupamiento génico para producir derivado de nistatina que está modificado en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina,
- o
- 15 (iii) modificar el derivado resultante en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina mediante una reacción química.

Un procedimiento preferido de la invención comprende las etapas (i) y (ii), es decir, modificar un agrupamiento génico que codifica el sistema de policétido sintasa responsable de la síntesis de nistatina, para producir un derivado de nistatina que tiene un doble enlace entre C28 y C29 y una modificación adicional con respecto a nistatina en C16 y opcionalmente una o mas de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina (por ejemplo, en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, o C10).

Un segundo procedimiento preferido de la invención comprende las etapas (i) y (iii). La modificación de un agrupamiento génico que codifica el sistema de policétido sintasa responsable de la síntesis de nistatina se puede llevar a cabo según procedimientos convencionales, por ejemplo como se describe en el documento WO01/59126.

25 El agrupamiento génico de policétido sintasa de la nistatina codifica un número de unidades repetidas (módulos), cada uno de los cuales es responsable de un ciclo de condensación en la síntesis de una cadena de policétido. Existe un módulo de carga (*nysA*) que determina la naturaleza de la unidad "iniciadora" (ácido carboxílico) para el inicio de la síntesis de la cadena de policétido, y 18 módulos de "extensión" que incorporan (condensan en la cadena) unidades "extensoras" adicionales (los siguientes ácidos carboxílicos que se añaden sobre la cadena).

30 Cada uno de tales módulos codifica así un número de actividades enzimáticas (por ejemplo, enzimas) que da como resultado la síntesis de la molécula; el módulo contiene dominios que codifican de forma separada tales actividades. De este modo, un módulo puede comprender típicamente un dominio de aciltransferasa (AT), un dominio de proteína portadora de acilo (ACP), y un dominio de β -cetoacil sintasa (KS) para la síntesis y extensión (dominios de cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH), y enoil reductasa (ER), que determinan el estado reducido de la unidad iniciadora/extensora incorporada. El agrupamiento génico contiene adicionalmente genes (o marcos de lectura abiertos, ORFs) que codifican otras enzimas (o actividades enzimáticas) implicadas en la biosíntesis de nistatina. De este modo, una tioesterasa (TE) puede permitir la liberación del policétido a partir de la PKS. Además, los genes o secuencias génicas en el agrupamiento génico pueden codificar enzimas o actividades enzimáticas que pueden modificar la molécula sintetizada (cadena de policétido) adicionalmente, por ejemplo, mediante hidroxilación, por

40 ejemplo monooxigenasas (por ejemplo *nysN* o *nysL*), o mediante glucosilación (por ejemplo actividad de glucuronosil transferasa, por ejemplo *nys DI*).

De este modo, los módulos y/o dominios del agrupamiento génico de PKS se pueden modificar por ejemplo mediante inserción, supresión o inactivación, o mediante sustitución de un dominio o módulo, o mediante mutación de un dominio o módulo, para alterar su actividad. De este modo, el número de módulos y/o dominios se pueden

45 modificar, o se pueden alterar, para cambiar su actividad. También se pueden modificar otros genes o secuencias génicas que codifican otras actividades enzimáticas, por ejemplo monooxigenasa o glucosiltransferasa. Típicamente, los dominios "reductores" (por ejemplo, ER, DH y/o KR) se pueden modificar (por ejemplo inactivar) en uno o más módulos, o se pueden modificar (por ejemplo inactivar) secuencias génicas que codifican actividades de monooxigenasa (por ejemplo *NysL*, *NysN*).

50 El doble enlace entre C28 y C29 se puede introducir, por ejemplo, mediante inactivación del dominio de ER en el módulo 5 de policétido sintasa como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO01/59126.

Se pueden introducir modificaciones adicionales con respecto a nistatina en, por ejemplo, C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, o C10, mediante otras modificaciones del agrupamiento génico que codifica el sistema de policétido sintasa. Cuando se realizan modificaciones adicionales al agrupamiento génico,

55 preferiblemente producen una modificación con respecto a nistatina en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, o C10.

La modificación de la estructura de nistatina en C5 se puede producir por inactivación del dominio de cetorreductasa en el módulo 17 de la policétido sintasa de nistatina, por ejemplo mediante el método descrito en los ejemplos.

La modificación de la estructura de nistatina en C9 se puede producir por inactivación del dominio de cetorreductasa en el módulo 15 de la policétido sintasa de nistatina, por ejemplo mediante el método descrito en los ejemplos.

- 5 La modificación de la estructura de nistatina en C10 se puede producir por inactivación del gen para NysL monooxigenasa responsable de la hidroxilación de C10, por ejemplo mediante el método descrito en los ejemplos.

La modificación de la estructura de nistatina en C7 se puede producir por inactivación de los dominios de KR16.

La modificación de la estructura de nistatina en C11 se puede producir por inactivación de los dominios de KR14.

- 10 La modificación de la estructura de nistatina en C16 se puede producir por inactivación de los genes *nysN* que codifican P540 monooxigenasa, por ejemplo mediante el método descrito en los ejemplos.

- 15 La modificación adicional de los compuestos que resultan de la etapa (i), y opcionalmente la etapa (ii), en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, C16 o en el grupo amino de micosamina mediante reacción química se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento conocido. También se puede emplear química de grupos protectores convencional siempre que sea necesario. Cuando se introducen modificaciones adicionales mediante reacción química, preferiblemente producen una modificación con respecto a nistatina en la posición C16 y/o el grupo amino de micosamina.

Una reacción química preferida es la formación de amida en C16. La conversión del grupo COOH de nistatina en una amida se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el derivado de nistatina con la amina apropiada, opcionalmente en presencia de agente activador (por ejemplo PyBOP).

- 20 Otra reacción química preferida es la alquilación reductora en el grupo amino de micosamina. La alquilación reductora se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el derivado de nistatina con un aldehído apropiado para formar una imina, y reduciendo la imina, preferiblemente *in situ*, mediante adición de un agente reductor. Un agente reductor preferido es NaBH_3CN .

- 25 Una reacción química preferida adicional es la reacción de Amadori en el grupo amino de micosamina. La reacción de Amadori se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el derivado de nistatina con un azúcar o azúcares reductores apropiados.

- 30 Un procedimiento preferido de la invención produce compuestos de fórmula (I) como se describen aquí anteriormente. En tales procedimientos, las modificaciones en la posición C5 modifican R^1 y/o R^2 con respecto a nistatina, las modificaciones en C9 modifican R^3 y/o R^4 con respecto a nistatina, las modificaciones en C10 modifican R^5 y/o R^6 con respecto a nistatina, y las modificaciones en C16 modifican R^7 con respecto a nistatina. Las modificaciones en el grupo amino de micosamina modifican R^8 y R^9 con respecto a nistatina. Los procedimientos preferidos son aquellos que producen R^1 - R^9 especificados aquí como preferidos en relación con los compuestos de fórmula I.

- 35 Los compuestos se pueden purificar mediante cualquier técnica convencional, por ejemplo cristalización, cromatografía, etc. Los compuestos de fórmula I de la invención contienen un número de centros quirales, y, como tales, existen en formas estereoisómeras diferentes. En la Figura 1 se muestran compuestos particularmente preferidos.

- 40 Los compuestos de la invención se pueden usar en una amplia variedad de aplicaciones para inhibir el crecimiento de, o exterminar, hongos. Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden usar como desinfectantes o como conservantes (por ejemplo en productos alimentarios y cosméticos).

Para uso como un desinfectante o conservante, los compuestos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros agentes antifúngicos y/o antibacterianos. Los compuestos se pueden usar per se, o más preferiblemente en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente.

- 45 Los compuestos de la invención son particularmente adecuados para el tratamiento o prevención de infecciones fúngicas. Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención son especialmente adecuados para el tratamiento o prevención de infecciones fúngicas de áreas internas y externas del cuerpo. Los ejemplos de áreas del cuerpo que se pueden tratar incluyen la piel, boca, vagina y tubo digestivo. Los compuestos y composiciones son particularmente adecuados para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas (por ejemplo sistémicas).

- 50 Los compuestos de la invención tienen idealmente un amplio espectro de actividad, pero son especialmente adecuados para el tratamiento de infecciones fúngicas provocadas por especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Hormonema*, *Lecythophora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Fusarium*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Trichophyton* y *Scopulariopsis*, especialmente especies de *Candida* y *Cryptococcus* (por ejemplo especies de *Candida*).

- Para uso en tal tratamiento, los compuestos se pueden formular como composiciones farmacéuticas de cualquier manera convencional con uno o más vehículos, excipientes y/o diluyentes. La formulación farmacéutica específica dependerá del modo deseado de administración, y se determinará fácilmente por aquellos expertos en la técnica. Los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen agua, etanol, glicerol, polietilenglicol, cloruro de sodio, desoxicolato de sodio, azúcares (por ejemplo glucosa, sacarosa o lactosa), almidones (por ejemplo almidón de maíz o almidón de maíz), celulosa microcristalina, gomas (por ejemplo goma de tragacanto), sorbitol, manitol, xilitol, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, ácidos grasos (por ejemplo ácido esteárico), grasas, ceras, carbonato de calcio, cloruro de calcio y ácido cítrico.
- 5 Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente uno o más agentes humectantes, agentes edulcorantes (por ejemplo un azúcar, aspartamo o sacarina), agentes lubricantes, agentes estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes saborizantes (por ejemplo vainilla, aceite de menta piperita, o un saborizante de frutas), y/o potenciadores de la absorción.
- 10 Los compuestos de la invención se pueden coadministrar, si se desea, con sustancias farmacéuticamente activas adicionales (por ejemplo una, dos o tres). Una ventaja asociada con el uso de una combinación de los compuestos de la invención y otra u otras (por ejemplo una) sustancia o sustancias activas es que puede incrementar el espectro de enfermedades para las que la composición es adecuada para uso como un medicamento. Adicionalmente o como alternativa, se puede lograr ventajosamente una reducción de la dosis del compuesto de la invención y/o de la sustancia o sustancias activas adicionales. Esto es particularmente ventajoso cuando tal sustancia activa adicional está asociada con efectos secundarios conocidos.
- 15 Las sustancias activas adicionales que se pueden usar en composiciones de la invención incluyen otros agentes antifúngicos y antibióticos. Los agentes antifúngicos representativos son azoles y equinocandinas. Los antibióticos representativos incluyen demeclociclina, acetónido de triamcinolona, sulfato de neomicina, gramicidina, oxitetraciclina y eritromicina.
- 20 Las composiciones farmacéuticas usadas según la invención se pueden administrar oralmente, rectalmente (por ejemplo usando un supositorio), tópicamente o sistémicamente. La ruta escogida dependerá, por ejemplo, de la enfermedad y/o del sujeto a tratar, aunque se prefieren composiciones para la administración oral y sistémica. Se prefieren particularmente composiciones para la administración sistémica.
- 25 Las composiciones se pueden presentar en cualquier forma adaptada para uso en la vía de administración seleccionada. Las formas adecuadas para administración oral incluyen, por ejemplo, comprimidos desnudos o revestidos, comprimidos de liberación sostenida, comprimidos masticables, cápsulas blandas, cápsulas duras, suspensiones y jarabes. Las formas preferidas para uso según la invención son comprimidos, suspensiones y jarabes, particularmente comprimidos.
- 30 Las formas adecuadas para la administración sistémica pueden ser, por ejemplo, formulaciones para inyección o infusión intradérmica, intraperitoneal o intravenosa. Se prefieren particularmente formulaciones para inyección intravenosa.
- 35 Las formas adaptadas para la administración tópica incluyen composiciones para la administración a la piel y a las mucosas (por ejemplo geles, cremas, pulverizaciones, lociones, ungüentos y aerosoles). Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención.
- 40 La cantidad del compuesto de la invención a usar en cualquier aplicación se determinará fácilmente por el experto en la técnica. Por ejemplo, para uso como un desinfectante o conservante, la cantidad de compuesto que se requiere es aquella que inhibe el crecimiento de, o es letal para, hongos diana. Aunque la cantidad real dependerá de un hongo diana particular de la aplicación, para uso como desinfectante o conservante, los compuestos de la invención se usan típicamente en cantidades de 0,5 a 5% en peso, más preferiblemente 1 a 3% en peso de la disolución o material desinfectante a conservar.
- 45 Par uso para tratar infecciones fúngicas, la cantidad del compuesto de la invención, así como cualquier otra sustancia o sustancias activas opcionales presentes en mezcla con aquél, se puede determinar fácilmente por aquellos expertos en la técnica, y dependerá de varios factores, incluyendo la naturaleza de cualquier sustancia o sustancias activas adicionales opcionales, el método de administración, la enfermedad a tratar, y el peso del sujeto. Generalmente, sin embargo, los compuestos de la invención se pueden usar en cantidades de 0,01-50% en peso de la composición, preferiblemente 1-20% en peso.
- 50

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes y Figuras, en las que:

la Figura 1 muestra la estructura de un número de compuestos de la invención;

la Figura 2 muestra isoplots de UV de S44HP y el extracto de DMSO del mutante con ER5 y NysN inactivados que produce el compuesto 1;

55 la Figura 3 muestra el espectro de TOF del pico de polieno principal del extracto de DMSO del mutante con

ER5 y NysN inactivados. Los picos con $m/z = 980$ y 1034 son referencias internas;

la Figura 4 muestra isoplots de UV de extractos de DMSO de la cepa GG5073SP (cepa de referencia) productora de S44HP y el mutante con ER5 y KR17 inactivados que produce el compuesto 2;

5 la Figura 5 muestra el espectro de TOF del pico de polieno principal del extracto de DMSO del mutante con ER5 y KR17 inactivados;

la Figura 6 muestra isoplots de UV de extractos de DMSO de la cepa GG5073SP (cepa de referencia) productora de S44HP, y el mutante con ER5, KR17 y NysN inactivados, que produce el compuesto 3;

la Figura 7 muestra el espectro de TOF del pico de polieno principal del extracto de DMSO del mutante con ER5, KR17 y NysN inactivados. Los picos con $m/z = 980$ y 1034 son referencias internas;

10 la Figura 8 muestra isoplots de UV de extractos de DMSO de la cepa GG5073SP (cepa de referencia) productora de S44HP, y el mutante con ER5 y KR15 inactivados, que produce el compuesto 4; y

la Figura 9 muestra los resultados del ensayo de la actividad antifúngica in vivo en compuestos 1 y 11.

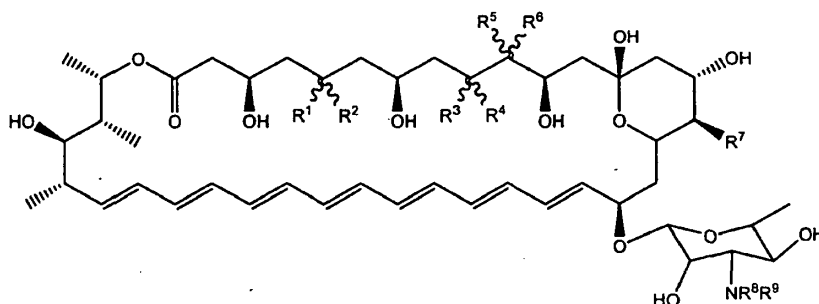
Las Figuras 10-16 son esquemas para la preparación de diversos compuestos de la invención.

15 La Figura 17 muestra los resultados del ensayo in vivo de nuevos compuestos de la invención en modelo de ratón neutropénico de candidiasis diseminada.

EJEMPLOS

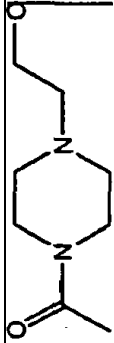
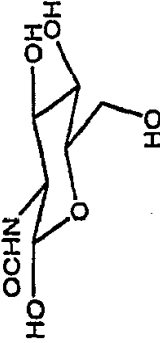
PREPARACIÓN DE COMPUESTOS

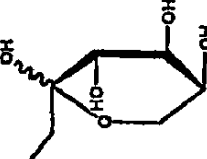
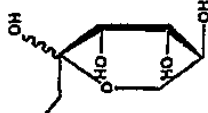
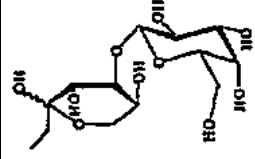
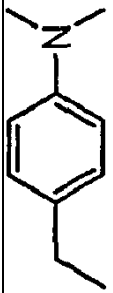
Se prepararon los compuestos enunciados en la Tabla 1. En la Figura 1 se muestra la estereoquímica precisa de cada uno de estos compuestos.



20

Tabla 1.

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
S44HP	OH	H	H	H	OH	H	COOH	H	H
1	OH	H	H	H	OH	H	CH ₃	H	H
2	=O		H	H	OH	H	COOH	H	H
3	=O		H	H	OH	H	CH ₃	H	H
4	OH	H	=O		OH	H	COOH	H	H
5	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH ₂ CH ₂ OH	H	H
6	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH ₃	H	H
7	OH	H	H	H	OH	H	CONH ₂	H	H
8	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH(CH ₃) ₂)-COOCH ₃ (L)	H	H
9	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH ₂ COOEt	H	H
10	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH ₃)COOCH ₃ (L)	H	H
11	OH	H	H	H	OH	H	CONH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	H	H
12	OH	H	H	H	OH	H	CONH(CH ₂) ₃ OH	H	H
13	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH ₂ OH)COO CH ₃ (L)	H	H
14	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH ₂ OH)COO CH ₃ (DL)	H	H
15	OH	H	H	H	OH	H		H	H
16	OH	H	H	H	OH	H		H	H

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
17	OH	H	H	H	OH	H	COOH		H
18	OH	H	H	H	OH	H	COOH		H
19	OH	H	H	H	OH	H	COOH		H
20	OH	H	H	H	OH	H	COOH		=R ⁸
21	OH	H	H	H	OH	H	COOH	(CH ₂) ₃ NH ₂	H
22	OH	H	H	H	OH	H	COOH	(CH ₂) ₃ NH ₂	(CH ₂) ₃ NH ₂
23	OH	H	H	H	OH	H	COOH	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ (L)	H
24	OH	H	OH	H	H	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
25	OH	H	H	H	H	H	CH ₃	H	H*

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
26	OH	H	OH	H	H	H	CH ₃	H	H*
27	OH	H	H	H	H	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
28	OH	H	H	H	OH	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
29	OH	H	H	H	OH	H	CH ₃	H	H*
* como sal de glutamato									
S44MP y los compuestos 2, 4 y 17-23 no forman parte de la invención.									

Síntesis de S44HP

Este compuesto se preparó como se describe en Borgos S.E. et al., Arch Microbiol. Abril de 2006; 185(3):165-71.

Síntesis de los Compuestos 1-4

5 Los Compuestos 1-4 se prepararon mediante manipulación genética usando las siguientes combinaciones de mutaciones específicas del sitio en el agrupamiento génico biosintético de nistatina (secuencia – en Brautaset, T., et al., Chem Biol. Junio de 2000; 7(6):395-403:

Compuesto 1 mutaciones en ER5 + NysN;

Compuesto 2 mutaciones en ER5 + KR17;

Compuesto 3 mutaciones en ER5 + KR17 + NysN;

10 Compuesto 4 mutaciones en ER5 + KR15.

Se usó el vector de inactivación de ER5 como se describe en Borgos S.E. et al., Arch Microbiol. Abril de 2006; 185(3):165-71.

Se diseñaron y prepararon los siguientes constructos por el solicitante:

NysN:

15 Vectores pSOK201nysN4.1-CL346ST y pSOK201nysN4.1-CL346AS para introducir mutaciones CL346ST y CL346AS, respectivamente, en *nysN*

20 El fragmento de NcoI/XbaI de 4,1 kb del clon lambda recombinante N95 (Brautaset, T., et al., Chem Biol. Jun 2000; 7(6):395-403) se clonó en los sitios correspondientes del plásmido pLITMUS28. Del constructo resultante, todo el inserto de 4,1 kb se cortó con EcoRI/HindIII y se clonó en los sitios correspondientes de pGEM11zf(+). Del plásmido resultante, denominado pGEM11nysN4.1, la región de 1,5 kb que incluye el sitio activo de NysN se amplificó mediante PCR usando los siguientes cebadores:

conA-1F: 5'- ttttgaaTTCTTCAAGCCGATGAGCC-3' (sentido), y

conA-1R: 5'-ttttaagctTGGTCGAACAGGTCCGG-3' (antisentido).

25 Los cebadores han introducido sitios EcoRI y HindIII (subrayados), que se usaron para clonar el fragmento de PCR obtenido en los sitios correspondientes de pGEM11zf(+), produciendo el plásmido pGEM11nysN1.5. Este último plásmido se usó como un molde para la mutagénesis dirigida al sitio (usando el kit QuickChange, Stratagene), usando los siguientes oligonucleótidos mutagénicos:

Mutación CL346ST:

CL346ST-F: 5'- CTACGGTGTCCACCA**GTCTGAC**GGGCCAGAACCTGGTGC-3'

30 CL346ST-R: 5'-GCACCAGGTTCTGGCCC**GTCTGAC**TGGTGGACACCGTAG-3'

Mutación CL346AS:

CL346AS-F: 5'-TCGGCTACGGTGTCCAC**GCTAGC**CTGGGCCAGAACCTGG-3'

CL346AS-R: 5'-CCAGGTTCTGGCCCAG**GCTAGC**TGGACACCGTAGCCGA-3'

35 Los nucleótidos mutados se indican en letra negrita, mientras que los nuevos sitios de restricción introducidos (Sall para la mutación CL346ST; NheI para la mutación CL346AS) están subrayados en las secuencias. Las mutaciones se identificaron con un análisis de restricción de Sall o NheI, y los insertos completos de vectores correctamente mutados se verificaron mediante secuenciación de ADN. Los fragmentos de FspAI/Bpu1102I de 1,3 kb mutados procedentes de los plásmidos resultantes se usaron para sustituir el fragmento correspondiente del plásmido pGMI l nysN4.1, produciendo los plásmidos pGM11nysN4.1-CL346ST y pGM11nysN4.1-CL346AS. A partir de estos últimos constructos, los insertos de 4,1 kb que contienen los genes *nysN* mutados se cortaron con EcoRI/HindIII y se

40 ligaron en el esqueleto de EcoRI/HindIII de 3,1 kb de pSOK201, produciendo los plásmidos de inactivación de *nysN* pSOK201nysN4.1-CL346ST y pSOK201nysN4.1-CL346AS.

45 Para la inactivación de *nysN* en la cepa que produce el compuesto 1, se usó el constructo pSOK201nysN4.1-CL346ST. Para la inactivación de *nysN* en la cepa que produce el compuesto 3, se usó el constructo pSOK201nysN4.1-CL346AS.

