(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 606 781**

(51) Int. CI.:

A61K 31/70 (2006.01)
C07D 493/08 (2006.01)
C07H 17/08 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2011 PCT/US2011/045112**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12012782**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011 E 11810502 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2595634**

(54) Título: **Macrólidos polienos antifúngicos y antiparasitarios**

(30) Prioridad:

23.07.2010 US 367107 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2017

(73) Titular/es:

ACEA BIOTECH, INC. (100.0%)
3 Embarcadero Center, Suite 460
San Francisco, CA 94111, US

(72) Inventor/es:

TUNAC, JOSEFINO B.

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

Macrólidos polienos antifúngicos y antiparasitarios

DESCRIPCIÓN

Campo

La presente divulgación se refiere a nuevos macrólidos polienos solubles en agua que tienen actividad antifúngica y antiparasitaria de amplio espectro y otras propiedades beneficiosas. La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas y a su uso en métodos terapéuticos que implican la administración de dichos compuestos y composiciones.

Antecedentes

La incidencia de las infecciones fúngicas y la aparición de infecciones fúngicas oportunistas están aumentando (Hajjeh et al., J Clin Microbiol, 42:1519–1527 (2004); Walsh et al., Clin Microbiol Infect, 10 (Supl.1):48–66 (2004)). El aumento en pacientes inmunocomprometidos debido a enfermedades (por ejemplo, SIDA, cáncer, trasplante de órganos) y el uso de dispositivos médicos (Kojic et al., Clin Microbiol Rev, 17(2):255–267 (2004)) contribuyen al sustancial aumento de la aparición de infecciones fúngicas graves. El número limitado de antifúngicos eficaces y no tóxicos, y la aparición de resistencia destacan la necesidad de antifúngicos alternativos. Por ejemplo, la candidiasis es una infección nosocomial importante en pacientes inmunocomprometidos y la micosis más frecuente adquirida en el hospital (Rees et al., Clin Infect Dis, 27:1138–1147 (1998)). La griseofulvina, introducida en 1958, fue el primer fármaco disponible para el tratamiento de las micosis sistémicas graves; la anfotericina B se introdujo en 1960 y sigue siendo la terapia principal para las infecciones graves por *Candida* (Gupta et al., J Am Acad Dermatol, 30:677–698 (1994)). Sin embargo, la utilidad clínica de la anfotericina B se ve obstaculizada por la nefrotoxicidad limitante de la dosis (Sabra et al., Drug Saf, 5:94–108 (1990); Dismukes, Clin Infect Dis, 30:653–657 (2000)). El fluconazol ofrece nuevas opciones para la candidiasis invasiva, pero la aparición de resistencia plantea algunos problemas (Muller et al., J Antimicrob Chemother, 46:338–341 (2000)).

Por lo tanto, se desarrollaron nuevas clases de agentes antifúngicos tales como candinas (pneumocandinas, equinocandinas), nicomicinas y pradamicinas-benanomicinas (Ghannoum et al., Clin Microbiol Rev, 12:501–517 (1999)). Las equinocandinas son compuestos lipopeptídicos semisintéticos dirigidos a la pared celular de los hongos, en particular la biosíntesis de 1,3–β–D–glucano. La cilofungina (N-p-octiloxibenzoilequinocandina, núcleo B), la primera equinocandina desarrollada para los ensayos clínicos, tiene una excelente actividad *in vitro* e *in vivo* contra la candidiasis diseminada (Perfect et al., Antimicrob Agents Chemother, 33:1811–1812 (1989)); sin embargo, el desarrollo clínico de cilofungina se suspendió debido a la toxicidad (Walsh et al., Clin Infect Dis, 14 (Suppl. 1):139–147 (1992)). Una equinocandina mejorada, *Eraxis* (anidulafungina: anidulafungina: equinocandina núcleo B con un grupo de cabeza de terc-fenilo y una cola C5), ha sido aprobado recientemente por la FDA contra las infecciones por *Candida* en la corriente sanguínea que son potencialmente mortales. *Eraxis* administrado por inyección está indicado para la candidemia, la peritonitis (infección de la cavidad abdominal y los abscesos intraabdominales) y la candidiasis esofágica (las tasas de recaída después de la terapia fueron más altas para los pacientes tratados con *Eraxis). Eraxis* no se ha estudiado en la endocarditis, osteomielitis y meningitis por *Candida* y no ha sido estudiado en un número suficiente de pacientes neutropénicos (recuento bajo de glóbulos blancos) para determinar la eficacia (Benjamin et al., Antimicrob Agents Chemother, 50(2):632–663 (2006)).