KR17:

Vector pKR17m para introducir la mutación YA5145FE en KR17 de NysJ

El fragmento de PmlI/BamHI de 4,0 kb del plásmido pL98E (Brautaset, T., et al., Chem Biol. Jun 2000; 7(6):395-403) se cortó y se ligó en los sitios HincII/BamHI del vector pGEM3zf(+), produciendo el plásmido pBB4.0. Un fragmento de ADN de 1,5 kb, que incluye la región del sitio activo de KR17, se amplificó mediante PCR a partir de pBB4.0 usando los siguientes cebadores:

KR17-F: 5'-ttttctgCAGGCCGCGGTGCGCGC-3' (sentido), y

KR17-R: 5'-TCCGGCATGGTCCGTGAAACC-3' (antisentido)

El producto de la PCR se digirió en el extremo con PstI (sitio de reconocimiento subrayado en el cebador) y sacI (sitio de reconocimiento en el fragmento de ADN amplificado), y el fragmento de 1,4 kb se ligó en los sitios correspondientes de pLITMUS28. El plásmido resultante, pLIT1.4, se usó como un molde para la mutagénesis dirigida al sitio con los siguientes oligonucleótidos mutagénicos:

KR17-mut1:

5'-GCCCCGCGCCAGGGCAAC**TTCGAA**GCCGGCAACACGTTCC-3'

KR17-mut2:

5'-GGAACGTGTTGCCGGC**TTCGAA**GTTGCCCTGGCCGGGGC-3'.

Los nucleótidos mutados se indican en letra negra, mientras que el nuevo sitio de restricción de BstBI introducido está subrayado en las secuencias. La mutación correcta se verificó con digestión de BstBI, y todo el inserto del plásmido mutado se verificó mediante secuenciación de ADN. A partir del plásmido resultante, pLIT1.4m, se cortó el fragmento de BclI/AccIII de 1072 pb y se usó para sustituir el fragmento correspondiente del plásmido pBB4.0, produciendo el plásmido pBB4.0m. Todo el inserto de 4,0 de pBB4.0m se cortó con EcoRI + HindIII y se ligó junto con el esqueleto de EcoRI/HindIII de 3,0 kb del plásmido pSOK201, produciendo el vector de inactivación de KR17 pKR17m.

KR15:

Vector pKR15m para introducir la mutación YA1888FE en KR15 de NysJ

El fragmento de KpnI/PmlI de 3,6 kb de pL20X (Brautaset, T., et al., Chem Biol. Jun 2000; 7(6):395-403) se cortó y se ligó en los sitios de KpnI/HincII de pGEM3zf(+), produciendo pKP3.6. Este último plásmido se usó como un molde para la amplificación mediante PCR de un fragmento de ADN de 1,1 kb usando los siguientes cebadores: KR15-F1: 5'-ttttgaa**TTCCCGACGGCCTCTCCTACC**-3' (sentido), y KR15-R1: 5'-ttttaag**CTTGCCGAGTCGGTTGCGC**-3' (antisentido). El producto de la PCR se digirió en el extremo con EcoRI/HindIII (los sitios de restricción están subrayados en los cebadores), y se ligó en los sitios correspondientes de pLITMUS28, produciendo pLIEH1.1. Este último plásmido sirvió como un molde para la mutagénesis dirigida al sitio usando los siguientes oligonucleótidos mutagénicos:

mutKR15-1F: 5'-CCGGGCCAGGCCAAC**TTCGAA**GCCGGCAACACCTTCCTCG-3'

mutKR15-1R: 5'-CGAGGAAGGTGTTGCCGGC**TTCGAA**GTTGCCTGGCCCGG-3'

Los nucleótidos mutados se muestran en letra en negra, y se subraya el nuevo sitio de BstBI introducido. La mutación correcta se verificó mediante digestión de BstBI, y todo el inserto del plásmido mutado se verificó mediante secuenciación del ADN. A partir del plásmido mutado, se cortó el fragmento de FspAI/AccIII de 1045 pb y se usó para sustituir la región correspondiente de pKP3.6, produciendo pKP3.6mut. Todo el inserto de 3,6 kb de pKP3.6mut se cortó entonces con EcoRI/HindIII y se ligó con el fragmento de EcoRI/HindIII de 3,2 kb de pSOK201, produciendo el vector de inactivación de KR15 pKR15m.

Introducción de vectores de sustitución en cepas de *S. noursei*:

Todos los vectores de inactivación construidos se transformaron a *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002), y las cepas recombinantes resultantes se usaron para la conjugación de vectores de inactivación en cepas de *S. noursei* como se describe previamente (Brautaset, T., et al., Chem Biol. Jun 2000; 7(6):395-403);

- Verificación del 1^{er} entrecruzamiento mediante transferencia Southern + PCR
- Selección de candidatos del 2^o entrecruzamiento (sensibles a apramicina)
- Caracterización genética de los candidatos del 2^o entrecruzamiento mediante transferencia Southern + PCR
- Complementación de mutantes correctos del 2^o entrecruzamiento con pNA0 (Brautaset et al., 2000, Chem. Biol., 7: 395-403).

Las cepas recombinantes complementadas se sometieron a fermentación, y la producción de moléculas correspondientes se confirmó vía análisis de HPLC y MS-TOF.

Compuesto 1

Isoplots de UV

- 5 En la Figura 2, en las isoplots, se muestran S44HP estándar y el extracto de DMSO del mutante *S. noursei* con ER5 y NysN inactivados.

Isoplots de LC-MS:

Columna: Zorbax SB-C18 2,1 x 100 mm, 3,5 μ m (Agilent Technologies).

- 10 Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH no ajustado, fase móvil B: acetonitrilo 100% (Rathburn, grado HPLC)

Tiempo	%B
0,00	27
6,50	65
7,30	65
7,40	27
12,00	27

Caudal: 0,22 ml/min.

Temperatura de la columna: ambiente

Parámetros de TOF-MS:

- 15 Ionización API-ES negativa
Gas secante: 10 l/min.
Presión del nebulizador: 40 psig
Temp. del gas secante: 350°C
Voltaje del capilar: 3000 V
20 Fragmentador: 200 V

Espectro de TOF-MS

- 25 El espectro de TOF-MS se muestra en la Figura 3, en la que los picos de m/z = 966, 980 y 1034 son referencias máscas internas. El m/z teórico (ion negativo) del compuesto 1 ($C_{47}H_{75}NO_{15}$) es 892.5063. Este m/z se observa con exactitud elevada, y se correlaciona bien con el pico de UV del hepteno. La pérdida de agua (1 y 2 moléculas) durante la ionización del compuesto 1 también produce picos de masas con $\Delta m/z$ = -18 y $\Delta m/z$ = -36, respectivamente.

Purificación mediante LC preparativa

La purificación se realizó en una columna de fase inversa preparativa.

Método preparativo:

- 30 Columna: Agilent Prep-C18 50 x 250mm, 10 μ m (Agilent Technologies).

Fase móvil: acetato de amonio 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH ajustado a 4,0 con ácido acético (JT Baker #6002), fase móvil B: metanol 100% (Lab-Scan, grado HPLC)

Tiempo	%B
0,00	78

6,00	78
6,20	100
11,00	100
11,20	78

Caudal: 85 ml/min.

Temperatura de la columna: ambiente

5 Tras la purificación mediante LC preparativa, se mostró que el compuesto 1 constituye >97% de los macrólidos poliénicos en la muestra, según se determina mediante los datos de UV y MS.

Método de LC-MS:

Columna: Zorbax Bonus-RP 2,1 x 50 mm, 3,5 μ m (Agilent Technologies).

Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH ajustado a 4,0 con ácido acético (JT Baker #6002), fase móvil B: acetonitrilo 100% (Rathburn, grado HPLC)

Tiempo	%B
0,00	27
10,00	53
10,10	27
15,00	27

10

Caudal: 0,3 ml/min.

Temperatura de la columna: ambiente

15 Para polienos sin el grupo carboxilo (principalmente el compuesto 1), el método también se llevó a cabo con bicarbonato de amonio 20 mM (Fluka #09830), pH ajustado a 7,0 con ácido acético (JT Baker #6002), como fase móvil A, ya que el pH elevado proporcionó una separación ligeramente mejor entre polienos con y sin el grupo ionizable carboxilo.

Parámetros de MS:

Ionización API-ES negativa

Gas secante: 12 l/min.

20 Presión del nebulizador: 35 psig

Temp. del gas secante: 350°C

Voltaje del capilar: 3000 V

Compuesto 2

Isoplots de UV

25 En la Figura 4, en las isoplots, se muestran extractos de DMSO de la cepa GG5073SP (productora de S44HP) y del mutante con los dominios ER5 y KR17 inactivados.

Método de LC-MS y parámetros de TOF-MS: los mismos que para el compuesto 1.

Datos de TOF-MS

30 En la Figura 5 se muestra el espectro de TOF-MS. El m/z teórico (ion negativo) del compuesto 2 ($C_{47}H_{71}NO_{17}$) es 920,4649. Este m/z se observa con exactitud aceptable (error < 3 ppm), y se correlaciona bien con el pico de UV de hepteno.

Purificación mediante LC preparativa

La purificación se llevó a cabo en una columna de fase inversa preparativa.

Método preparativo:

5 Columna: Agilent Prep-C18 50 x 250mm, 10 μ m (Agilent Technologies). Fase móvil: acetato de amonio 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH ajustado a 4,0 con ácido acético (JT Baker #6002), fase móvil B: metanol 100% (Lab-Scan, grado HPLC)

Tiempo	%B
0,00	70
15,00	70
15,20	100
19,00	100
19,20	70
22,00	70

Caudal: 100 ml/min.

Temperatura de la columna: ambiente

10 Tras la purificación mediante LC preparativa, se mostró que el compuesto 2 constituye >95,2% de los macrólidos poliénicos en la muestra, como se determina mediante los datos de UV y MS.

Método de LC-MS: el mismo que para el compuesto 1.

Compuesto 3

Isoplots de UV

15 En la Figura 6, en las isoplots, se muestran extractos de DMSO de la cepa GG5073SP (productora de S44HP) y del mutante con los dominios ER5 y KR17 inactivados y NysN inactivado.

Método de LC-MS:

Columna: Zorbax Bonus-RP 2,1 x 50 mm, 3,5 μ m (Agilent Technologies).

20 Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH ajustado a 4,0 con ácido acético (JT Baker #6002), fase móvil B: acetonitrilo 100% (Rathburn, grado HPLC)

Tiempo	%B
0,00	27
6,50	65
7,30	65
7,40	27
12,00	27

Caudal: 0,3 ml/min.

Temperatura de la columna: ambiente

Parámetros de TOF-MS: los mismos que para el compuesto 1.

25 El espectro de TOF-MS se muestra en la Figura 7, en la que los picos de $m/z = 980$ y 1034 son referencias másicas internas. El m/z teórico (ion negativo) del compuesto 3 ($C_{47}H_{73}NO_{15}$) es $890,4907$. Este m/z se observa con exactitud elevada (véase el espectro de masas), y se correlaciona bien con el pico de UV de hepteno. La pérdida de agua (1 y

2 moléculas) durante la ionización del compuesto 3 también produce los picos de masas con $\Delta m/z = -18$ y $\Delta m/z = -36$, respectivamente. También, el análogo carboxilado (con $m/z = 920,4644$ en el espectro de MS mostrado) muestra un grado significativo de coelución cromatográfica. Se sabe que los compuestos carboxilados tienen una eficiencia de ionización notablemente superior en el modo de MS negativo, de manera que la cuantificación relativa no se debería de basar en las intensidades de las señales en el espectro de MS mostrado.

Compuesto 4

Isoplots de UV

En la Figura 8, en las isoplots, se muestran los extractos de DMSO de la cepa GG5073SP (productora de S44HP) y del mutante con los dominios de ER5 y KR15 inactivados.

Método de LC-MS: el mismo que para el compuesto 3.

Síntesis de Compuestos 5-23

General

Las reacciones se monitorizaron mediante TLC en placas de Merck Silica Gel 60F254 en un sistema de disolvente de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (13:6:1:0,1). La pureza de los productos resultantes se determinó mediante HPLC, y fue 80-90%. La HPLC de fase inversa analítica se llevó a cabo en un instrumento Shimadzu HPLC de la serie LC 10 en una columna Kromasil 100-C18 (4 x 250 mm, tamaño de partículas 6 μm) a un volumen de inyección de 20 μl y una longitud de onda de 408 nm. El sistema de disolvente comprendió H_3PO_4 0,01M a pH 2,6 y acetonitrilo. La proporción de acetonitrilo varió de 30 a 70% durante 30 min. con un caudal de 1,0 ml/min.

Síntesis de Compuestos 5-16

A una mezcla de S44HP (18 mg, 0,02 mmoles) y 0,06 mmoles del hidrocloreto de amina apropiado disuelto en 0,3 ml de DMSO se añadió, en porciones, Et_3N para ajustar el pH a 8-8,5, y después durante 15 minutos 0,03 mmoles de reactivo de PyBOP. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La adición subsiguiente de éter dietílico (~3 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (3 ml x 2). Tras la adición de 5 ml de acetona a este aceite, se formó un precipitado amarillo de amida. El precipitado se filtró, se lavó con acetona y después se secó *a vacío*. Todas las muestras se obtuvieron con rendimientos de más del 90%. En la tabla 2, más abajo, se resumen los datos analíticos para estos compuestos.

Síntesis de los Compuestos 17-19

Se añadió monosacárido (D-glucosa o D-galactosa) o disacárido (lactosa) (0,086 mmoles) apropiado a una disolución de S44HP (40 mg, 0,043 mmoles) en DMF (2 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 20 horas, y después la disolución se añadió gota a gota a éter dietílico (50 ml). El precipitado resultante se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó. El precipitado amarillo obtenido se purificó mediante cromatografía ultrarrápida ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (13:6:1:0,1)). Las fracciones que contienen el compuesto deseado se recogieron, y la disolución se concentró. La adición de éter dietílico dio entonces un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó *a vacío*. Todas las muestras se obtuvieron con rendimientos del 40-45%. En la tabla 2, más abajo, se resumen los datos analíticos para estos compuestos.

Síntesis del Compuesto 20

A una disolución de 4-N,N-dimetilaminobenzaldehído (0,065 mmoles) y S44HP (20 mg, 0,022 mmoles) en DMF (2 ml) se añadió NaBH_3CN (4,1 mg, 0,065 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 20 h. La adición de éter dietílico (10 ml) condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (10 ml x 2). Se formó un precipitado amarillo tras la adición de acetona (10 ml). El precipitado se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó. El sólido obtenido se purificó mediante cromatografía ultrarrápida ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (13:6:1:0,1)) sobre gel de sílice Merck para cromatografía en columna (0,040 – 0,063 mm). Las fracciones que contienen el compuesto deseado se recogieron, la disolución se concentró, y la adición de éter dietílico dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó *a vacío*.

Síntesis de los Compuestos 21 y 22

A una disolución de N-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-3-aminopropionaldehído (160 mg, 0,054 mmoles) y S44HP (100 mg, 0,011 mmoles) en DMF (3 ml) se añadió NaBH_3CN (34 mg, 0,054 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 20 horas y después se añadió gota a gota a éter dietílico (200 ml). El precipitado amarillo de la mezcla de compuestos se separó por filtración, y los compuestos individuales se separaron y se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice Merck para cromatografía en columna (0,040 - 0,063 mm) en un sistema de gradiente lineal de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HCOOH}$ (3:1:0,01) $\rightarrow$ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (13:6:1:0,1) para

producir N-[N-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-3-aminopropil]-S44HP y N,N-di-[N-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-3-aminopropil]-S44HP como sólidos amarillos.

5 A una disolución de N-[N-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-3-aminopropil]-S44HP o N,N-di-[N-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-3-aminopropil]-S44HP en DMSO (3 ml), se añadió piperidina (0,1 ml). Después de 2 h a temperatura ambiente, se añadió éter dietílico (~7 ml) y se formó un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (7 ml x 2). La adición de acetona (10 ml) dio un precipitado amarillo de compuesto 21 o compuesto 22 que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó a vacío. En la Tabla 2, más abajo, se resumen los datos analíticos para los compuestos resultantes 21 y 22.

Síntesis del Compuesto 23

10 A una disolución de S44HP (100 mg, 0,11 mmoles) en DMF seca (2 ml) se añadieron éster N-oxisuccinimídico de N^α,N^ε-di-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-L-lisina (221 mg, 0,33 mmoles) y Et₃N (15,3 µl, 0,11 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 1 h, y después se añadió H₂O (5 ml). La mezcla se extrajo con n-BuOH (3 x 5 ml). Las fracciones orgánicas se combinaron y se lavaron con HCl 0,01 N (1 x 5 ml) y H₂O (3 x 5 ml). La disolución se concentró, y la adición de éter dietílico dio un precipitado amarillo, que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:4:0,5:0,01)). Las fracciones que contienen el compuesto deseado se recogieron, la disolución se concentró, y la adición de éter dietílico dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó a vacío.

20 Al sólido amarillo aislado (30 mg) en DMSO (3 ml) se añadió piperidina (0,1 ml). Después de 2 h a temperatura ambiente, se añadió éter dietílico (~ 7 ml), se formó un residuo oleoso y se agitó sucesivamente con éter dietílico (7 ml x 2). La adición de acetona (10 ml) dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó a vacío.

Tabla 2. TLC (Rf), HPLC (Rt), espectro de masas MALDI y datos de solubilidad para compuestos 5-23

	Fórmula molecular	Rf*	Rt**	Masa exacta de MALDI MS		Solubilidad en agua
				Calculado	Encontrado [M+Na] ⁺	
5	C ₄₉ H ₇₈ N ₂ O ₁₇	0,30	10,71	966,15	989,70	+
6	C ₄₈ H ₇₆ N ₂ O ₁₆	0,38	11,60	936,52	959,69	+
7	C ₄₉ H ₇₈ N ₂ O ₁₇	0,27	11,52	922,50	923,07 ^{###}	-
8	C ₄₈ H ₇₆ N ₂ O ₁₆	0,62	16,83	1036,57	1058,15	-
9	C ₅₇ H ₈₈ N ₂ O ₁₆	0,47	14,33	1008,54	1032,09	+
10	C ₅₁ H ₈₀ N ₂ O ₁₈	0,37	13,47	1008,54	1031,99	-
11	C ₅₂ H ₈₅ N ₃ O ₁₆	0,14	7,65	1007,59	1008,60 ^{###}	+
12	C ₅₀ H ₈₀ N ₂ O ₁₇	0,38	10,86	980,55	981,55 ^{###}	±
13	C ₅₁ H ₈₀ N ₂ O ₁₉	0,58	11,55	1024,54	1025,57 ^{###}	+
14	C ₅₁ H ₈₀ N ₂ O ₁₉	0,58, 0,54	12,66, 13,22	1024,54	1025,48 ^{###}	+
15	C ₅₃ H ₈₅ N ₃ O ₁₇	0,55	7,43	1035,59	1059,16	+
16	C ₅₃ H ₈₄ N ₂ O ₂₁	0,12	9,35	1084,56	1085,48 ^{###}	±
17	C ₅₃ H ₈₃ NO ₂₂	0,22	11,54	1085,54	1109,15	±
18	C ₅₃ H ₈₃ NO ₂₂	0,22	13,98 [#]	1085,54	1109,00	±
19	C ₅₉ H ₉₃ NO ₂₇	0,16	11,64	1247,59	1271,12	±
20	C ₆₅ H ₉₅ N ₃ O ₁₇	0,63	14,35	1189,67	1212,72	-
21	C ₅₀ H ₈₀ N ₂ O ₁₇	0,14	9,78	980,55	981,58	±
22	C ₅₃ H ₈₇ N ₃ O ₁₇	0,09	7,40	1037,60	1038,54	±

	Fórmula molecular	Rf*	Rt**	Masa exacta de MALDI MS		Solubilidad en agua
				Calculado	Encontrado [M+Na] ⁺	
23	C ₅₃ H ₈₅ N ₃ O ₁₈	0,06	7,70	1051,58	1052,65	+

*TLC en las placas de Merck Silica Gel 60F254 en sistema de disolventes CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1).

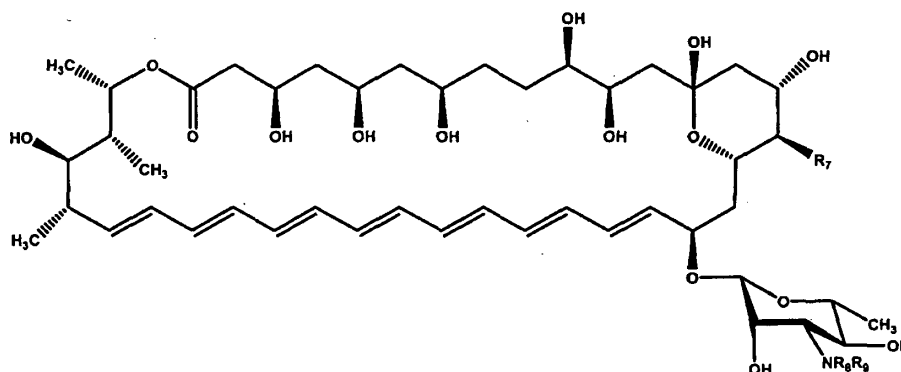
**La HPLC se llevó a cabo en un instrumento Shimadzu HPLC de la serie LC 10 en una columna Kromasil 100-C18 (4×250 mm, tamaño de partículas 6 μm) a un volumen de inyección de 20 μl y una longitud de onda de 408 nm. El sistema comprendió H₃PO₄ 0,01M a pH 2,6 y acetonitrilo. La proporción de acetonitrilo varió de 30 a 70% durante 30 min con un caudal de 1,0 ml/min.

#Sistema isocrático de HPLC – 35% de MeCN.

##[M+H]⁺

Solubilidad en agua: + solubilidad en agua, ± apenas soluble, - insoluble

También se sintetizaron los compuestos 24 a 29 siguiendo los principios sintéticos expuestos anteriormente o más abajo. Además, los siguientes compuestos adicionales se han preparado basándose en los protocolos sintéticos expuestos en las figuras 10-16 y en los esquemas allí y en la descripción que sigue.



5

Tabla 3

Nº	R ₇	R ₈ , R ₉
Derivados disustituídos de S44HP		
30	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	 (fructopiranosilo)
31	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	 (tagatopiranosilo)
32	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	CH ₂ C ₆ NMe ₂ -p, H
33	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-lisilo)
34	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glicilo)
35	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ -p, H

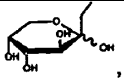
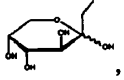
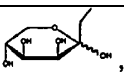
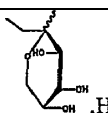
N°	R ₇	R ₈ , R ₉
Derivados disustituídos de S44HP		
36	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	 (fructopiranosilo)
37	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
38	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-Lys)
39	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glicilo)
40	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
41	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	 (fructopiranosilo)
42	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	 (tagatopiranosilo)
43	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
44	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-lisilo)
45	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glicilo)
46	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
47	COOH	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
48	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	H, H
49	CH ₃	 (fructopiranosilo)
50	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
51	CH ₃	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-lisilo)
52	CH ₃	(CH ₂) ₃ NH ₂ , (CH ₂) ₃ NH ₂
53	CH ₃	H,H - hidrocloreuro
54	CH ₃	H,H - D-glutamato
55	CH ₃	H,H - L aspartato
56	CH ₃	H,H - metilsulfonato
57	CH ₃	H,H - dicloroacetato
El compuesto 28 es la sal de glutamato del compuesto 48.		
El compuesto 47 no forma parte de la invención.		

Tabla 4. Propiedades de los derivados de S44HP y del Compuesto 1: TLC (Rf), HPLC (Rt), espectro de masas MALDI y datos de solubilidad

Compuestos nº	Fórmula molecular	Rf* (sistemas: I, II, III, IV)	Rt** (sistemas: A,B,C,D,E)	MALDI MS: Masa exacta		Solubilidad en agua
				Calculado	Encontrado [M+Na] ⁺	
Derivados disustituídos de S44HP						
30	C ₅₈ H ₉₅ N ₃ O ₂₁	0,57 (IV)	14,07 (B)	1169,65	1192,63	+
31	C ₅₈ H ₉₅ N ₃ O ₂₁	0,53 (III)	12,21 (A)	1169,65	1192,47	+
32	C ₆₁ H ₉₆ N ₄ O ₁₆	0,55 (III)	24,78 (B)	1140,68	1163,65	-
33	C ₅₈ H ₉₇ N ₅ O ₁₇	0,02 (I)	9,98 (A)	1135,69	1158,73	±
34	C ₅₆ H ₉₂ N ₄ O ₁₇	0,20 (III)	11,49 (A)	1092,65	1115,41	+
35	C ₆₀ H ₉₂ N ₄ O ₁₇	0,01 (I)	11,98 (A)	1140,68	1141,54 [#]	-
36	C ₅₆ H ₈₉ NO ₂₂	0,57 (IV)	13,22 (A)	1142,6	1165,58	±
37	C ₅₉ H ₉₀ N ₂ O ₁₇	0,53 (III)	18,25 (A)	1113,63	1136,53	-
38	C ₅₆ H ₉₂ N ₄ O ₁₈	0,02 (I)	8,50 (C)	1108,64	1109,49 [#]	+
39	C ₅₄ H ₈₇ N ₃ O ₁₈	0,47 (III)	13,10 (A)	1065,60	1070,49 ^{##}	±
40	C ₅₈ H ₈₇ N ₃ O ₁₈	(0,2) (I)	14,03 (A)	1113,63	1136,57	-
41 ***	C ₅₇ H ₉₂ N ₂ O ₂₁	0,53 (IV)	14,92 (D)	1155,63	1178,55	+
42	C ₅₇ H ₉₂ N ₂ O ₂₁	0,52 (III)	11,00 (A)	1155,63	1156,47 [#]	+
43	C ₆₀ H ₉₃ N ₃ O ₁₆	0,51 (III)	14,69 (A)	1126,67	1149,57	-
44 ***	C ₅₇ H ₉₅ N ₅ O ₁₇	0,01 (I)	9,93 (A)	1121,67	1122,49 [#]	+
45	C ₅₅ H ₉₀ N ₄ O ₁₇	0,29 (III)	11,43 (A)	1078,63	1079,41 [#]	±
46	C ₅₉ H ₉₀ N ₄ O ₁₇	0,01 (I)	12,10 (A)	1126,63	1149,56	-
Derivados monosustituídos de S44HP						
47	C ₅₅ H ₈₀ N ₂ O ₁₈	0,24 (I)	14,52 (A)	1056,54	1079,44	-
48	C ₅₁ H ₈₃ N ₃ O ₁₆	0,24 (I)	10,70 (A)	993,61	1016,58	±
Derivados monosustituídos de Comp 1						
49 ***	C ₅₃ H ₈₅ NO ₂₀	0,65 (IV)	10,20 (A)	1055,57	1060,39 ^{##}	±
50	C ₅₆ H ₈₆ N ₂ O ₁₅	0,85 (III)	25,39 (B)	1026,60	1049,49	-
51	C ₅₃ H ₈₇ N ₃ O ₁₆	0,03 (I)	13,05 (A)	1021,61	1026,50 ^{##}	±
52	C ₅₃ H ₈₉ N ₃ O ₁₅	0,02 (III)	10,07 (A)	1007,63	1008,54 [#]	±
Sales solubles en agua de Comp 1						
53	C ₄₇ H ₇₆ ClNO ₁₅	0,31 (III)	18,30 (B)	929,49	--	+
29	C ₅₂ H ₈₄ N ₂ O ₁₉	0,32 (III)	18,41 (B)	1040,57	--	+
54	C ₅₂ H ₈₄ N ₂ O ₁₉	0,31 (III)	18,40 (B)	1040,57	--	+
55	C ₅₁ H ₈₂ N ₂ O ₁₉	0,31 (III)	18,40 (B)	1026,55	--	+

56	C ₄₈ H ₇₉ NO ₁₈ S	0,32 (III)	18,36 (B)	989,50	--	+
57	C ₄₉ H ₇₇ Cl ₂ NO ₁₇	0,31 (III)	18,36 (B)	1021,46	--	+

La pureza de los análogos obtenidos para el ensayo inicial de la actividad antifúngica fue 85 - 95%.

* TLC en placas de Merck Silica Gel 60F254 en un sistema de disolventes: I - CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1), II - CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (7:1:0,01:0,01), III - CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH conc. (13:6:0,7:0,01), IV - AcOEt:n-ProOH:NH₄OH conc. (15:10:10).

** La HPLC de fase inversa analítica se llevó a cabo en un instrumento Shimadzu HPLC de la serie LC 10 en una columna Kromasil 100-C18 (4×250 mm, tamaño de partículas 6 µm) a un volumen de inyección de 20 µl y una longitud de onda 408 nm con un caudal de 1,0 ml/min. El sistema de disolventes comprendió: A - 0,2% de HCOONH₄ pH 4,5 y MeCN, la proporción de MeCN varió de 30 a 70 % durante 30 min.; B - 0,2% de HCOONH₄ pH 4,5 y MeCN: 25 → 65%, 40 min.; C - 0,2% de HCOONH₄ pH 4,5 y MeCN, 30 → 90 %, 30 min.; 90 → 90%, 10 min.; D - sistema isocrático - 35 % de MeCN.

*** Hidrocloruro. Solubilidad en agua: + solubilidad en agua, ± apenas soluble, - insoluble

[M+H]⁺ ;

[M-H₂O+Na]⁺

Síntesis de derivados de S44HP adicionales (Compuestos 30 a 48).

General

- 5 Las reacciones se monitorizaron mediante TLC en placas de Merck Silica Gel 60F254 en un sistema de disolventes: I - CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1), II - CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (7:1:0,01:0,01), III - CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH conc. (13:7:1:0,1), IV - AcOEt:n-ProOH:NH₄OH conc. (15:10:10).

- 10 La HPLC de fase inversa analítica se llevó a cabo en un instrumento de HPLC Shimadzu de la serie LC 10 en una columna Kromasil 100-C18 (4 x 250 mm, tamaño de partículas 6 µm) a un volumen de inyección de 20 µl y una longitud de onda de 408 nm con caudal de 1,0 ml/min. El sistema de disolventes comprendió: A - 0,2% de HCOONH₄ pH 4,5 y MeCN, la proporción de MeCN varió de 30 a 70% durante 30 min.; B - 0,2% de HCOONH₄ pH 4,5 y MeCN: 25 → 65%, 40 min.; C - 0,2% de HCOONH₄ pH 4,5 y MeCN, 30 → 90%, 30 min.; 90 → 90%, 10 min.; D - sistema isocrático -35% de MeCN; E - H₃PO₄ 0,01M a pH 2,6 y MeCN, 30 → 70%, 30 min. F - H₃PO₄ 0,01M a pH 2,6 y MeCN, 40 → 80%, 30 min.

Derivados de S44HP di-modificados.

- 15 N-Fructosil S44HP N,N-dimetilaminopropil amida (DMAP), -hidroxipropil amida (HP) o -N,N-dimetilaminoetil (DMAE) amida (Compuestos 30, 36, 41 respectivamente); N-tagatopironosil S44HP DMAP amida (Compuesto 31) o N-tagatopironosil S44HP DMAE amida (Compuesto 42) (Esquema 1, lado izquierdo).

1ª Etapa (amidación) - S44HP DMAP amida (Compuesto 11), HP amida (Compuesto 12) o DMAE amida (Compuesto 48).

- 20 A una mezcla de S44HP (36 mg, 0,04 mmoles) y 0,12 mmoles del hidrocloruro de amina apropiado disuelto en 0,6 ml de DMSO se añadió, en porciones Et₃N para ajustar el pH a 8-8,5, y después durante 15 minutos 0,06 mmoles de reactivo de PyBOP. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La adición subsiguiente de éter dietílico (~ 5 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (5 ml x 2). Tras la adición de 8 ml de acetona a este aceite, se formó un precipitado amarillo de amida. El precipitado se filtró, se lavó con acetona y después se secó a vacío. La amida bruta (85 - 90% de pureza mediante datos de HPLC, y que contiene sales) se purificó mediante cromatografía en columna sobre Sephadex G-25 (Farmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia). La columna se llevó a cabo usando agua. La pureza de la fracción se controló mediante HPLC, dando como resultado dianas de S44HP amida apropiada de pureza >92% mediante HPLC.

- 30 2ª Etapa (transposición de Amadori de amidas): Se añadió D-glucosa o D-galactosa (0,086 mmoles) a una disolución de S44HP amida apropiada (Compuesto 11, 12, 48) (0,040 mmoles) en DMF (2 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 20 horas. Después, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a éter dietílico (50 ml). El precipitado resultante se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó. El compuesto bruto (85 - 90% de pureza mediante datos de HPLC, y que contiene sales) se purificó mediante cromatografía en columna sobre Sephadex G-25 (Farmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia). La columna se llevó a cabo usando agua. La pureza de la fracción se controló mediante TLC, sistema IV. Las fracciones que contienen el compuesto deseado se

recogieron, y la disolución se concentró. La adición de acetona dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con acetona y se secó *a vacío*. El compuesto 41 se obtuvo como hidrocloreto. A la disolución del Compuesto 41 en metanol HCl 0,1N en metanol hasta pH ~4. La adición de éter dietílico dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó *a vacío*. La pureza del derivado N-alquílico de S44HP amida fue >92%. En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para estos compuestos (30, 36, 41, 31, 42).

N-(4-N,N-Di-metilaminobencil) S44HP DMAP amida, -HP amida o -DMAE amida (Compuesto 32, 37, 43, respectivamente) (Esquema 1 (fig. 10), lado derecho).

1ª Etapa (amidación). S44HP DMAP amida (Compuesto 11), HP amida (Compuesto 12) o DMAE amida (Compuesto 48) se obtuvieron como se describe anteriormente para el Compuesto 30 (1ª Etapa).

2ª Etapa (N-alquilación reductiva de amidas). La disolución de 4-N,N-dimetilaminobenzaldehído (0,065 mmoles) y S44HP amida apropiada (Compuesto 11, 12 ó 48) (0,022 mmoles) en DMF (2 ml) se mantuvo a 37°C durante 2 h, y después se añadió NaBH₃CN (4,1 mg, 0,065 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 20 h. La adición de éter dietílico (10 ml) condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (10 ml x 2). Se formó un precipitado amarillo tras la adición de acetona (10 ml). El precipitado se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó. El compuesto bruto que contiene sales se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice Merck usando el sistema CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1). La pureza de la fracción se controló mediante TLC, sistema I. Se recogieron las fracciones que contienen el compuesto deseado, y la disolución se concentró. La adición de acetona dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con acetona y se secó *a vacío*. La pureza del derivado N-alquílico de la S44HP amida apropiada fue >92%. En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para estos compuestos.

N-(N,N-dimetilglicil) S44HP DMAE amida, -HP amida o -DMAP amida (Compuesto 39, 45, 34 respectivamente) (N-aminoacilación de amidas, Esquema 2 (Fig. 11, lado izquierdo).

A una mezcla de N,N-dimetilglicina (0,04 mmoles) y S44HP DMAE amida (Compuesto 48), -HP amida (Compuesto 12) o -DMAP amida (Compuesto 11) (véase Esquema 1) (0,02 mmoles) apropiada en 0,5 ml de DMSO se añadió Et₃N para ajustar el pH a 8, y después 0,03 mmoles de reactivo de PyBOP en porciones durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La adición subsiguiente de éter dietílico (~3 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (3 ml x 2). Tras la adición de 5 ml de acetona a este aceite, se formó un precipitado amarillo de amida. El precipitado se filtró, se lavó con acetona y después se secó *a vacío* produciendo N-(N,N-dimetilglicil) S44HP DMAE amida, -HP amida o -DMAP amida (Compuesto 39, 45, 34). En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para estos compuestos.

N-(N-L-Lisil) S44HP HP amida y -DMAE amida (Compuesto 38 y 44, respectivamente) (Esquema 2, lado derecho).

1ª Etapa: (N-[N-Fmoc-amino]acilación) - N-(N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP. A la disolución enfriada hasta ~+5°C de N^α,N^ε-di-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-lisina (180 mg, 0,33 mmoles), N-hidroxibenzotriazol (54 mg, 0,4 mmoles) en DMF seca (1,2 ml) se añadió DCC (62 mg, 0,3 mmoles), y la mezcla de reacción se agitó a ~+5°C durante 1 h. El residuo de DCU se separó por filtración, y el eluato obtenido se añadió a S44HP (184 mg, 0,2 mmoles) en DMF (1,0 ml). Después, a la mezcla de reacción se añadió (*i*-Pro)₂EtN (0,1 ml, 0,81 mmoles) gota a gota durante 10 min. con agitación. La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante 2 h bajo control de TLC en el sistema: CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (6:1:0,01:0,02), y después se añadieron 20 ml de éter etílico. El precipitado obtenido se separó por filtración, se lavó mediante la mezcla de éter etílico:acetona (1:1, 10 ml x 3) y se secó *a vacío* produciendo 202 mg de polvo amarillo. El compuesto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice Merck. La columna se llevó a cabo usando el sistema: CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (9:1:0,01:0,02 → 7:1:0,01:0,02). La pureza de la fracción se controló mediante TLC en el sistema II. Se recogieron las fracciones que contienen el compuesto deseado, y la disolución se concentró. La adición de acetona dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con acetona y se secó *a vacío*, produciendo 60 mg de N-[N^α,N^ε-di-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-lisil] S44HP pura (>96%, HPLC, Rt = 22,80, sistema B). Espectro de masas MALDI. Encontrado: 1500,542 [M-H₂O+Na]⁺. Calculado para C₈₃H₁₀₅N₃O₂₂ 1495,72 (masa exacta).

2ª Etapa (amidación de N-(N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP - N-(N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP HP amida o -DMAE amida:

A una mezcla de N-(N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP (0,02 mmoles) y 0,06 mmoles de hidrocloreto de 3-hidroxipropilamina o dihidrocloreto de 4-(N,N-dimetilamino)propilamina disuelto en 0,3 ml de DMSO se añadió, en porciones, Et₃N para ajustar el pH a 7-7,5, y después, durante 15 minutos, 0,03 mmoles de reactivo de PyBOP. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora bajo control de TLC en el sistema CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH conc. (5:1:0,01:0,01). La adición subsiguiente de éter dietílico (~3 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (3 ml x 2). Tras la adición de 5 ml de acetona a este aceite, se formó un precipitado amarillo de amida. El precipitado se filtró, se lavó con acetona y después se secó *a vacío* produciendo la N-(N^α, N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP HP-amida o (N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP -DMAE amida apropiada con una pureza de ~90%, mediante los datos de HPLC: Rt = 21,43 (C) y 20,39 (B),

respectivamente. Datos de TLC: $R_f = 0,47$ y $R_f = 0,43$, respectivamente, en el sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$ conc. (5:1:0,01:0,01).

3ª Etapa (eliminación de Fmoc). La N-(N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP amida apropiada (30 mg) se disolvió en DMSO (3 ml), y se añadió piperidina (0,1 ml). Después de 2 h a temperatura ambiente, se añadió éter dietílico (~7 ml), se formó un residuo oleoso, y se agitó sucesivamente con éter dietílico (7 ml x 2). La adición de acetona (10 ml) dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó *a vacío*. El Compuesto 44 se obtuvo como hidrocloreuro. A la disolución de Compuesto 44 en metanol se añadió HCl 0,1N en metanol hasta pH ~4. La adición de éter dietílico dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó *a vacío*. En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para estos compuestos.

N-(4-Aminometilbenzoil) S44HP DMAP amida, -HP amida, -DMAE amida (Compuesto 35, 40, 46 respectivamente) (Esquema 3, fig. 12, lado izquierdo).

1ª Etapa (N-[4-Fmoc-aminometil]benzoilación) - N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP: Los derivados se obtuvieron en las mismas condiciones que para el Compuesto 38 (1ª Etapa). A una disolución de ácido 4-N-Fmoc-aminometilbenzoico (80 mg, 0,022 mmoles) y S44HP (100 mg, 0,11 mmoles) en DMSO (3 ml) se añadió Et₃N para ajustar el pH a 7, y PyBOP (90 mg, 0,165 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo a r.t. durante 20 h, y después se añadió gota a gota a éter dietílico (200 ml). El precipitado amarillo se separó por filtración y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice Merck para cromatografía en columna (0,040 – 0,063 mm) en el sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HCOOH}$ (3:1:0,01) para producir N-(4-N-Fmoc-aminometil)benzoil S44HP (Compuesto 47) con una pureza de ~95%, mediante los datos de HPLC ($R_t = 18,18$, sistema B). TLC ($R_f = 0,61$, I)

2ª Etapa (Amidación de N-[4-Fmoc-aminometil]benzoil S44HP) - N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP DMAP amida, -HP amida, o -DMAE amida.

Los derivados se obtuvieron en las mismas condiciones que para el Compuesto 38 (2ª Etapa), partiendo de N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP y la DMAP-, HP- o DMAE amina apropiada, y usando reactivo de PyBOP. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h. La pureza fue ~ 85 - 93%, mediante los datos de HPLC: N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP DMAP amida ($R_t = 15,88$, B; $R_f = 0,25$, I), N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP HP amida (Compuesto 12) ($R_t = 17,14$, B; $R_f = 0,60$, I), o N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP DMAE amida ($R_t = 15,95$, B; $R_f = 0,24$, I),

3ª Etapa (eliminación de Fmoc). Los derivados se obtuvieron en las mismas condiciones que para el Compuesto 38 (3ª Etapa), partiendo de N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP DMAP amida, -HP amida o -DMAE amida. En la Tabla 2, más abajo, se resumen los datos analíticos para estos tres compuestos.

N-L-lisil S44HP DMAP-amida (Compuesto 33) (Esquema 3, lado derecho).

1ª Etapa (Amidación) - S44HP DMAP-amida (Compuesto 11): La S44HP DMAP amida se obtuvo de la misma forma que para el Compuesto 33 (Esquema 1, lado izquierdo). La pureza fue ~90% (HPLC).

2ª Etapa (N-[N-Fmoc-amino]acilación de DMAP amida) - N-(N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP DMAP-amida: A una disolución de S44HP DMAP amida (0,02 mmoles) en DMSO (0,5 ml) se añadieron N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisina (0,04 mmoles) y Et₃N (pH 7-7,5), y después, durante 15 minutos, 0,03 mmoles de reactivo de PyBOP. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La adición subsiguiente de éter dietílico (~3 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (3 ml x 2). Tras la adición de 5 ml de acetona a este aceite, se formó un precipitado amarillo de amida. El precipitado se filtró, se lavó con acetona y después se secó *a vacío* produciendo N-(N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) S44HP DMAP amida con una pureza de ~95%, mediante los datos de HPLC ($R_t = 22,01$, sistema B).

3ª Etapa (eliminación de Fmoc). Los derivados se obtuvieron en las mismas condiciones que para el Compuesto 38 (3ª Etapa), partiendo de N-(N^α,N^ε-di-Fmoc-L-lisil) DMAP amida. En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para estos dos compuestos.

Derivados de S44HP mono-modificados

N-(4-Aminometilbenzoil) S44HP (Compuesto 47) (véase el Esquema 4, Fig. 13, eliminación de Fmoc) se obtuvo en las mismas condiciones que para el Compuesto 38 (3ª Etapa), partiendo de N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP (obtenida según el Esquema 3, 1ª Etapa). En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para estos dos compuestos.

N,N-dimetilaminoetil (DMAE) S44HP amida (Compuesto 48) (método alternativo, Esquema 5, fig. 14).

1ª Etapa (introducción de Fmoc). N-Fmoc-S44HP. A una disolución agitada de 500 mg (0,5 mmoles) de S44HP bruta en 6 ml de DMF:MeOH (5:1) se añadieron en porciones 0,057 ml (0,65 mmoles) de piridina y 360 mg (1,0 mmoles) de FmocOSu. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La adición subsiguiente de éter dietílico (20 ml) a la mezcla de reacción condujo a un precipitado amarillo de N-Fmoc-S44HP. El precipitado se filtró

y se lavó con éter dietílico y se secó. La N-Fmoc-S44HP bruta se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice Merck en el sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (13:6:1:0,05) para producir ~30% de N-Fmoc-S44HP con una pureza de 94% mediante HPLC ($R_t = 20,49$, sistema: H_3PO_4 0,01M a pH 2,6 y MeCN, 40 → 80%, 30 min. TLC 0,39 (III)).

5 2ª Etapa (Amidación) N-Fmoc-S44HP DMAE amida. A una disolución agitada de 115 mg (0,10 mmoles) de N-Fmoc-S44HP en 2 ml de DMSO se añadieron 37 mg (0,30 mmoles) de hidrocloreto de N,N-dimetilaminoetilamina y Et_3N para ajustar el pH a 7-7,5, y se añadieron en porciones 78 mg (0,15 mmoles) de PyBOP; el pH de mezcla de reacción se mantuvo a 7-7,5 añadiendo Et_3N . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La adición subsiguiente de éter dietílico (5 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (5 ml). La adición de acetona (10 ml) condujo al precipitado amarillo, que se separó por filtración, se lavó con acetona y se secó para dar N-Fmoc-S44HP DMAE amida con una pureza de ~92%, mediante los datos de HPLC ($R_t = 14,50$, sistema A).

15 3ª Etapa (eliminación de Fmoc). El derivado - (Compuesto 48) se obtuvo en las mismas condiciones que para el Compuesto 38 (3ª Etapa), partiendo de N-Fmoc-S44HP DMAE amida. En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para este compuesto.

Compuesto 1 puro: purificación del Compuesto 1, partiendo de la muestra del Compuesto 1 bruto (Esquema 6, Fig. 15).

1ª Etapa (introducción de Fmoc y purificación).

20 N-Fmoc-Compuesto 1. A una disolución agitada de 2000 mg (2,0 mmoles) de Compuesto 1 bruto (que contiene compuesto 1- 81,5%, S44HP- 8,27% y una impureza desconocida ~10% mediante los datos de HPLC, sistema B) en 40 ml DMSO se añadió Et_3N para ajustar el pH a 7-7,5, y se añadieron en porciones 1400 mg (4,0 mmoles) de FmocOSu; el pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 7-7,5 añadiendo Et_3N . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La adición subsiguiente de éter dietílico (200 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (150 ml x 3). Tras la adición de 50 ml de acetona a este residuo, se añadió éter dietílico (50 ml) para dar un precipitado amarillo. El precipitado se filtró y se lavó con éter dietílico y se secó a vacío produciendo 2200 mg de N-Fmoc-compuesto 1 bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice Merck en el sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (13:6:1:0,05) para producir 650 mg (~30%) de N-Fmoc-compuesto 1 con una pureza de 86% mediante HPLC ($R_t = 18,44$, sistema C).

2ª Etapa (eliminación de Fmoc).