Antifúngicos principales:

Anfotericina B. El único agente fungicida disponible y sigue siendo “la referencia” para el tratamiento de la mayoría de las micosis sistémicas hoy en día (Khoo et al., J Antimicrob Chemother, 33:203–213 (1994)). La anfotericina B es altamente hidrofóbica y habitualmente se administra como desoxicolato de anfotericina (DAMB), un complejo de micelas de detergente. La anfotericina B suele administrarse por infusión intravenosa; sin embargo, su uso está limitado por su toxicidad sustancial relacionada con la perfusión y orgánica terminal (Gallis et al., Rev Infect Dis, 12:308–328 (1990)). La anfotericina B es insoluble en agua, lo que justifica su toxicidad y escasa biodisponibilidad. Por tanto, se han desarrollado nuevas formulaciones basadas en lípidos (Graybill, Ann Inter Med, 1245:921–923 (1996)): *Abelcet* (ABLC, anfotericina B: complejo lipídico), *Amphocil* (ABCD: dispersión coloidal de anfotericina B); y, *Ambisome* (anfotericina B liposomal). Se ha demostrado que cada uno es sustancialmente menos nefrotóxico que el desoxicolato de anfotericina B (Tollemar et al., Transplantation, 59:45–50 (1995)). A pesar de estas nuevas formulaciones lipídicas, la anfotericina B combinada con el desoxicolato de detergente, sigue siendo la terapia de primera línea para el tratamiento empírico de las infecciones fúngicas oportunistas con mayor actividad *in vivo* y significativamente menos cara que la anfotericina B liposomal (Pahls et al., J Infect Dis, 169:1057–1061 (1994)).

Antifúngicos de azol: El itraconazol *(Sporanox)* es el único azol comercializado eficaz contra la aspergilosis pulmonar o extrapulmonar, en particular para los pacientes resistentes o intolerantes a la anfotericina B (Herbrecht et al., N Engl J Med, 347:408–415 (2002)). El itraconazol es el fármaco de elección contra la histoplasmosis, blastomicosis, paraccocidiodomicosis y coccidioidomicosis meníngea no potencialmente mortales; y, el agente preferido para el tratamiento de la esporotricosis linfocutánea. En la candidemia, el fluconazol (Diflucan) sigue siendo el fármaco de elección en pacientes neutropénicos y no neutropénicos. Sin embargo, la anfotericina B es el agente de elección

contra *C. krusei* o un organismo resistente al fluconazol y en pacientes que desarrollan candidemia durante el tratamiento con fluconazol (Sheehan et al., Clin Microbial Rev, 12:40–79 (1999); Fidel et al., Clin Microbial Rev, 12(1):80–96 (1999)). En general, los azoles tienen un amplio espectro de actividades antifúngicas y son más seguros que la anfotericina B, pero son fungistáticos, que conducen a resistencia y a fracasos clínicos.

Equinocandinas: Las equinocandinas son una clase relativamente nueva de antifúngicos introducida hace unos 15 años (Denning, J Antimicrob Chemother, 49:889–891 (2002)). El primer producto de equinocandina aprobado por la FDA es el acetato de caspofungina (*Cancidas*; Merck); entre los miembros posteriores de la clase se incluyen micafungina (*Mycamine*; Fujisawa) y, más recientemente, (17/02/2006) anidulafungina (*Eraxis;* Pfizer). Aunque las equinocandinas, en general, muestran actividades antifúngicas comparables con los azoles, tienen pesos moleculares elevados y son lipofílicos (poco solubles en agua). La deficiente solubilidad en agua puede explicar su mala absorción oral, lo que limita su utilidad para la administración intravenosa (Hino et al., J Ind Microbiol Biotechnol, 27(3):157–162 (2001)).

Terapia antifúngica con SIDA

La enfermedad del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) se caracteriza por un deterioro gradual de la función inmunitaria, en particular de las células T CD4 positivas (CD4+), debido a la infección por el VIH (virus de inmunodeficiencia humana). Una persona sana tiene, generalmente, de 800 a 1200 células T CD4+ por milímetro cúbico (mm3); una vez que el recuento de células T CD4+ cae por debajo de 200/mm^3, un individuo se vuelve vulnerable a las infecciones oportunistas y cánceres. La FDA ha aprobado diversos agentes antifúngicos de diferentes clases químicas (polienos, pirimidinas, azoles y equinocandinas); sin embargo, el tratamiento a menudo se complica por la toxicidad alta, la tolerabilidad baja o el espectro estrecho (Dismukes, Clin Infect Dis, 30:653–657 (2000)). La terapia intensiva con anfotericina B es el tratamiento de elección en la mayoría de las situaciones.