30 Fmoc-compuesto 1 (400 mg) se disolvió en DMSO (60 ml), y se añadió piperidina (0,2 ml) a 15°C. Después de 2 h a 15°C, se añadió éter dietílico (~50 ml); se formó un residuo oleoso, y se agitó sucesivamente con éter dietílico (50 ml x 3). La adición de acetona (10 ml) y éter dietílico (20 ml) dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó a vacío produciendo 300 mg de compuesto 1 puro. La porción de compuesto 1 puro para HPLC se obtuvo como hidrocloreto. A la disolución de compuesto 1 (base) en metanol se añadió HCl 0,1N en metanol hasta pH ~4. La adición de éter dietílico dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó a vacío con una pureza de 92,1%, mediante los datos de HPLC (hidrocloreto, $R_t = 11,37$, sistema A).

Derivados mono-modificados de Compuesto 1. (Esquema 7, fig. 16). N-Fructopiranosil-Compuesto 1 (Compuesto 49) (transposición de Amadori):

40 Se añadió D-glucosa (0,086 mmoles) a una disolución de compuesto 1 (0,040 mmoles) en DMF (2 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 20 horas. Después, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a éter dietílico (50 ml). El precipitado resultante se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó. El compuesto bruto (85 - 90% de pureza mediante datos de HPLC, y que contiene sales) se purificó mediante cromatografía en columna sobre Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia). La columna se llevó a cabo usando agua. La pureza de la fracción se controló mediante TLC, sistema IV. Se recogieron las fracciones que contienen el compuesto deseado, y la disolución se concentró. La adición de acetona dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con acetona y se secó a vacío. El Compuesto 41 se obtuvo como hidrocloreto. A la disolución de Compuesto 49 en metanol se añadió HCl 0,1N en metanol hasta pH ~4. La adición de éter dietílico dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó a vacío. En la Tabla 2, más abajo, se resumen los datos analíticos para N-Fructopiranosil-Compuesto 1 (Compuesto 49).

N-(4-N,N-Di-metilaminobencil) Compuesto 1 (Compuesto 50) (N-alkilación reductora).

55 La disolución de 4-N,N-dimetilaminobenzaldehído (0,065 mmoles) y Compuesto 1 (0,022 mmoles) en DMF (2 ml) se mantuvo a 37°C durante 2 h, y después se añadió NaBH_3CN (4,1 mg, 0,065 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 20 h. La adición de éter dietílico (10 ml) condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (10 ml x 2). Se formó un precipitado amarillo tras la adición de acetona (10 ml). El precipitado se separó por filtración, se lavó con éter dietílico, y se secó. El compuesto bruto que contiene sales se

purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice Merck usando el sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (13:6:1:0,1). La pureza de la fracción se controló mediante TLC, sistema I. Se recogieron las fracciones que contienen el compuesto deseado, y la disolución se concentró. La adición de acetona dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con acetona, y se secó *a vacío*. En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para N-(4-N,N-di-metilaminobencil) Compuesto 1 (Compuesto 50).

N-L-Lisil-Compuesto 1 (Compuesto 51)

1ª Etapa (N-[N-Fmoc-amino]acilación). Una disolución de Compuesto 1 (50 mg, 0,055 mmoles) en DMF seca (1 ml) se enfrió a 10°C, y después se añadieron Et_3N (7,5 μl , 0,055 mmoles) y éster N-oxisuccinimídico de $\text{N}^\alpha,\text{N}^\epsilon$ -di-Fmoc-L-lisina (57 mg, 0,083 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 1 hora. La corriente de la reacción se controló mediante TLC en un sistema de disolventes $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (6:1). La adición de éter dietílico (~5 ml) a la mezcla de reacción condujo a un precipitado amarillo, que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico, se secó *a vacío*, y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (sistema $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ con gradiente de MeOH 0 $\rightarrow$ 10%). Las fracciones que contienen el compuesto deseado se recogieron, la disolución se concentró, y la adición de éter dietílico dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico, y se secó *a vacío*. TLC: $R_f = 0,6$ ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ 6:1). HPLC: $R_t = 13,08$ (0,2% de HCOONH_4 pH 4,5 y MeCN: 75 $\rightarrow$ 90%, 20 min., 90 $\rightarrow$ 90%, 10 min).

2ª Etapa (eliminación de Fmoc).

Al sólido amarillo aislado (22 mg, 0,015 mmoles) en DMSO/MeOH 10:1 (1 ml) se añadió piperidina (4,5 μl , 0,045 mmoles). Después de 30 min. de agitación a temperatura ambiente, se añadió éter dietílico (~3 ml); se formó un residuo oleoso y se agitó sucesivamente con éter dietílico (3 ml x 2). La adición de acetona (2 ml) dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico, y se secó *a vacío*. En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para N-L-Lisil-Compuesto 1 (Compuesto 51).

N,N-Di-(3-aminopropil)-compuesto 1 (Compuesto 52)

1ª Etapa (N-alkilación reductora) A una disolución de N-Fmoc-3-aminopropionaldehído (160 mg, 0,054 mmoles) y Compuesto 1 (100 mg, 0,011 mmoles) en DMF (3 ml) se añadió NaBH_3CN (34 mg, 0,054 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 20 horas, y después se añadió gota a gota a éter dietílico (200 ml). El precipitado amarillo se separó por filtración y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice Merck para cromatografía en columna (0,040 – 0,063 mm) en un sistema de gradiente lineal $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HCOOH}$ (3:1:0,01) $\rightarrow$ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (13:6:1:0,1) para producir el precipitado amarillo de N,N-Di-(N-Fmoc-3-aminopropil) Compuesto 1. Datos de HPLC: $R_t = 27,43$ (C).

2ª Etapa (eliminación de Fmoc).

A una disolución de N,N-di-[3-(N-Fmoc)-aminopropil]-S44HP en DMSO (3 ml), se añadió piperidina (0,1 ml). Después de 2 h a temperatura ambiente, se añadió éter dietílico (~7 ml), y se formó un residuo oleoso que se agitó sucesivamente con éter dietílico (7 ml x 2). La adición de acetona (10 ml) dio un precipitado amarillo que se separó por filtración, se lavó con éter dietílico, y se secó *a vacío*. En la Tabla 4 anterior se resumen los datos analíticos para N,N-Di-(3-aminopropil) Compuesto 1 (Compuesto 52).

Salas de Compuesto 1

L-aspartato (55), L-glutamato (29), D-glutamato (54) de Compuesto 1

Se disolvió Compuesto 1 (13 mg, 0,015 mmoles) en 0,2 ml de DMSO, y después se añadió la disolución del aminoácido correspondiente (0,015 mmoles) en 0,1 ml agua. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. La adición de éter dietílico (~2 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (2 ml x 2). Tras la adición de 3 ml de acetona a este aceite, se formó un precipitado amarillo de sal. El precipitado se filtró, se lavó con acetona y después se secó *a vacío*.

Metilsulfonato (56), dicloroacetato (57)

Se disolvió el ácido correspondiente (0,015 mmoles) en 0,1 ml de DMSO, y después se añadió a la disolución Compuesto 1 (13 mg, 0,015 mmoles) en 0,1 ml de DMSO. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. La adición de éter dietílico (~2 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente con éter dietílico (2 ml x 2). Tras la adición de 3 ml de acetona a este aceite, se formó un precipitado amarillo de sal. El precipitado se filtró, se lavó con acetona y después se secó *a vacío*.

Hidrocloreuro de Compuesto 1 (53)

A la disolución de Compuesto 1 (13 mg, 0,015 mmoles) en 0,2 ml de DMSO se añadieron 0,15 ml (0,015 mmoles) de disolución acuosa 0,1N de HCl. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. La adición de éter dietílico (~2 ml) a la mezcla de reacción condujo a un residuo oleoso, que se agitó sucesivamente

con éter dietílico (2 ml x 2). Tras la adición de 3 ml de acetona a este aceite, se formó un precipitado amarillo de sal. El precipitado se filtró, se lavó con acetona y después se secó a vacío.

Todas las muestras se obtuvieron con rendimientos de alrededor de 90% y fueron solubles en agua.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y TOXICIDAD

5 Estudio de susceptibilidad fúngica (1)

Los ensayos de susceptibilidad antifúngica de levaduras y hongos filamentosos (mohos) se determinaron usando el método de microdilución de caldo descrito en los documentos de NCCLS M27-A [Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, ISBN 1-56238-328-0, Pensilvania, 1997] y M38-A [Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard, ISBN 1-56238-470-8, Pensilvania, 2002], en consecuencia.

Medio y tampón. En el estudio se usó el medio RPMI 1640 con L-glutamina y rojo fenol, sin bicarbonato de sodio, suplementado con 0,2% de glucosa (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA), tamponado con ácido morfolinopropanosulfónico 0,165M (MOPS; ACROS ORGANICS, Nueva Jersey, USA), pH 7,0.

Agentes antifúngicos. Los compuestos se solubilizaron inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de partida de 1600 µg/ml. Se prepararon series de diluciones (1600 hasta 3,13 µg/ml) a partir de disoluciones madre en el mismo disolvente. Después, estas disoluciones de DMSO se diluyeron 50 veces (primero 10 veces, y después 5 veces) en el medio de ensayo. Finalmente, se diluyeron 2 veces cuando se inocularon, lo que redujo la concentración final de disolvente hasta 1% (las concentraciones finales de agentes antifúngicos fueron 16 hasta 0,13 µg/ml). Las disoluciones se prepararon justo antes del uso.

Organismos. Los organismos usados para el ensayo de susceptibilidad fueron: *Candida albicans* ATCC 14053, *Cryptococcus humicolus* ATCC 9949, *Aspergillus niger* ATCC 16404 y *Fusarium oxysporum* VKM F-140 (= CMI, IMI 90473). Los organismos se almacenaron en cultivos inclinados de agar con dextrosa de patata y en disolución de glicerol al 50% a -70°C. Para el almacenamiento a corto plazo, los cultivos madre se almacenaron en cultivos inclinados de agar a 4°C. Los cultivos de levaduras se subcultivaron sobre agar con dextrosa de Sabouraud (SAB), y se incubaron durante 24 horas a 35°C (*Candida albicans*) o durante 48 horas a 25°C (*Cryptococcus humicolus*) para obtener un cultivo puro que se hizo crecer recientemente. Los cultivos de los mohos se subcultivaron sobre agar con dextrosa de patata y se incubaron durante 7 días a 35°C (*Aspergillus niger*) o durante 2 días a 35°C y después 5 días a 25°C (*Fusarium oxysporum*), para asegurar la máxima esporulación.

Preparación del inóculo.

Para levaduras, el inóculo de partida se preparó suspendiendo colonias de cultivos en disolución salina estéril al 0,85%. La suspensión resultante se sometió a vórtice y se ajustó con un espectrofotómetro a 530 nm, para igualar la turbidez de 0,5 McFarland (1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ CFU/ml). La suspensión madre de levadura se diluyó 1:1000 con medio, para obtener dos veces el inóculo de ensayo (1 x 10³ a 5 x 10³ CFU/ml).

Para los mohos, las suspensiones madre se prepararon cubriendo las colonias fúngicas maduras con disolución salina estéril al 0,85% y raspando suavemente. Se añadió 1% (v/v) del agente humectante Tween 20 a la disolución salina para la preparación de *Aspergillus inoculum*. Finalmente, las suspensiones se sometieron a vórtice durante 15 s para romper los grumos de células y después se filtraron a través de cuatro capas de gasa estéril. Las densidades de las suspensiones de esporas de conidios se midió a 530 nm y se ajustó a 0,09-0,11 para *Aspergillus niger* y 0,15-0,17 para *Fusarium oxysporum*. Estas suspensiones se diluyeron 1:50 con el medio estándar. Las diluciones 1:50 del inóculo correspondieron a 2X de la densidad necesaria de aproximadamente 0,4 x 10⁴ a 5 x 10⁴ CFU/ml.

La cuantificación del inóculo se realizó colocando en placas la dilución del inóculo sobre agar con dextrosa de Sabouraud, para determinar el número viable de CFU por mililitro.

Técnica de microdilución.

Para el ensayo, se usaron placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos estériles. Se dispensaron 100 µl de inóculos diluidos en cada pocillo de microdilución que contiene 100 µl de las diluciones dobles de los compuestos. Se incluyeron controles libres de fármaco y libres de levaduras/mohos. Las bandejas de microdilución se incubaron a 35°C (*Candida albicans* y mohos) o a 25°C (*Cryptococcus humicolus*) sin agitación, y se observaron para determinar la presencia o ausencia de crecimiento visible. Se dio a cada pocillo una puntuación numérica de 0 a 4, usando la siguiente escala: 0 = ópticamente transparente o ausencia de crecimiento, 1 = ligero crecimiento (25% de control de crecimiento), 2 = reducción prominente en el crecimiento (50% de control de crecimiento), 3 = ligera reducción en el crecimiento (75% de control de crecimiento), 4 = ninguna reducción en el crecimiento. Las concentraciones inhibitoras mínimas (MICs) se leyeron a 48 horas.

Las MICs para cada uno de los compuestos ensayados se definieron como la concentración más baja de agentes antifúngicos que previene cualquier crecimiento visible del organismo (puntuación de crecimiento = 0). Para elucidar

las ligeras diferencias entre agentes, en algunos casos las MICs para los mohos se definieron adicionalmente como las concentraciones más bajas con una puntuación de crecimiento = 1 (25% de control de crecimiento). Los resultados se muestran en la Tabla 5 más abajo.

Tabla 5. Actividad antifúngica de los compuestos

Compuesto	MIC µg/ml*			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	<i>Cryptococcus</i> <i>humicola</i> ATCC 9949	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Fusarium oxysporum</i> VKM F-140
AmB	1	1	1	4
S44HP	1	1	1	4
1	1	1	1	2
5	2	4	4	4
6	2	2	4	4
7	2	1	2	8
8	2	2	4	8
9	1	1	2	4
10	2	2	4	8
11	1	1	2	2
12	1	1	2	2
13	1	1	1	4
14	1	1	2	4
15	1	2	2	4
16	1	1	2	8
17	1	1	2	8
18	1	1	2	8
19	2	2	2	8
20	2	2	4	>16
21	2	4	4	4
22	1	1	1	1
23	4	4	8	8
* Las MICs se miden como las concentraciones más bajas de agentes que previenen cualquier crecimiento visible. Los resultados de los experimentos fueron reproducibles. En los casos de total coincidencia de los datos obtenidos, la MIC se representa como un único número.				

5

Los resultados muestran que los compuestos de la invención tienen actividad antifúngica. Más específicamente, estos ensayos sugieren que un número de derivados de nistatina tienen actividad antifúngica comparable a anfotericina B y a S44HP (por ejemplo los compuestos n^{os} 1, 9, 11, 12, 13, 14 y 22).

Estudio de susceptibilidad antifúngica (2)

10

Se investigó adicionalmente la actividad antifúngica de varios de los derivados de nistatina. El método usado en el estudio (1) es el método aceptado internacionalmente para ensayar la actividad antifúngica, pero no es muy

sensible, de manera que no distingue fácilmente entre compuestos de actividad comparable. La actividad antifúngica de un número de los derivados de nistatina se determinó por lo tanto en un método que se diseñó para que fuese más sensible.

El organismo de ensayo usado para el ensayo adicional de la bioactividad de macrólidos poliénicos fue *Candida albicans* ATCC 10231, que se hizo crecer en 120 µl de medio M 19 estándar sin NaCl (con un inóculo de 1000 cfu por pocillo) y 30 µl de muestras de macrólidos poliénicos diluidas. Los antibióticos se diluyeron en MeOH en serie, asegurando un espectro de concentraciones que produjo resultados que oscilan desde una inhibición total del crecimiento hasta ninguna inhibición del organismo de ensayo. Los cultivos del organismo de ensayo con diluciones de los antibióticos se incubaron en placas de microtitulación de 96 pocillos a 30°C sin agitación, y el crecimiento se midió como OD₄₉₀ después de 12, 14 y 16 horas en un lector de placas de microtitulación SpectraMax Plus. La OD se representó gráficamente frente a la concentración de antibiótico, y MIC₅₀ se estimó a partir de la curva de regresión a una inhibición del crecimiento del 50%.

Los resultados se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Compuesto	MIC ₅₀ (µg/ml)
AmB	0,12
S44HP	0,12
1	0,07
9	0,13
11	0,12
12	0,14
15	0,20
22	0,07

Los resultados confirman que un número de análogos de nistatina de la invención tienen realmente actividad antifúngica mejorada en comparación tanto con anfotericina B como con S44HP.

Actividades antifúngicas de sales del Compuesto 1 (Tabla 7)

Se ensayaron las siguientes sales solubles en agua

hidrocloruro del COMPUESTO 1 (53)

L-glutamato del COMPUESTO 1 (29),

D-glutamato del COMPUESTO 1 (54)

L-aspartato del COMPUESTO 1 (55),

dicloroacetato del COMPUESTO 1 (57)

Tabla 7

Organismo	Compuesto nº / MIC (µg/ml)						
	55	29	53	54	57	1	S44HP
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	2	1	2	2	2	1	1
<i>Cryptococcus humicolus</i> ATCC 9949	2	1	2	2	2	1	1
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	2	2	4	2	2	2	1
<i>Fusarium oxysporum</i> VKM F-140	2	2	4	2	2	2	4

L-glutamato del COMPUESTO 1 (29) es la sal más activa del Compuesto 1.

Actividades antifúngicas de derivados del Compuesto (Tablas 8 y 9)

Tabla 8

Comp. 50	p-Dimetilaminobencilo- Compuesto 1
Comp. 51	N-(L-Lisil)- Compuesto 1

Organismo	MIC (µg/ml)		
	Comp. 50	Comp. 51	Comp. 1
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	2	1	1
<i>Cryptococcus humicolus</i> ATCC 9949	2	1	1
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	2	1	2
<i>Fusarium oxysporum</i> VKM F- 140	8	2	2

- 5 El Compuesto 51 es el derivado más activo en esta serie, con una actividad antifúngica ligeramente mayor que el antibiótico progenitor.

Tabla 9

Organismo	Compuesto nº / MIC (µg/ml)																			
	32	37	43	30	36	41	39	45	34	38	44	35	40	46	47	33	48	31	42	S44 HP
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	2	2	1	1	4	0,5	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	0,5	1	0,5	1
<i>Cryptococcus humicolus</i> ATCC 9949	2	1	1	1	4	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	0,5	2	1	1
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	2	2	1	1	4	1	2	1	1	2	2	4	4	2	4	1	1	2	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i> VKM F-140	8	4	4	4	16	2	16	4	4	4	4	4	16	4	16	2	1	4	2	4

Estudio de toxicidad *in vitro*

La toxicidad de diversos derivados de nistatina se ensayó a 2 y 5 µg/ml, y a 25 µM.

Los compuestos se disolvieron en DMSO a 5 mg/ml, y se prepararon muestras de 0,1 ml con diferentes concentraciones en DMSO. Las muestras se mezclaron con 0,9 ml de tampón PBS que contiene 2,5% de sangre de caballo (PBS-HB; mantenido en hielo), y se incubaron a 37°C durante 30 min. sin agitación.

Las células se peletizaron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min., y la hemólisis se evaluó midiendo OD₅₄₅. El 100% de hemólisis se definió como el valor de OD₅₄₅ obtenido a partir de una suspensión de 2,5% de sangre de caballo en agua destilada.

Los resultados se muestran en las Tablas 10-12 a continuación.

Tabla 10. Hemólisis de eritrocitos de sangre humana (M ± SE, %) bajo la acción de 2 y 5 µg/ml de antibióticos.

Muestra de sangre nº	Conc. µg/ml	Amp B	S44HP	13	14	16	DMSO
1	5	30	34,6	15,5	4,8	3,1	2,2
2		29,5	39,7	14	4,5	2,9	1,7
3		31,5	50,4	14,2	5,3	3,4	1,4
MEDIA ± SE		30,3 ± 0,6	41,6 ± 4,6	14,5 ± 0,5	4,9 ± 0,2	3,1 ± 0,14	1,7 ± 0,2
1	2	4,4	12,3	3,3	2,7	2,3	
2		5,9	6,4	3,0	2,5	2,2	
3		8,0	7,5	4,9	2,5	2,6	
MEDIA ± SE		6,1 ± 1,0	8,7 ± 1,8	3,7 ± 0,6	2,5 ± 0,07	2,4 ± 0,12	

Tabla 11. Hemólisis de eritrocitos (M ± SEM, %) bajo la acción de 5 µg/ml de antibióticos.

Muestra de sangre nº	Amp B	S44HP (92%)	7	15	11	12	DMSO
1	39	73	5,8	2,8	3	5	1,4
2	38	64	5,0	2,4	3,4	4,3	2,2
3	42	56	5,0	2,7	3,3	4,0	1,5
Media ± SE	39,7 ± 1,2	64,3 ± 4,9	5,2 ± 0,2	2,6 ± 0,1	3,2 ± 0,1	4,4 ± 0,3	1,7 ± 0,25

Tabla 12. Hemólisis de eritrocitos (M ± SEM, %) bajo la acción de 25 µM de antibióticos.

Muestra de sangre nº	5	6	7	9	17	18
	2	2	0,9			
	1,8	2,4				
	2,1	3,3	1,9		4,8	5,3
	1,0	7	1,9	12,2		
	1	3,7	1,7	18,0	1,7	3,0
	1,9	4,3	1,3	16,7	1,7	3,2

Muestra de sangre n°	5	6	7	9	17	18
			1,9	22,4	2,1	9,7
	1,3	3,2	1,0	25	0,8	1,0
				16,2	3,3	1,5
Media $\pm$ S.E.M.	1,6 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,17	18,4 $\pm$ 1,9	2,4 $\pm$ 0,6	3,9 $\pm$ 1,3
N	7	7	7	6	6	6
P	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05

Estos resultados muestran que los compuestos de la invención son significativamente menos tóxicos que S44HP o anfotericina B. Esto es muy ventajoso puesto que los compuestos de la invención se pueden usar por lo tanto en mayores cantidades sin ningún efecto adverso.

5 ENSAYO IN VIVO DE COMPUESTOS 1 Y 11 Y OTROS

Animales. Se usaron ratones macho de híbridos de primera generación (C57B1/6xDBA/2)F1 B6D2F1, 20-22 g de peso, recibidos de la granja central "Kryukovo" de Academias Rusas de Ciencia Médica (RAMS). Los animales se mantuvieron en un vivero en jaulas de plástico (con un lecho de madera dura en condiciones medioambientalmente controladas: $24 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas) en una dieta estándar de comida en briquetas con un acceso fácil a agua de beber (*ad libitum*). Después de un período de cuarentena de 2 semanas, los animales sanos se usaron en el trabajo experimental.

Agente infeccioso. Se usó *Candida albicans* (cepa 14053 ATCC).

Agentes antifúngicos. Se prepararon extemporáneamente disoluciones de los compuestos 1 y 11 (y otros), y se mantuvieron en viales de vidrio oscuros para evitar la entrada de luz. Las disoluciones se prepararon según lo siguiente: se mezclaron sustancias antibióticas secas (5 mg) con desoxicolato de sodio seco (4,1 mg) en un vial de vidrio estéril. Se añadieron 10 ml de tampón de fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 1,59 \text{ g}$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 0,96 \text{ g}$; H_2O - hasta 100 ml) a la mezcla, y la suspensión se sometió inmediatamente a agitación vigorosa durante 10 minutos hasta que se formaron suspensiones homogéneas. Las suspensiones obtenidas (2 ml) se colocaron en los nuevos viales de vidrio estériles, se añadieron 6 ml de disolución de glucosa estéril neutra al 5%, y las disoluciones resultantes (0,125 mg/ml) se usaron para la administración intravenosa.