En la meningitis criptocócica, el régimen favorecido es una "terapia inicial" de la anfotericina B más flucitosina (*Ancobon*) durante 2 semanas o hasta que la afección del paciente se estabilice, seguido de una "terapia de consolidación" de itraconazol o fluconazol durante otras 8-12 semanas (Saag et al., Clin Infect Dis, 30:710–718 (2000)). Sin embargo, la aparición de resistencia al fluconazol después de los tratamientos de larga duración o la profilaxis es un motivo de preocupación creciente (Berg et al., Clin Infect Dis, 26:186–187 (1998)), que ahora requiere una mayor vigilancia y supervisión más extensa (Chandenier et al., J Clin Microbiol Infect Dis, 23:506–508 (2004)). En los pacientes con SIDA y criptococosis extrameníngea (como la de los pulmones, huesos, tejidos blandos, forma diseminada), el itraconazol es muy eficaz, pero no está indicado en la criptococcuria (Denning et al., Arch Intern Med, 149(10):2301–2308 (1989)).

En la meningitis coccidioidal con SIDA, la anfotericina B intratecal ha sido el tratamiento de elección, pero se asocia con problemas de cumplimiento/administración y una incidencia elevada de efectos adversos, tales como toxicidad neurológica (Stevens et al., Semin Respir Infect, 16:263–269 (2001)). Por lo tanto, el fluconazol es la mejor alternativa debido a su administración fácil, una mejor penetración en el LCR y un perfil de toxicidad predecible (Galgiani et al., Clin Infect Dis, 30(4):658–661 (2000)). En la histoplasmosis diseminada con SIDA, la administración inicial intensiva de anfotericina B es el tratamiento de elección, seguido de tratamiento de mantenimiento con itraconazol (Bartlett, Medical management of HIV infections, 113–137 (1999)); el ketoconazol no es recomendable para el tratamiento de mantenimiento debido a su alta tasa de fracaso.

La aspergilosis invasiva es una complicación grave en pacientes con SIDA y se asocia con un mal pronóstico (Marr et al., Infect Dis Clin North Am, 16:875–894 (2002)). La anfotericina B sigue siendo el fármaco de elección, aunque la curación rara vez se logra. El itraconazol está indicado en pacientes con intolerancia a la anfotericina B para el tratamiento de mantenimiento (Dupont, J Am Acad Dermatol, 23:607–614 (1990)), aunque sólo la mitad son clínicamente estables antes de sucumbir a la aspergilosis u otra complicaciones relacionadas con el SIDA (Denning et al., Rev Infect Dis, 12:1147–1201 (1990)). A pesar de la introducción de nuevos antifúngicos (Steinbach et al., Clin Infect Dis, 37:157–187 (2003)), la tasa de mortalidad asociada a la aspergilosis invasiva sigue siendo casi del 100 % en algunos grupos de pacientes (Denning, Clin Infect Dis, 23:608–615 (1996)).

Otra infección fúngica frecuente en pacientes con SIDA es la candidiasis mucosa e invasiva, especialmente la forma orofaríngea (OPC) y esofágica. El fluconazol a dosis altas (400-800 mg/día) sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento (Newman et al., Clin Infect Dis, 19(4):684–686 (1994)); a dosis bajas (150 mg a la semana), es eficaz en la prevención de recaídas. Desafortunadamente, el uso generalizado de fluconazol ha dado lugar a cepas resistentes al fluconazol de C. *albicans* y es un problema importante en los pacientes con SIDA avanzado (Metzger et al., Mycoses, 40(Suppl. 1):56–63 (1997)). La suspensión oral de itraconazol ha demostrado buenos resultados en pacientes con SIDA con OPC clínicamente resistentes al fluconazol (Saag et al., AIDS Res Hum Retroviruses, 15(16): 1413–1417 (1999)), y la candidiasis esofágica responde a 100 mg/día durante al menos 3 semanas, incluyendo 2 semanas después de la resolución de los síntomas (Wilcox et al., J Infect Dis, 176:227–232 (1997)).