De la misma manera, también se prepararon preparaciones de anfotericina B y S44HP.

Toxicidad aguda

Se determinó la toxicidad aguda de los compuestos 1 y 11 (y otros), así como de anfotericina B y S44HP.

Las preparaciones de antibióticos se inyectaron individualmente en la vena de la cola de los ratones en 1-1,5 horas después de la preparación de las disoluciones. La velocidad de inyección no superó 0,5 ml por minuto. Cada antibiótico se usó en un intervalo de dosis que da como resultado 0% a 100% de letalidad y un mínimo de 3 dosis intermedias. Los animales se distribuyeron al azar en grupos, conteniendo cada uno 6 ratones. Las dosis caracterizadoras de la toxicidad MTD y LD_{50} se calcularon con el método de "análisis de probitos" según Litchfield - Wilcoxon (J Pharmacol Exp Ther 96:99) mediante el programa de análisis estadístico "StatPlus-3.5.0. - 2005". En la Tabla 13, a continuación, se muestran los resultados.

Tabla 13. Toxicidad aguda

Compuesto	LD_{50} (mg/kg)	MTD (mg/kg)
Anfotericina B	2,8	2,01
S44HP	2,05	0,64
1	15,4	7,8
11	16,4	11,9
29	17,8	11,0

51	5,3	4,48
41	38,6	21,2
48	32,2	25,9
25	50,8	42,8
26	50,0	43,1
27	20,6	10,8
28	22,1	14,7

Actividad antifúngica in vivo

A los animales se les infectó intravenosamente con cultivo de *Candida albicans* a una dosis de 1,0 millones de CFU/ratón (volumen 0,1 ml). 30 minutos tras la infección, se introdujeron intravenosamente los agentes antifúngicos en los ratones a diversas dosis en un volumen de 0,2 ml (a una velocidad de 0,2 ml/30 segundos). Cada dosis se administró diariamente durante cuatro días, incluyendo el día de la infección (0, 1, 2 y 3 días).

Como control, hubo un grupo de ratones no tratados (infectados de la misma manera con *Candida albicans*). También hubo un grupo de "placebo" de animales no infectados a los que se les administró intravenosamente (en el mismo volumen que las preparaciones de agente antifúngico) 0,2 ml de disolvente (tampón fosfático + 5% de glucosa (1:1)).

No se identificó ninguna actividad en ninguno de los grupos de "placebo". Tampoco se encontró nunca *Candida albicans* en los animales no infectados.

En el quinto día del experimento, los ratones se pesaron y se eutanasiaron (sacrificaron) mediante dislocación cervical. Después, en condiciones estériles, se determinó la carga de *Candida albicans* de cada ratón contando homogenizados viables de los riñones. Los riñones se retiraron asépticamente y se pesaron, después se molieron en morteros de porcelana con corindón estéril. Se prepararon diluciones de las suspensiones resultantes y se sembraron en cápsulas de Petri con agar Saburo, incubadas durante 24 horas a una temperatura de 35°C. Las colonias desarrolladas de *Candida albicans* se contaron entonces, y su cantidad se calculó en base a 1 g de tejido de riñón.

El análisis estadístico se llevó a cabo con Microsoft Office Excel 2003. Las distinciones significativas tuvieron un $P \leq 0,05$ en la comparación mediante el criterio de la t de Student.

Los resultados se muestran en la Tabla 14 a continuación y en la Figura 9.

Tabla 14

Compuesto	Dosis			
	5 mg/kgx4/24	2,5 mg/kgx4/24	0,8 mg/kgx4/24	0,08 mg/kgx4/24
Número de colonias				
No tratado	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
	$5,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$
	$4,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$
AmpB	-	$2,8 \times 10^2$	4×10^3	$3,4 \times 10^4$
	-	$1,0 \times 10^3$	2×10^3	$1,8 \times 10^4$
	-	$2,2 \times 10^2$	6×10^3	$2,6 \times 10^4$
1	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$2,5 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$
	0	$1,0 \times 10^1$	$1,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$
	1,0 X	$2,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$

11	0	$<10^1$	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$
	0	$1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$
	$<10^1$	$1,0 \times 10^1$	$2,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$
S44HP	Dosis de S44HP			
	0,6 mg/kgx4/24	0,3 mg/kgx4/24	0,15mg/kgx4/24	0,08 mg/kgx4/24
	Número de colonias			
	$2,5 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$
	$8,8 \times 10^3$	$9,4 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$	$8,0 \times 10^4$
	$1,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$8,2 \times 10^4$

Estudio de actividad específica del Compuesto 29, 51, 41, 48 sobre el modelo de la septicemia de ratones por candidiasis

5 Animales. En los experimentos se usaron ratones hembra de híbridos de primera generación (C57B1/6xDBA/2)F1 (B6D2F1), 18-20g de peso, recibidos de la granja central "Kryukovo" de Academias Rusas de Ciencia Médica (RAMS). Los animales se mantuvieron en el vivero del Instituto en jaulas de plástico (con un lecho de madera dura en una habitación controlada medioambientalmente: $24 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas) en una dieta estándar de comida en briquetas con un acceso fácil a agua de beber (*ad libitum*). Después de un período de cuarentena de 2 semanas, los animales sanos se usaron en el trabajo experimental.

10 Como agente infeccioso se usó *Candida albicans* (cepa 14053 ATCC). Las preparaciones ensayadas fueron Compuestos 29, 51, 41, 48. Una preparación de comparación fue anfotericina B (pura). Las disoluciones de las preparaciones ensayadas se prepararon extemporáneamente mediante la técnica especificada por el usuario.

Exposición del experimento

15 Los animales se enjaularon en 3 ratones y se infectaron intravenosamente con cultivo de *Candida albicans* en una dosis de 1,0 millones de CFU/ratón en un volumen de 0,1 ml. Es necesario señalar que la dosis de *Candida albicans* permaneció constante en todos los experimentos. Treinta minutos después de la infección de los ratones, se llevó a cabo la primera introducción intravenosa de preparaciones ensayadas en las dosis correspondientes en el volumen de 0,2 ml (con una velocidad de 0,2 ml/30 segundos).

20 El experimento se planificó de manera que se usó en cada experimento una dosis (tanto para anfotericina B como para las preparaciones ensayadas), administrándose cada dosis diariamente en cuatro días, desde el día de la infección (0, 1, 2 y 3 días). En cada experimento hubo un grupo de animales no tratados, infectados con *Candida albicans*. También hubo un grupo de animales de "placebo", intactos (no infectados) a los que se les inyectó intravenosamente, (en el mismo volumen que las preparaciones médicas) 0,2 ml de disolvente – tampón fosfático + 5% de glucosa (1:1). Los datos sobre la actividad del "placebo" no mostraron ninguna actividad. *Candida albicans* no se encontró nunca en los animales no infectados.

30 En el quinto día del experimento tras la exposición, los ratones se pesaron y se eutanasiaron (sacrificaron) mediante dislocación cervical. Después, en condiciones estériles, se determinaron las cargas de *Candida albicans* mediante recuento viable de homogenados procedentes de los riñones. Los riñones, que se retiraron asépticamente y se pesaron, se molieron en morteros de porcelana con corindón estéril, se obtuvieron diluciones de las suspensiones recibidas y se sembraron en cápsulas de Petri con agar Saburo, incubadas durante 48 horas a una temperatura de 35°C , y después se contaron las colonias desarrolladas de *Candida albicans*, y se recalculó su cantidad en 1 g de tejido de riñón. La primera dilución fue 10^{-1} . El resultado cero en este cultivo se aceptó para 5 CFU/g.

Para el criterio básico de una evaluación de las preparaciones investigadas, se aceptó el efecto máximo de la anfotericina B (dosis eficaz, ED).

35 El procesamiento estadístico se llevó a cabo con la ayuda de un programa de ordenador Microsoft Office Excel 2003. Para distinciones aceptadas significativas de media a $P \leq 0,05$ en la comparación mediante el criterio de la t de Student.

Los resultados recibidos se presentan en la tabla 15. La anfotericina B ha mostrado la actividad máxima, aceptada para el criterio de actividad, a los valores más elevados de sus dosis estudiadas (1,25 mg/kg/d, $\approx 62\%$ de MTD).

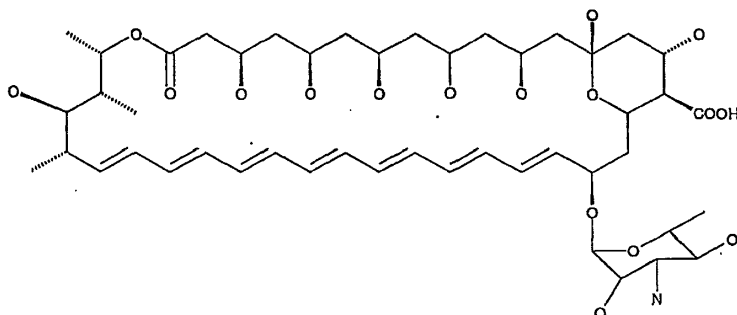
Tabla 15

Actividad de los Compuestos 29, 51, 41, 48 en comparación con anfotericina B (pura) en modelo de la septicemia de ratones por candidiasis.												
		DOSIS mg/kg/d:										
Fármaco	n	0	0,08	0,16	0,31	0,62	1,25	2,5	5	10		
No tratado	24	99042±15255										
AMF	3		105000±48563	85667±9770	34667±12914	10667±4807	1667±441*					
29	3			102667±58769		12500±6614*	2557±1281*	133±33*	5±1*			
51	3		56667±22040		22667±3844*	1783319011*	9400±6416*	5±1*				
41	3			67000±8622		22667±2906*	2767±1974*	1667±1167*		5±1*		
48	3			51667±25221		3233±888*	1487±417*	63±19*		5±1*		
Notas: * Diferencia significativa a partir de no tratados/Dataq presentados como media ± error estándar. n – número de los ratones/												

Síntesis de compuestos adicionales basándose en la manipulación genética

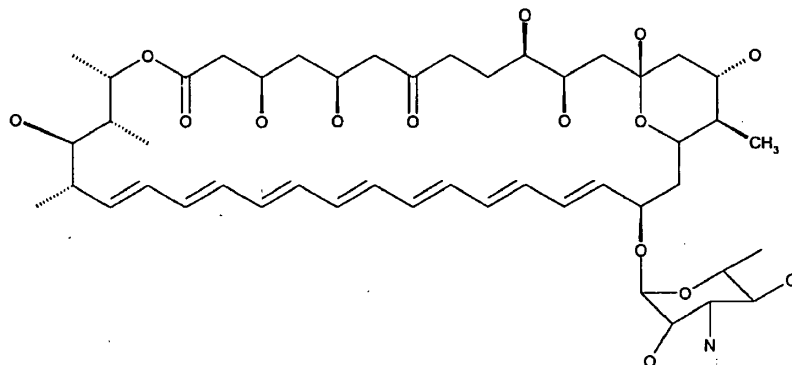
Se han preparado otras estructuras esqueléticas manipulables adicionales. Usando la química anterior, se han unido diversos grupos funcionales diferentes a los grupos COOH y amina libres. (Los átomos de H no se muestran)

B1



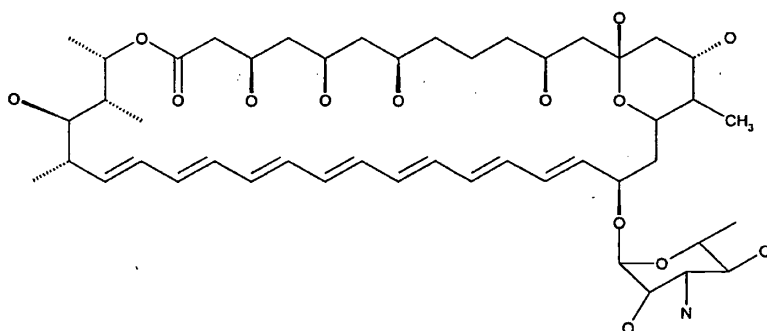
5 Inactivación de los dominios de ER5 y DH15 en PKS de nistatina, sin hidroxilación de C-10

B3



Inactivación de los dominios de ER5, DH15 en PKS de nistatina y NysN monooxigenasa, sin hidroxilación de C-10

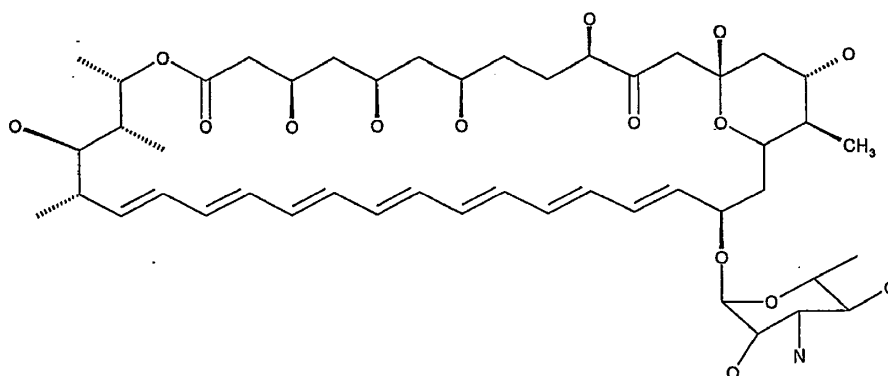
B4



Inactivación del dominio de ER5 en PKS de nistatina y NysN y NysL monooxigenasas

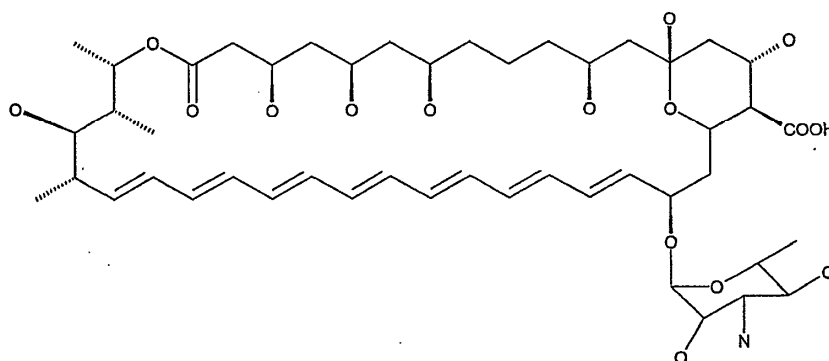
10

B5



Inactivación de los dominios de ER5 y KR14 en PKS de nistatina y NysN monooxygenasa.

B6



Inactivación del dominio de ER5 en PKS de nistatina y NysL monooxygenasa.

5 Construcción del mutante B5

Construcción del vector de sustitución génica para inactivación de KR14:

El fragmento de *Bell*/*EcoRI* de 4,0 del plásmido pL20X (véase la estrategia B2, anterior) se cortó y se ligó en pGEM-3zf digerido con *BamHI*/*EcoRI*, produciendo pBE4.0. Un fragmento de 1 kb se amplificó mediante PCR a partir de este último plásmido usando los siguientes cebadores:

10 KR14-F1: 5'- TTCGGCGGCGTAATCTCC-3' (sentido), y

KR14-R1: 5'- tttaaGCTTCCACGGCGAGGTGC-3' (antisentido)

El fragmento de la PCR se digirió con *SacI* y *HindIII* (el nuevo sitio de reconocimiento está subrayado en el cebador), y se ligó en pLITMUS28, produciendo pLITHS 1.0, y este último plásmido se usó como un molde para la mutagénesis dirigida al sitio del sitio activo de KR14 usando los siguientes oligonucleótidos mutagénicos:

15 KR14-mut1:

5'-CCCGGGCCAGGCCAACTTCGAAGCTGCCAACGCCGTCCTG-3' (sentido),

KR14-mut2:

5'-CAGGACGGCGTTGGCAGCTTCGAAGTTGGCCTGGCCCGGG-3' (antisentido)

20 Los nucleótidos mutados se muestran en letra negra, y el nuevo sitio de reconocimiento de *BstBI* introducido está subrayado. Usando estos dos oligonucleótidos, la Tyr del sitio activo de KR14 se sustituye por Phe, y simultáneamente la siguiente Ala en dirección 3' se sustituye por Glu, produciendo una doble mutación YA9197FE. Un plásmido con la mutación correcta se identificó con digestión de *BstBI*, y todo el inserto clonado se secuenció para resolver cualesquiera otras mutaciones indeseadas. A partir del plásmido correctamente mutado, el fragmento de *FseI*/*AscI* de 0,7 kb se cortó y se usó para sustituir el fragmento correspondiente del plásmido pBE4.0, produciendo pBE4.0mut. A partir de este último plásmido, todo el inserto de 4,0 kb se cortó con *EcoRI*/*HindIII* y se

ligó junto con el esqueleto de EcoRI/HindIII de 3,1 kb de pSOK201, produciendo el vector de sustitución génica pKR14m.

Sustituciones génicas

5 Este último vector se introdujo en el mutante de *S. noursei* deficiente en *nysA* GG5073SP (Borgos et al., 2006) mediante recombinación homóloga doble. La mutación de KR14 cromosómica correcta se verificó usando PCR + digestión de BstBI, así como transferencia Southern, antes de que se restaurase la producción de polieno al introducir el gen *nysA* en *trans* como se describe en otra parte (Brautaset et al., 2003). El mutante resultante se denominó BSG015.

10 A continuación, el vector de inactivación de *nysN* pKOnysN-CL346AS (véase manus de PNAS) se introdujo en BSG015 deficiente en *nysA* mediante recombinación homóloga doble. La mutación de *nysN* cromosómica correcta se verificó usando PCR y digestión de NheI, así como transferencia Southern, antes de que se restaurase la producción de polieno al introducir el gen *nysA* en *trans* como se describe en otra parte (Brautaset et al., 2003). El mutante resultante se denominó B5.

Construcción del mutante B4

15 Construcción del vector de sustitución génica para inactivación de *nysL*.

20 Se ha descrito (Volokhan et al., 2006) el plásmido de supresión en el marco de sustitución génica de *nysL* pNLD1, y el inserto clonado de 4,2 kb de este plásmido incluye regiones de la región codificante de *nysN* de *S. noursei*. A fin de introducir la mutación de *nysL* en un antecedente mutante *nysN*-CL346ST, se tuvo que modificar este plásmido para incluir igualmente esta mutación de *nysN*. Esto se realizó según lo siguiente: el fragmento de AgeI/Fspal 1011 pb del plásmido pSOK201nysN4.1-CL346ST (véase la solicitud de patente de Biosergen, mayo de 2007) se cortó y se usó para sustituir el fragmento correspondiente del plásmido pNLD1, produciendo el plásmido de sustitución génica pNLD2.

Sustitución génica:

25 El plásmido pNLD2 se introdujo en el Compuesto 1 deficiente en *nysA* mediante recombinación homóloga doble. La mutación de *nysL* cromosómica correcta se verificó usando PCR y digestión de NheI, así como transferencia Southern, antes de que se restaurase la producción de polieno al introducir el gen *nysA* en *trans* como se describe en otra parte (Brautaset et al., 2003). El mutante resultante se denominó B4.

B1 y B3

Inactivación del sitio activo de DH15 His966 de NysJ:

30 **Objetivo:** introducir una mutación específica del sitio en el sitio activo de DH15 de *nysJ* que conduzca a la mutación de sustitución H966F en el dominio de DH15.

Procedimiento:

- Digiérase pL20X con BclI + SphI y clónese el fragmento de 3,33 kb en pGEM11-zf digerido con BamHI/SphI = pDH15-A
- 35 - Digiérase pDH15-A con EcoRI+HindIII y clónese el fragmento de 3,34 kb en los sitios correspondientes pGEM3-zf = pDH15-B
- Llévese a cabo la mutagénesis dirigida al sitio usando el molde de pDH15-B y con los siguientes oligonucleótidos mutagénicos:

Mut-DH15-1:

40 5'- CACCCCTGGCTCGCCGACTTTCGTCGTCGGCGGCATGGTC -3'

Mut-DH15-2:

5'- GACCATGCCGCCGACGACGAAGTCGGCGAGCCAGGGGTG -3'

- Los nucleótidos mutados se indican en letra negrita. La mutación destruye en esta posición el sitio de BtrI natural.
- 45 - Verifíquese la mutación correcta con digestión de BtrI y secuenciación de ADN = pDH15-Bmut.
- Aíslense el fragmento 1 de EcoRI/SacI de 1,6 kb de pDH15-B; el fragmento 2 de HindIII/BglII de 1,1 kb pDH15-B, y el fragmento 3 de SacI/BglII de pDH15-Bmut, y líguense los tres fragmentos juntos con el esqueleto de EcoRI/HindIII de pSOK201 de 3,1 kb; pDH15-123

- Continúese con la sustitución génica en *S. noursei*.
- Verifíquense mutaciones correctas de DH15 de *S. noursei*.
- Los mutantes del 1^{er} entrecruzamiento se pueden verificar mediante transferencia Southern tras digestión de NotI de ADN total y usando como sonda el inserto de 3,33 marcado de pDH15-A. El tipo salvaje debe de dar señales de 5,2 + 8 kb, mientras que el mutante del 1^{er} entrecruzamiento correcto (ambas variantes teóricas) deben de dar señales de 5,2 + 6,4 + 8 kb.
- Los mutantes del 2^o entrecruzamiento se pueden analizar mediante PCR usando los siguientes cebadores:
 - DH15-F: 5' - CCTTCCTCGAACTCGGCC - 3'
 - DH15-R: 5' - GCGTAGATCTCGGTGTCG - 3'
- que deben de dar un producto de 817 pb. El producto de la PCR de la cepa progenitora se puede digerir con BtlI, dando fragmentos de 392 pb y 425 pb, mientras que el producto de la PCR procedente del mutante no se puede cortar con BtlI. Adicionalmente, el 2^o mutante también se puede verificar mediante transferencia Southern usando como sonda el producto de la PCR de 817 pb marcado. El ADN de la cepa progenitora digerido con BtlI debe de dar un fragmento hibridante de 0,95 kb + 0,45 kb, mientras que el ADN digerido con BtlI procedente del mutante debe de dar un fragmento hibridante de 1,4 kb.

Construcción del mutante B1

La mutación de DH15 se introdujo en la cepa GG5073SP deficiente en *nysA*, y el mutante correcto se complementó entonces con el gen de *nysA* en trans.

Construcciones de mutantes B3

La mutación de *nysN*-CL346ST se introdujo en el antecedente genético B1-S1 deficiente en *nysA*, y la cepa mutante correcta resultante se complementó con el gen de *nysA* en trans, produciendo el mutante B3-1S.

Eficacia *in vivo* de anfotericina B y nuevos análogos de S44HP en un modelo de ratón neutropénico de candidiasis diseminada

Los ratones se hicieron neutropénicos mediante inyección con monohidrato de ciclofosfamida (Fluka, BioChemika, Sigma-Aldrich, Suiza) intraperitonealmente 2 x 100 mg/kg de peso corporal 1 día antes de la infección. La infección diseminada con *Candida albicans* se logró mediante inyección de 3 x 10⁵ CFU/ml de inóculo vía la vena de la cola lateral de ratones neutropénicos 2 h antes del comienzo de la terapia antibiótica. La eficacia de los antibióticos para eliminar la infección por *C. albicans* se evaluó mediante la evaluación de la carga fúngica en riñones después de 4 días de tratamiento (1 dosis por día). Los resultados se presentan en la Figura 17.

La anfotericina B se administró a la dosis más elevada de 2 mg/kg (justo por debajo de MTD).

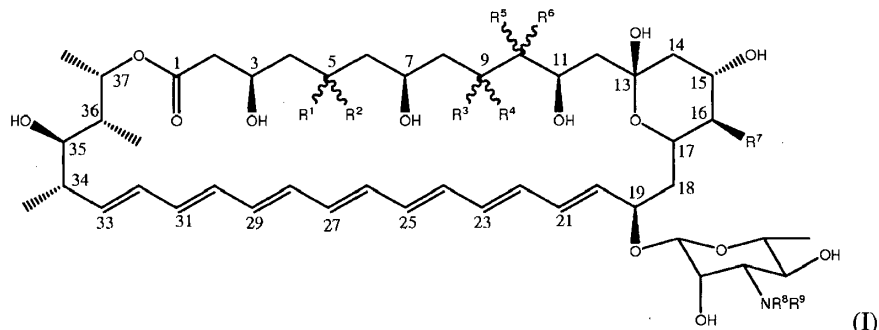
Estos resultados muestran claramente que el Compuesto 28 y el compuesto 29 son considerablemente mejores que la anfotericina B, puesto que:

- 1) muestran una toxicidad aguda aprox. 5-7 veces menor;
- 2) demuestran una eficacia 5-10 veces mejor en el tratamiento de candidiasis diseminada en el modelo de ratón neutropénico;
- 3) son solubles en glucosa al 5% (> 10 mg/ml), mientras que la solubilidad de anfotericina B es < 1 mg/ml.

Aunque el compuesto 25 y el compuesto 26 son menos activos que anfotericina B en el modelo de candidiasis de ratón neutropénico, presentan una toxicidad aguda mucho menor (aprox. 20 veces menor que anfotericina B), y por lo tanto todavía se consideran candidatos interesantes.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es un derivado de nistatina que tiene un doble enlace adicional presente entre C28 y C29 y que está modificado además con respecto a nistatina en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10 o en el grupo amino de micosamina, que tiene la fórmula (I)



en la que,

R^1 y R^2 representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo, o juntos forman un grupo carbonilo;

R^3 y R^4 representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo, o juntos forman un grupo carbonilo;

R^5 y R^6 representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un grupo alquilo;

R^7 representa un grupo alquilo o un grupo amida;

R^8 y R^9 representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo alquilamino, un grupo de azúcar o un grupo acilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en el que

por "grupo alquilo" se quiere decir un grupo de hidrocarburo saturado cíclico o acíclico, de cadena lineal o ramificado, que contiene hasta 20 átomos de carbono, que puede estar no sustituido o sustituido con un sustituyente seleccionado de los grupos hidroxilo, alcoxi, aciloxi y amino, y que puede estar interrumpido con uno o más grupos seleccionados de -arilo-, -O-, -NR¹²- y -S-, en el que R^{12} representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₆;

por "grupo alcoxi" se quiere decir un grupo -OR, en el que R es un grupo alquilo como se define aquí antes;

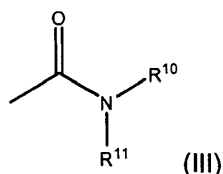
por "grupo aciloxi" se quiere decir un grupo -OCOR¹⁴, en el que R^{14} es un grupo alquilo como se define aquí antes;

por "grupo alquilamino" se quiere decir un grupo -(CH₂)_xNR¹⁶R¹⁷ en el que x es 1 a 10 y R^{16} y R^{17} representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁₋₆;

por "grupo de azúcar" se quiere decir un sacárido, preferiblemente un oligo- o monosacárido;

por "grupo acilo" se quiere decir un grupo -COR¹⁸ en el que R^{18} es un grupo alquilo como se define antes;

por "grupo amida" se quiere decir un grupo de fórmula (III):



en la que R^{10} y R^{11} representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido como se define aquí antes, o juntos forman un anillo alquilo.

2. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el grupo amino de micosamina está sustituido con uno o más grupos alquilamino o azúcar.

3. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el que R^1 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi (por ejemplo un grupo $-OC_{1-6}$) y R^2 es un átomo de hidrógeno, o en el que R^1 y R^2 forman juntos un grupo carbonilo; y

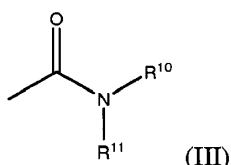
en el que R^3 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi (por ejemplo un grupo $-OC_{1-6}$) y R^4 es un átomo de hidrógeno, o en el que R^3 y R^4 forman juntos un grupo carbonilo; y

en el que R^5 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi (por ejemplo un grupo $-OC_{1-6}$) y R^6 es un átomo de hidrógeno.

4. Un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R^8 representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilamino, un azúcar o un grupo acilo, y R^9 es idéntico a R^8 o es un átomo de hidrógeno, por ejemplo R^9 es un átomo de hidrógeno, o

en el que R^8 es un grupo de azúcar o un grupo alquilamino y R^9 es un átomo de hidrógeno.

5. Un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R^7 es metilo o una amida de fórmula III



en la que R^{10} y R^{11} representan, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C_{1-10} ramificado o no ramificado, opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo, aciloxi o amino, y opcionalmente interrumpido con átomos de oxígeno o nitrógeno, o R^{10} y R^{11} forman juntos un grupo alquilo de C_{1-8} cíclico, opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo, aciloxi o amino, y opcionalmente interrumpido con átomos de oxígeno o nitrógeno.

6. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 5, en el que R^7 es metilo, $CONH(CH_2)_nN(CH_3)_2$ o $CONH(CH_2)_nOH$ en los que n es 2 ó 3.

7. Un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R^8 es un grupo alquilamino de fórmula $-(CH_2)_xNH_2$ o $-(CH_2)_xN(alquil\ C_{1-6})_2$ en las que x es 2 a 6, o es un monosacárido seleccionado de glucosa, galactosa, glucopiranososa, manopiranososa, galactopiranososa, fructopiranososa y tagotopiranososa, o es un oligosacárido seleccionado de lactosa, melibiosa, sacarosa, maltosa y celobiosa.

8. Un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R^7 es alquilo de C_{1-6} (por ejemplo metilo) y al menos uno de R^8 y R^9 (por ejemplo tanto R^8 como R^9) son átomos de hidrógeno; o

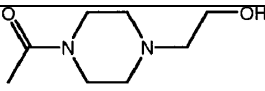
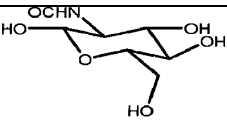
en el que R^7 es un grupo amida, preferiblemente un grupo amida de fórmula III como se define aquí antes, y al menos uno de R^8 y R^9 (por ejemplo tanto R^8 como R^9) son átomos de hidrógeno.

9. Un compuesto como se reivindica en cualquier reivindicación anterior en forma de una sal de glutamato.

10. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1, seleccionado de:

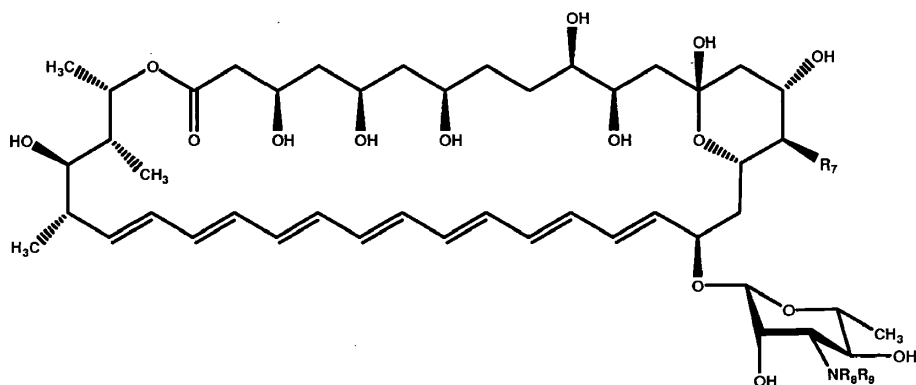
(i) compuestos n^{os} 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 28, y 29, en los que, en la fórmula I, R^1 a R^9 son como se definen según la siguiente tabla:

Compuesto nº	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7	R^8	R^9
1	OH	H	H	H	OH	H	CH ₃	H	H
3	=O		H	H	OH	H	CH ₃	H	H
5	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH ₂ CH ₂ OH	H	H

Compuesto n°	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
6	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH ₃	H	H
7	OH	H	H	H	OH	H	CONH ₂	H	H
8	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH(CH ₃) ₂)-COOCH ₃ (L)	H	H
9	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH ₂ COOEt	H	H
10	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH ₃)COOCH ₃ (L)	H	H
11	OH	H	H	H	OH	H	CONH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	H	H
12	OH	H	H	H	OH	H	CONH(CH ₂) ₃ OH	H	H
13	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH ₂ OH)COOCH ₃ (L)	H	H
14	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH ₂ OH)COOCH ₃ (DL)	H	H
15	OH	H	H	H	OH	H		H	H
16	OH	H	H	H	OH	H		H	H
24	OH	H	OH	H	H	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
25	OH	H	H	H	H	H	CH ₃	H	H*
26	OH	H	OH	H	H	H	CH ₃	H	H*
27	OH	H	H	H	H	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
28	OH	H	H	H	OH	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
29	OH	H	H	H	OH	H	CH ₃	H	H*
*como sal de glutamato									

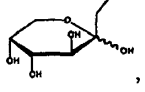
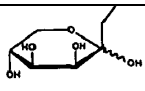
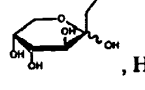
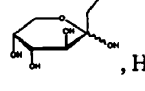
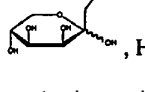
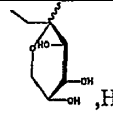
y

(ii) compuestos n^{os} 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, y 57, de la fórmula



5

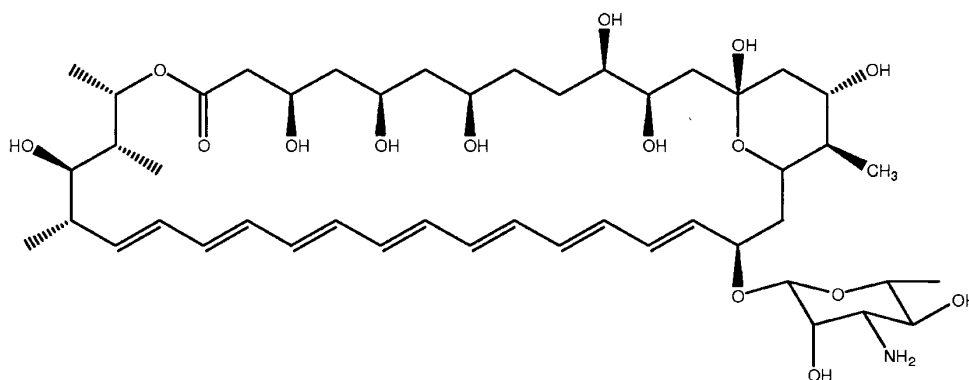
en la que R⁷ a R⁹ son como se definen según la siguiente tabla:

Compuesto n°	R ₇	R ₈ , R ₉
30	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	 (fructopiranosilo)
31	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	 (tagatopiranosilo)
32	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
33	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-lisilo)
34	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glicilo)
35	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
36	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	 (fructopiranosilo)
37	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
38	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-Lys)
39	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glicilo)
40	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
41	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	 (fructopiranosilo)
42	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	 (tagatopiranosilo)
43	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
44	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-lisilo)
45	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glicilo)
46	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
48	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	H,H
49	CH ₃	 (fructopiranosilo)
50	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H

Compuesto n°	R ₇	R ₈ , R ₉
51	CH ₃	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-lisilo)
52	CH ₃	(CH ₂) ₃ NH ₂ , (CH ₂) ₃ NH ₂
53	CH ₃	H,H - hidrocloreto
54	CH ₃	H,H - D-glutamato
55	CH ₃	H,H - L aspartato
56	CH ₃	H,H - metilsulfonato
57	CH ₃	H,H - dicloroacetato

11. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 10, seleccionado de los compuestos n^{os} 1,9, 1,1, 12, 13, 14, 15, 16, 28, 29, 41, 48 y 51.

12. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1, de fórmula:



5

o una sal de glutamato del mismo.

13. Un procedimiento para obtener compuestos como se reivindican en cualquier reivindicación anterior, que comprende:

10

(i) modificar un agrupamiento génico que codifica el sistema de policétido sintasa responsable de la síntesis de nistatina, para producir un derivado de nistatina que tiene un doble enlace entre C28 y C29; y

(ii) modificar adicionalmente dicho agrupamiento génico para producir un derivado de nistatina que está modificado en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina,

o

15

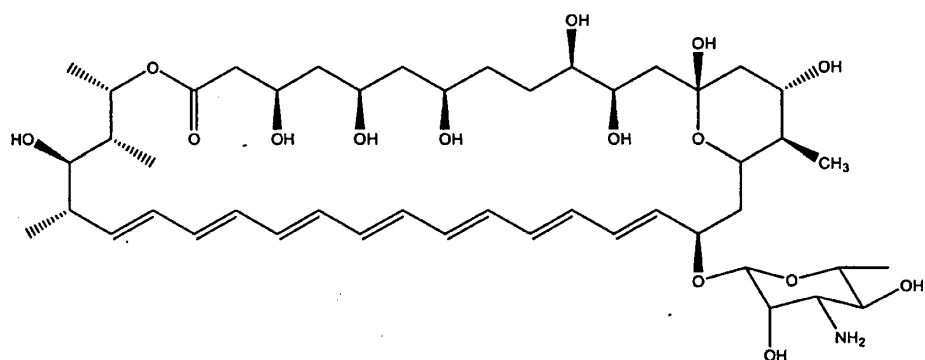
(iii) modificar el derivado resultante en C16 y opcionalmente una o más de las posiciones C5, C9, C10, o en el grupo amino de micosamina mediante una reacción química.

14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un vehículo, diluyente o excipiente.

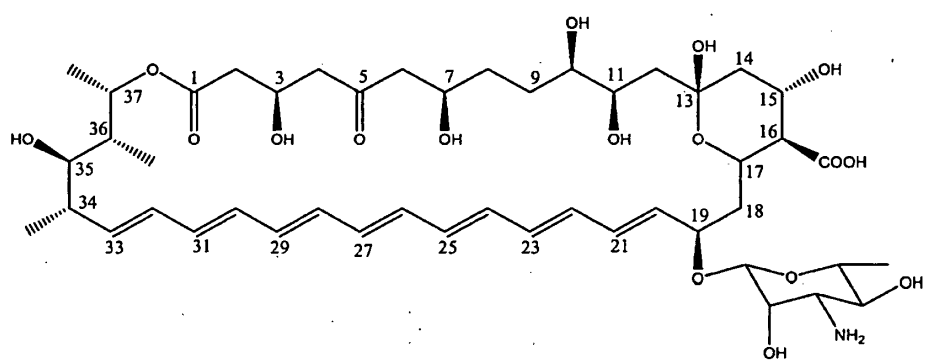
15. Un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en terapia.

20

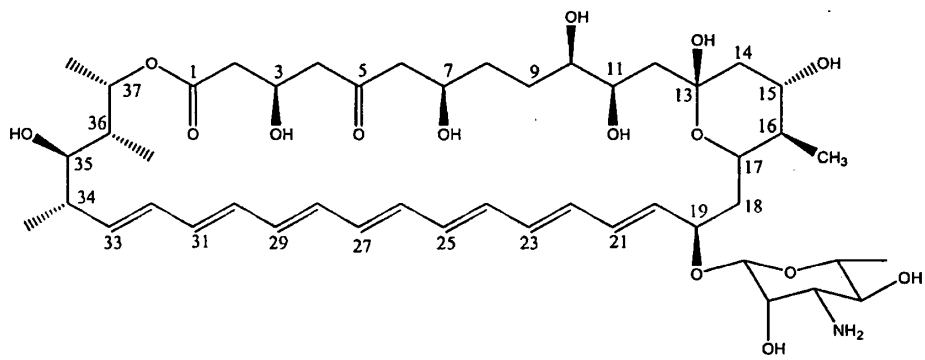
16. Un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en el tratamiento de infecciones fúngicas.



1

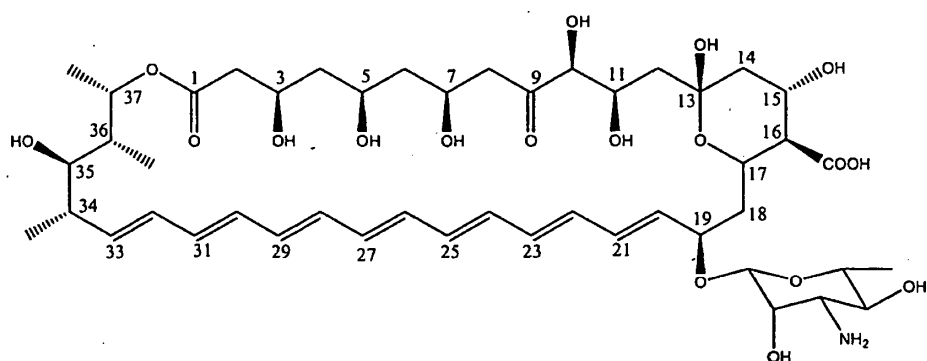


2

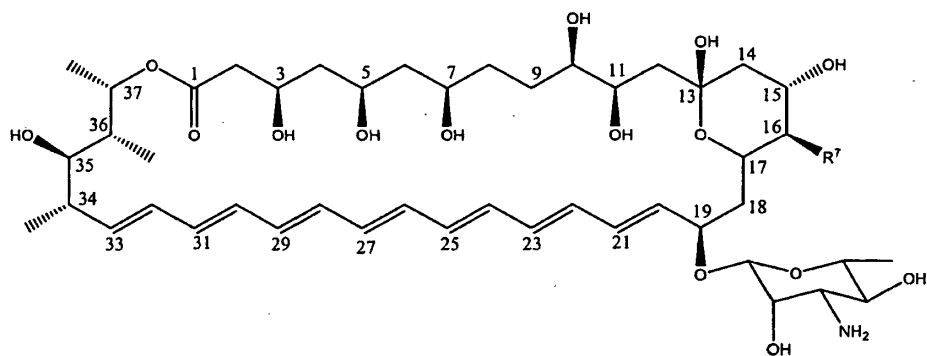


3

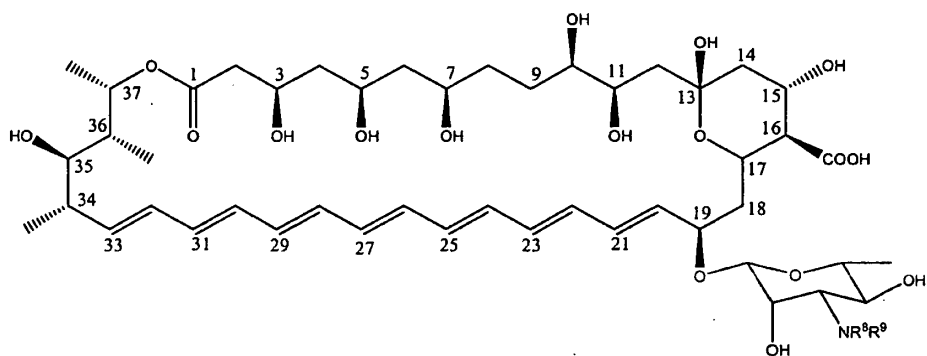
FIG 1



4



5-16



17-23

FIG. 1

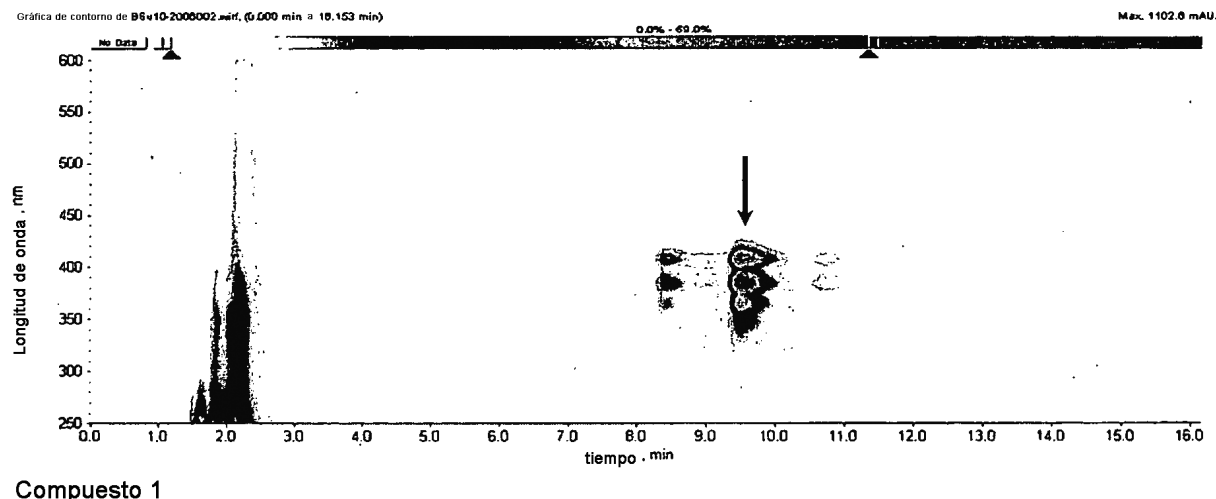
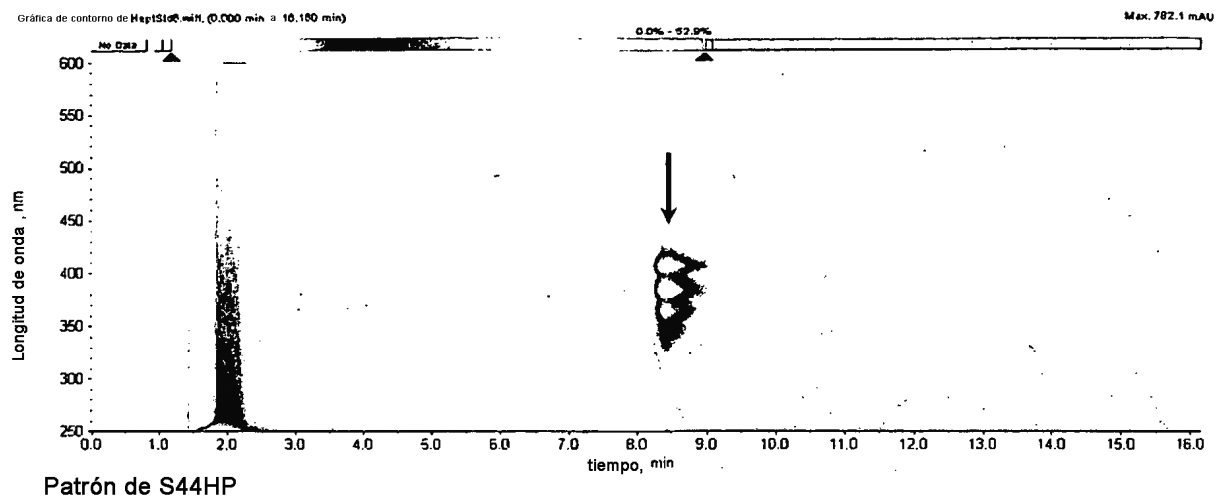


FIG 2.

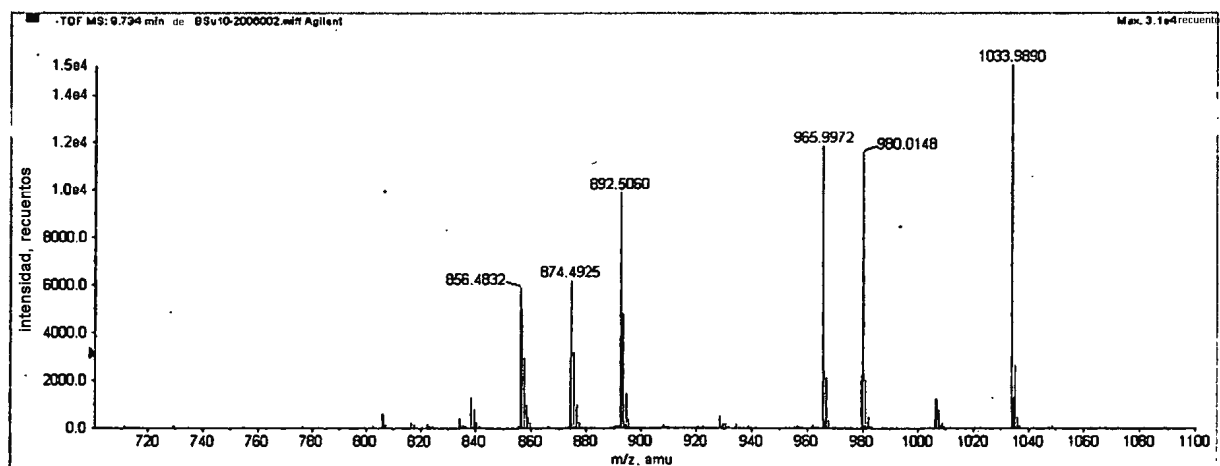
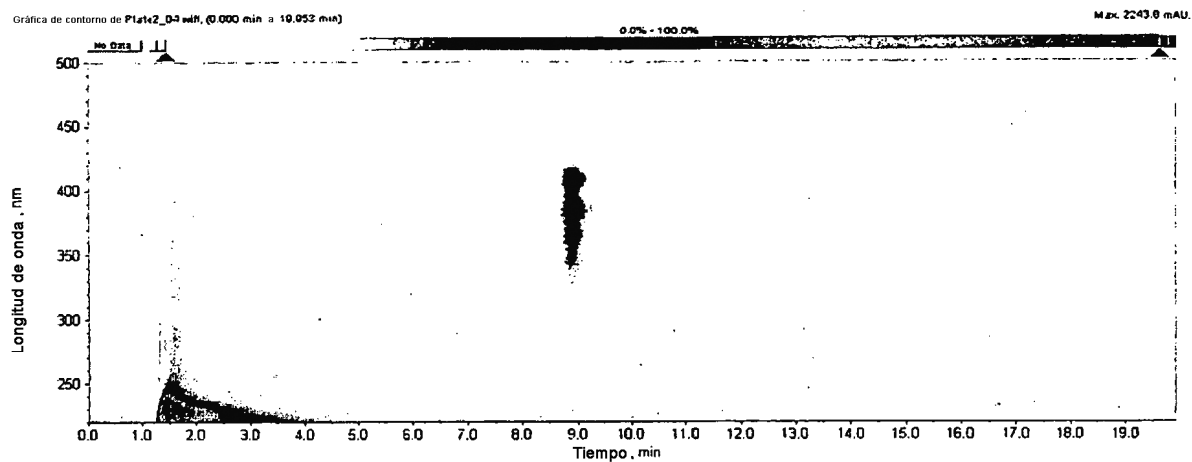
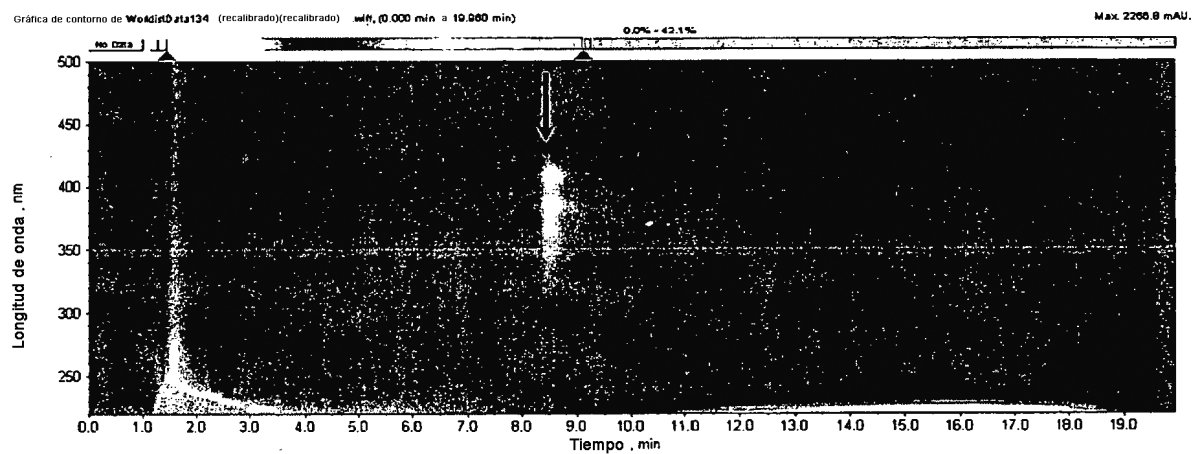


FIG 3



Cepa de referencia



Compuesto 2

FIG 4

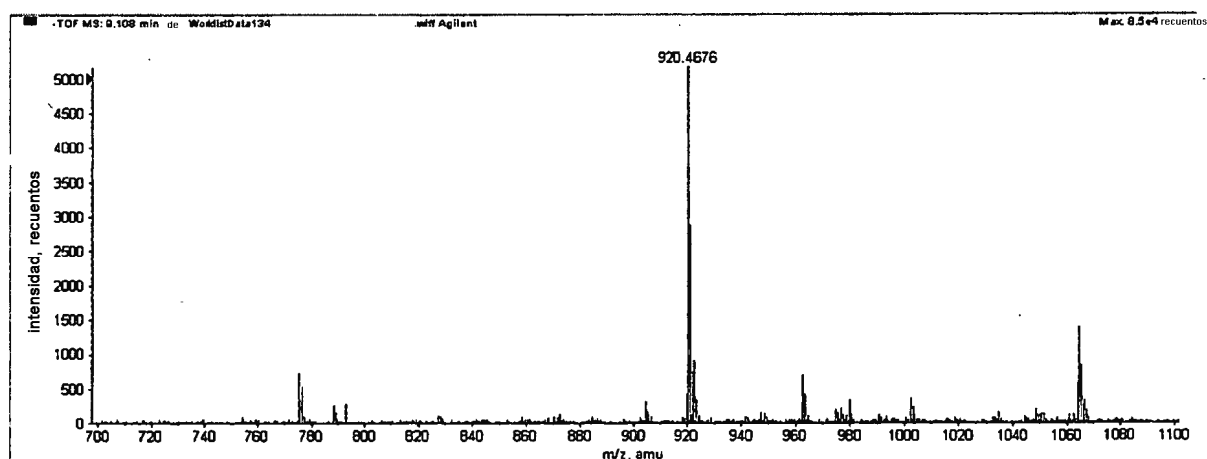
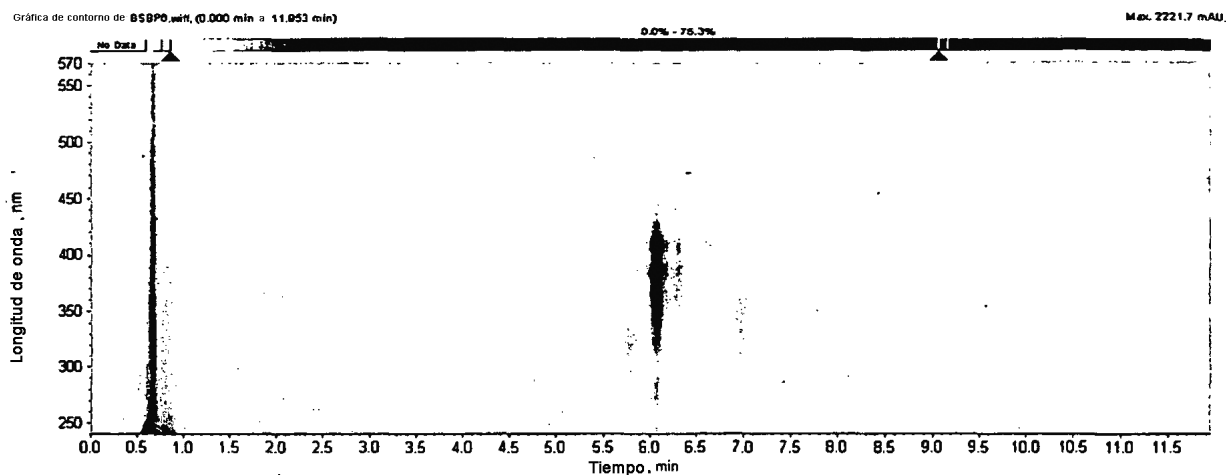
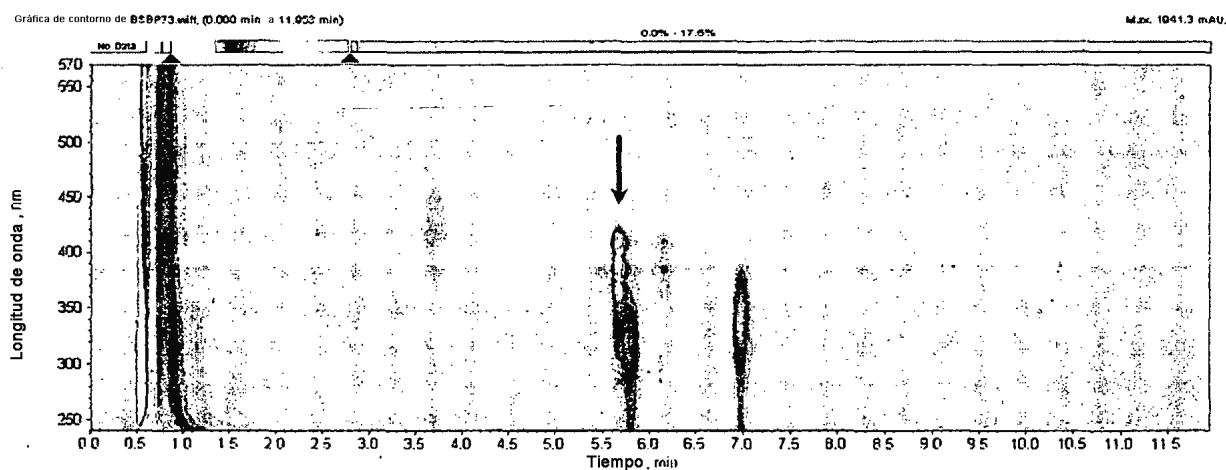


FIG 5



Cepa de referencia



Compuesto 3

FIG 6

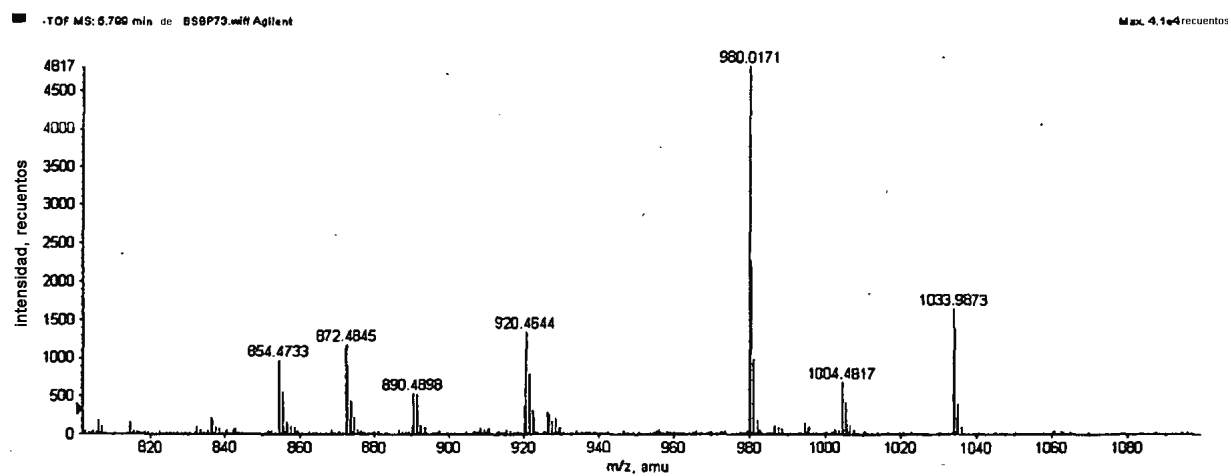
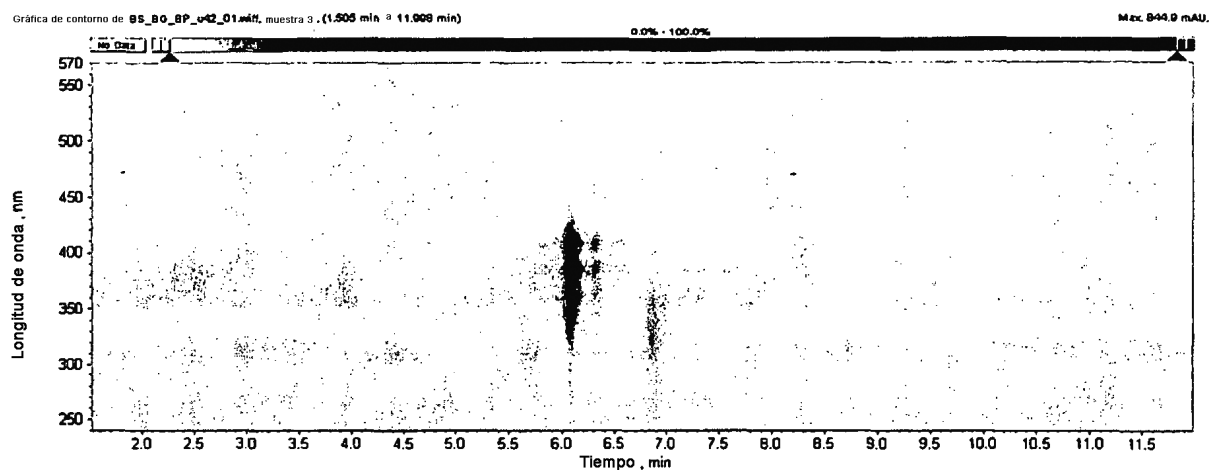
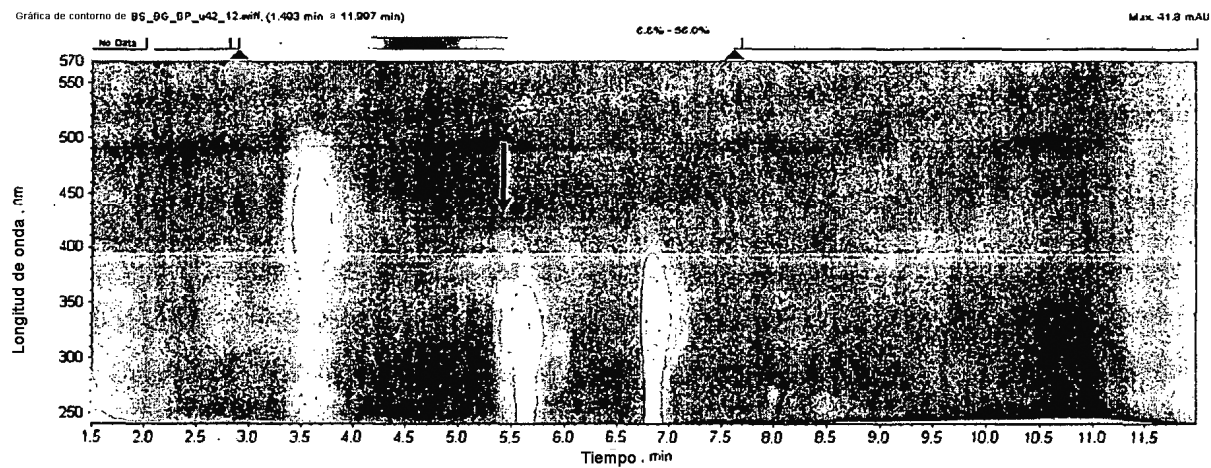


FIG 7



Cepa de referencia



Compuesto 4

FIG 8

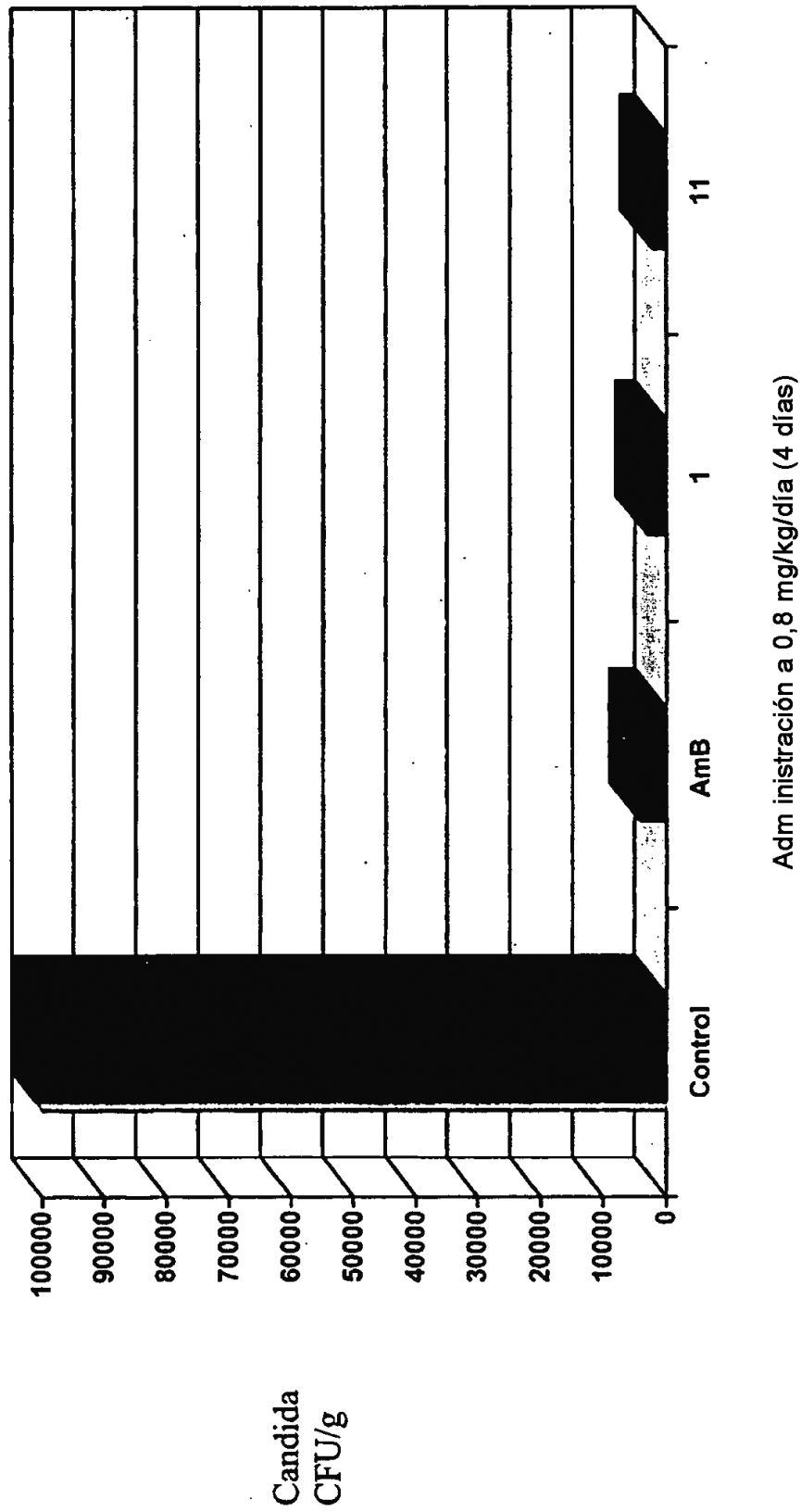


FIG. 9

Figura 10 Esquema 1

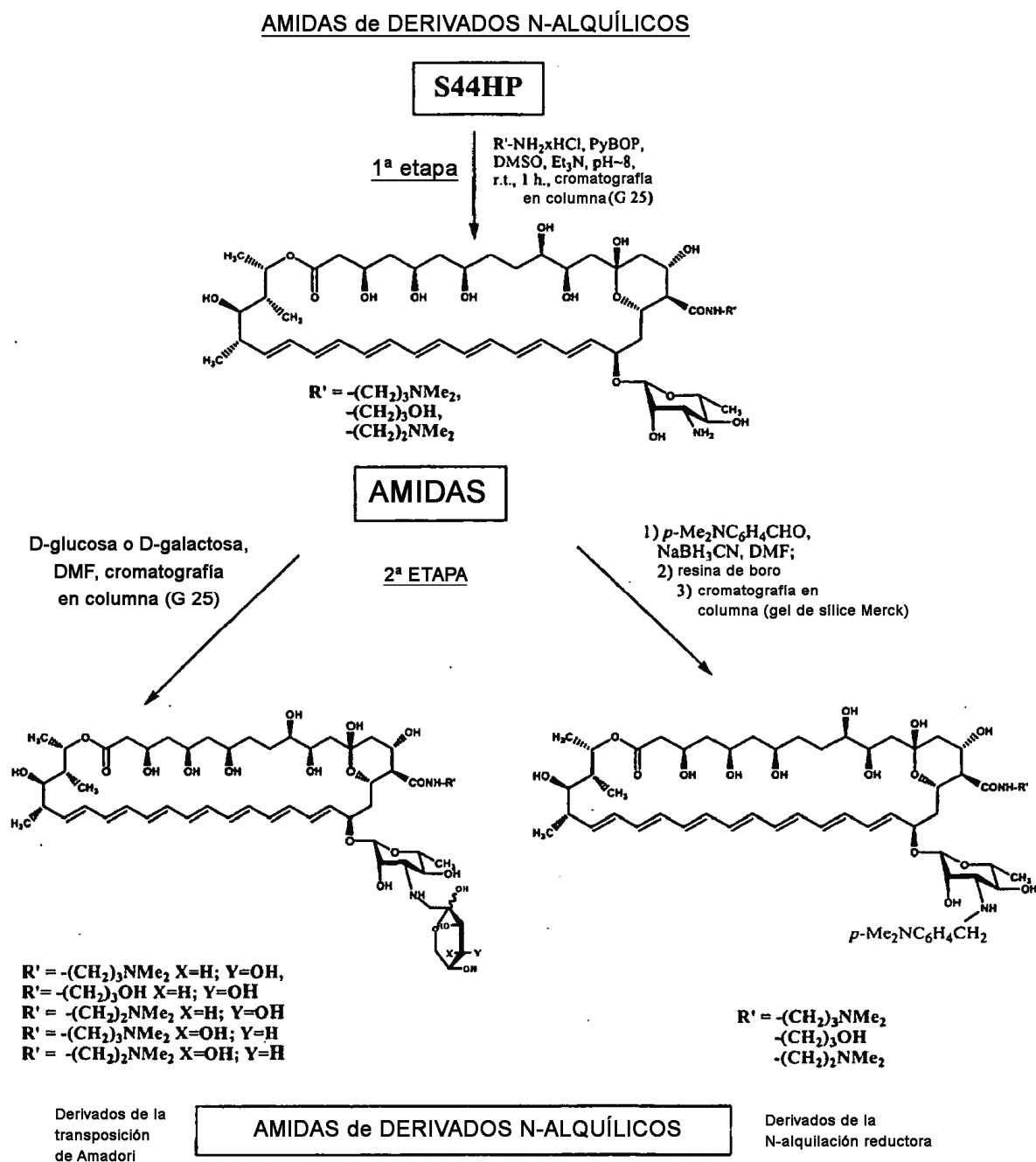


Figura 11 Esquema 2

AMIDAS de DERIVADOS N-AMINOACÍLICOS

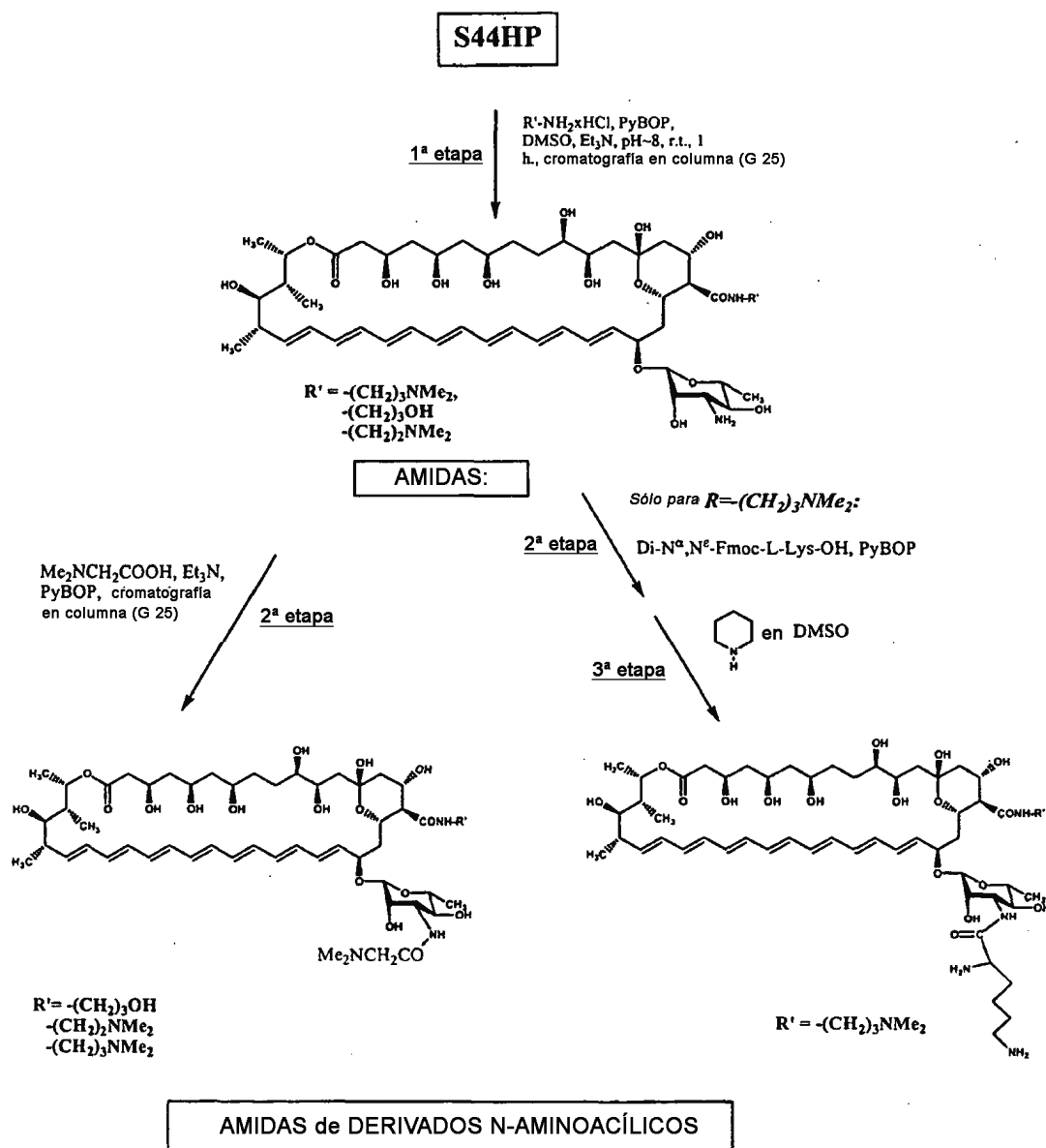


Figura 12 Esquema 3

AMIDAS de DERIVADOS N-AMINOACÍLICOS

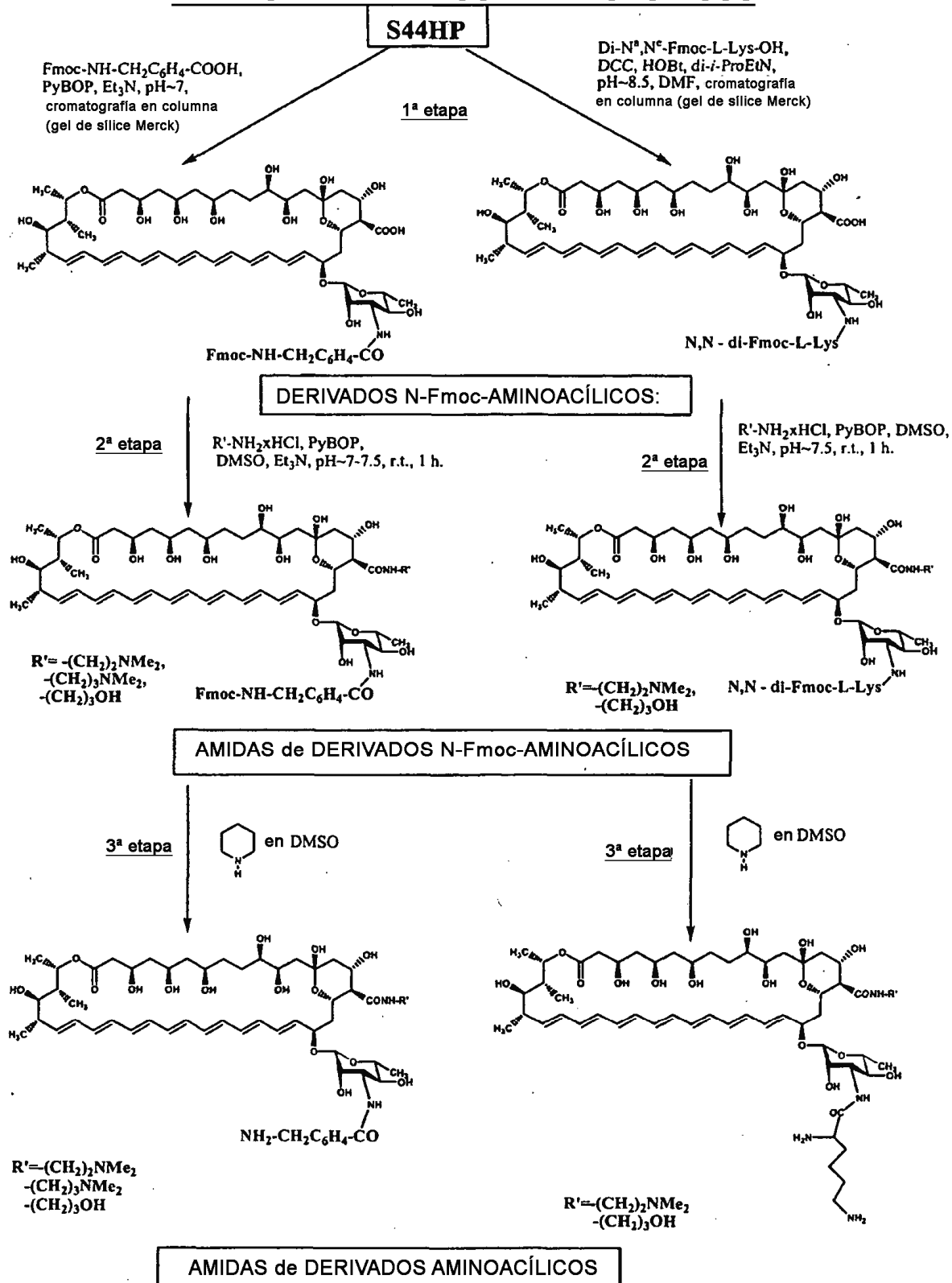
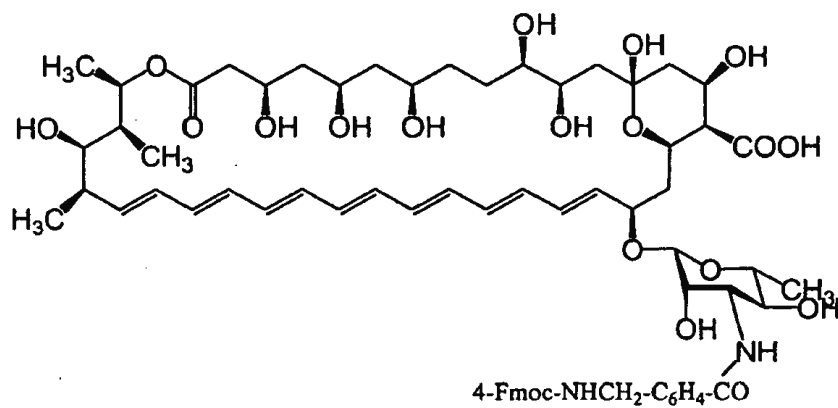
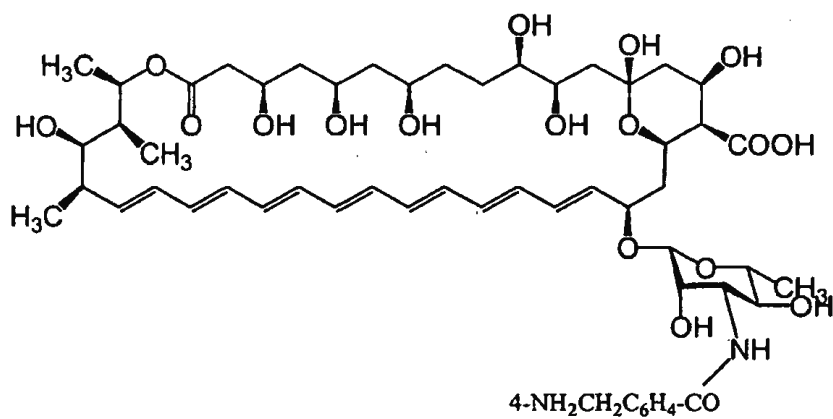
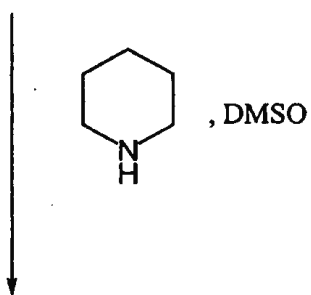


Figura 13 Esquema 4

Síntesis de N-(4-aminometilbenzoil) S44HP



N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP



N-(4-aminometilbenzoil) S44HP

Figura 14 Esquema 5. Síntesis de DMAE amida de S44HP

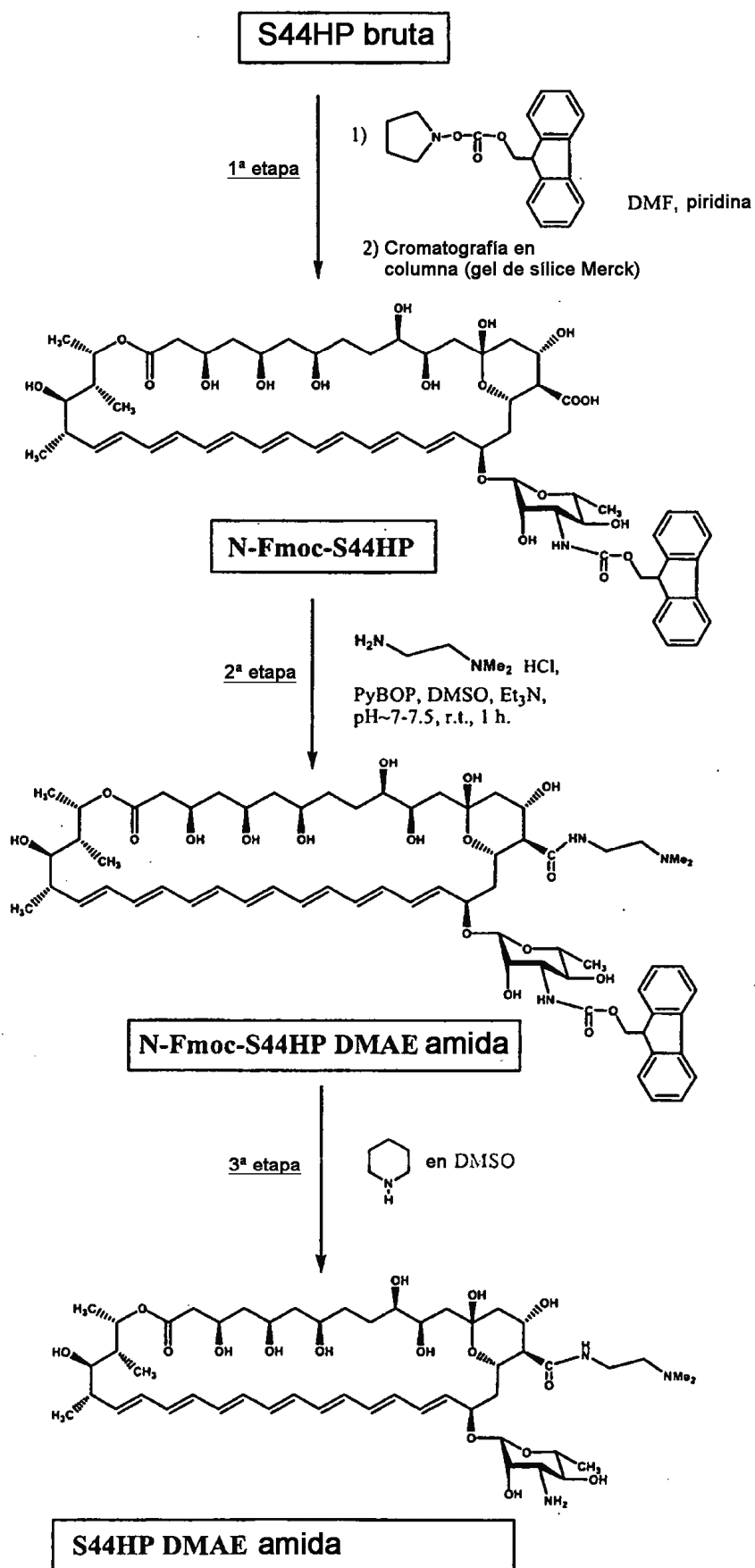


Figura 15 Esquema 6. Purificación de Compuesto 1, partiendo de Comp. 1 bruto

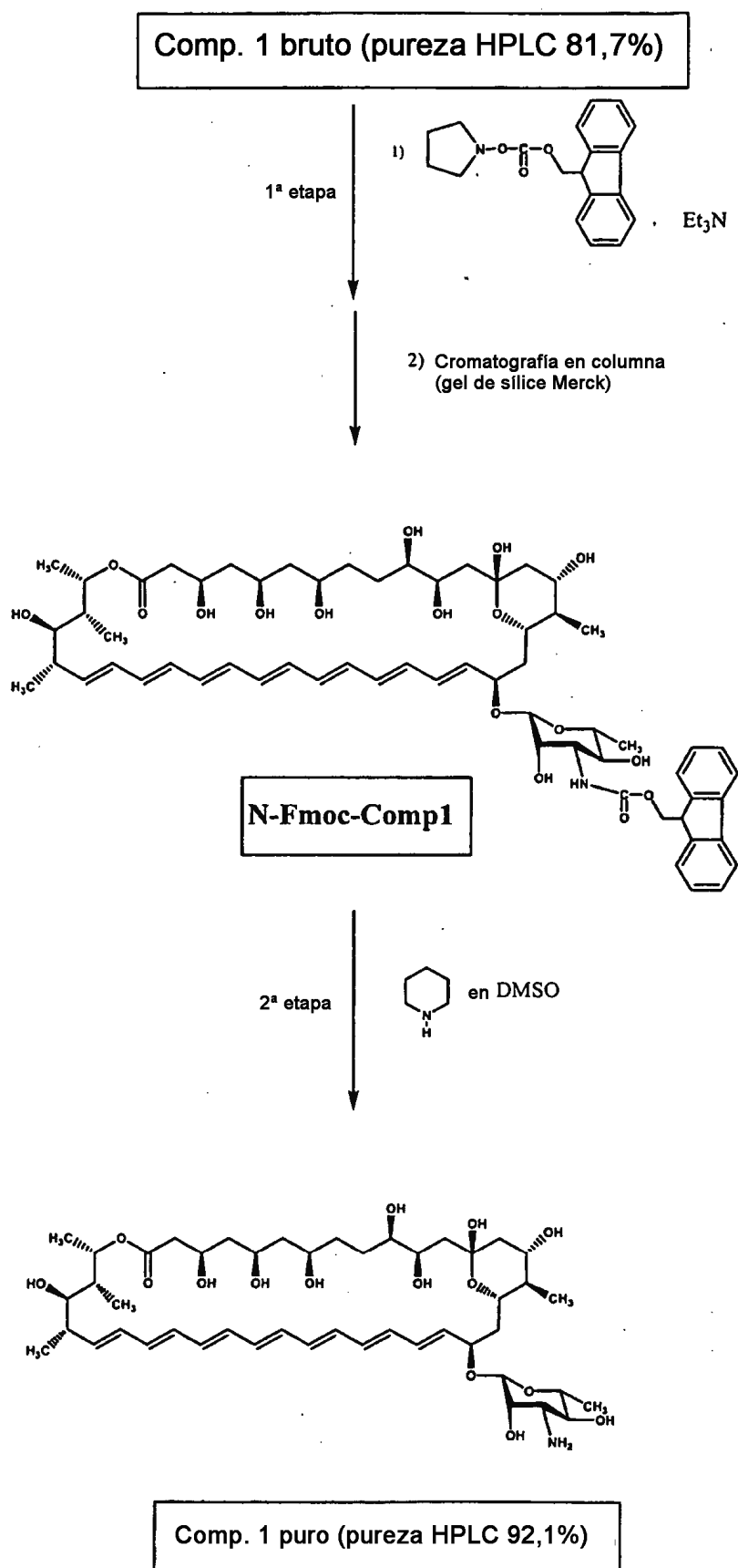


Figura 16 Esquema 7. N-Fructopiranosil-Comp 1 (derivado N-alquílico, transposición de Amadori); N-(4-N,N-di-metilaminobencil) Comp 1 (derivado N-alquílico, alquilación reductora); N-L-Lisil-Comp 1 (derivado N-aminoacílico, N-Fmoc-aminoacilación); N,N-Di-(3-aminopropil) Comp 1 (derivado N,N-di-alquílico, alquilación reductora).

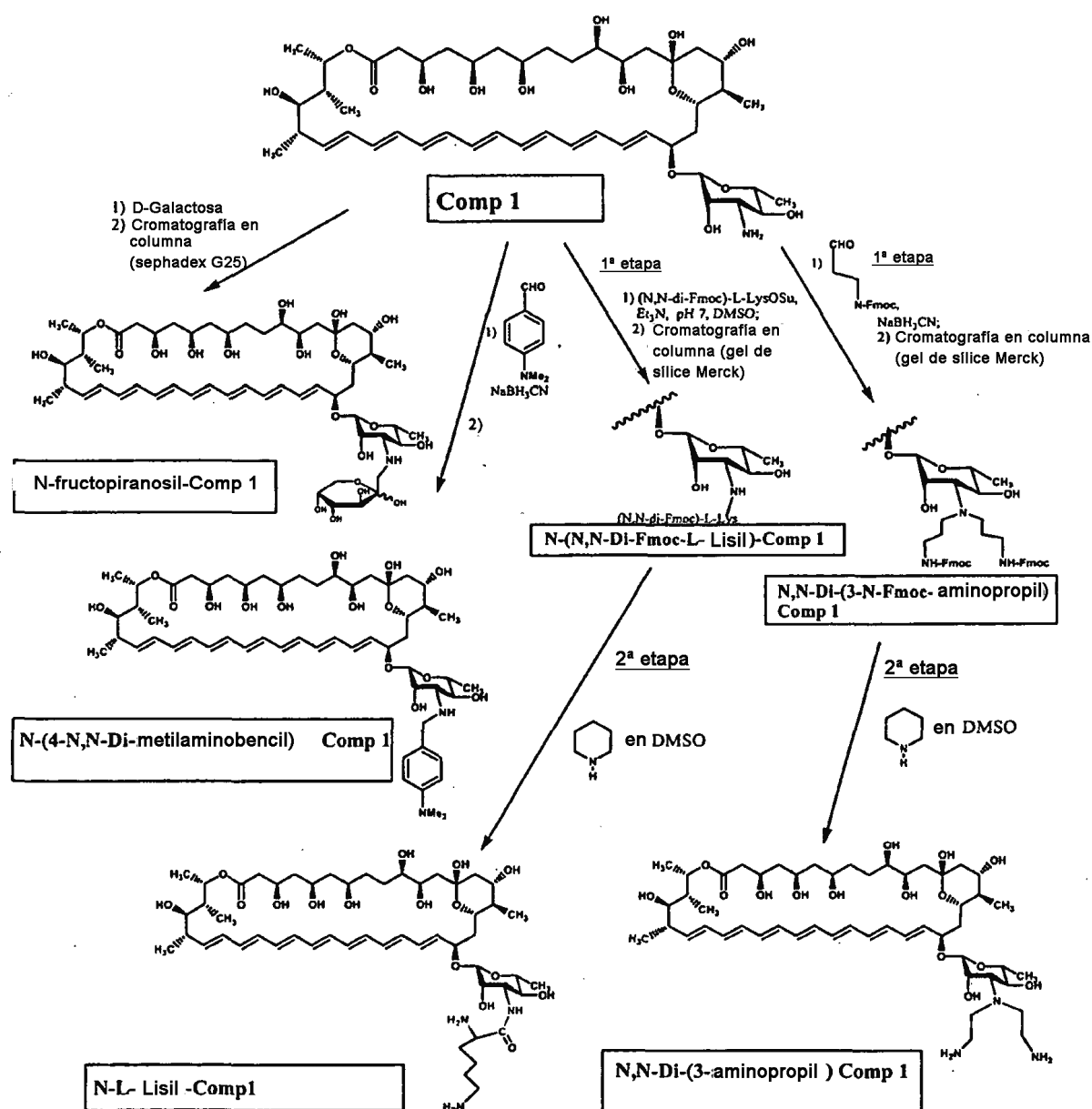


Figura 17