Antifúngicos e interacción farmacológica:

Xenobióticos. Sustancias químicas extrañas o fármacos son xenobióticos, que han sido sometidos a un proceso de

destoxificación con enzimas del citocromo P450 (CYP): conversión de fármacos lipofílicos en formas solubles en agua para la excreción en la orina. Un fármaco que inhibe una isozima CYP específica puede disminuir el metabolismo del fármaco y aumentar las concentraciones séricas de los fármacos que son sustratos de dicha isoenzima. Por el contrario, un fármaco que induce una isozima CYP específica puede aumentar el metabolismo del fármaco y disminuir las concentraciones séricas de los fármacos que son sustratos de dicha isoenzima. La interferencia del metabolismo del fármaco por la inducción, supresión, o inhibición de CYP representa algunas de las interacciones farmacológicas más habituales y potencialmente graves que se encuentran en la clínica (Zhou et al., Clin Pharmacokinet, 44(3):279–304 (2005)).

Debido a la naturaleza lipofílica de los fármacos antifúngicos actuales, las interacciones farmacológicas pueden surgir con prácticamente cualquier terapia antifúngica y se producen el tracto gastrointestinal, el hígado y los riñones. Muchas interacciones farmacológicas son el resultado de la inhibición o la inducción del CYP, que cambia la absorción o eliminación del fármaco que interacciona, así como el agente antifúngico (Gubbins et al., Drug Interactions in Infectious Diseases (2001)). En el tracto GI, los cambios en el pH, la formación de complejos con iones o la interferencia con el transporte y procesos enzimáticos en el lumen intestinal pueden interferir con la absorbancia de los fármacos. La inducción o inhibición del metabolismo en el hígado pueden inhibir o acelerar, respectivamente, el aclaramiento del fármaco. En el riñón, la disminución de la filtración glomerular, la secreción tubular activa u otros mecanismos puede retardar la eliminación renal, lo que da como resultado una exposición excesiva a los fármacos.

El sitio principal para el metabolismo de los fármacos es el hígado, donde los compuestos lipofílicos se transforman en metabolitos ionizados para la eliminación renal (Kashuba et al., Drug Interactions in Infectious Diseases (2001)). Los riñones, por lo general conocidos por la excreción de agua, electrolitos, fármacos y otros productos químicos, son también muy activos en la biotransformación de fármacos. El sistema de enzimas CYP en los riñones se ha identificado que es tan activo como el hígado, cuando se corrige para la masa orgánica. Por lo tanto, los pacientes con insuficiencia renal grave que reciben tratamiento farmacológico crónico pueden experimentar acumulación de metabolitos de algunos agentes, así como los compuestos originales.

La anfotericina B tiene varias toxicidades formidables, que se dividen en 2 grandes categorías: toxicidades de infusión (flebitis química, hipoxia, escalofríos, fiebre y náuseas) y nefrotoxicidad (manifestada por insuficiencia renal, hipocalemia, hipomagnesemia, acidosis tubular renal y anemia). La nefrotoxicidad se produce en hasta el 80 % de los pacientes con anfotericina B y se aumenta por el uso concomitante de otros fármacos nefrotóxicos, tales como aminoglucósidos, ciclosporina, cisplatino y compuestos de mostaza de nitrógeno (Gleckman, Infect Dis Clin North Am, 9(3):575–590 (1995)).

Todos los antifúngicos de la clase de los azoles autorizados actualmente por la FDA se metabolizan hasta un cierto grado en el sistema CYP P450. Los derivados de imidazol antifúngicos se utilizan con frecuencia tanto sistémica como tópicamente (en función del agente en particular) en el tratamiento de las infecciones sistémicas y micosis por Candida. Estos derivados, incluyendo ketoconazol (*Nizoral*), miconazol, tioconazol (*Vagistat–1*), clotrimazol (*Lotrimin, Mycelex*), y sulconazol (*Exelderm*), se reconocen como ligandos potentes del átomo de hierro del grupo hemo de P450 (Katz, Br J Dermatol, 141(Suppl 56):26–32 (1999)). El ketoconazol y el itraconazol son bases débiles, prácticamente insolubles en agua, y se ionizan solamente a un pH bajo. En consecuencia, la disolución y la absorción de estos compuestos depende en gran medida de las condiciones gástricas ácidas en el estómago (Lange et al., J Clin Pharmacol, 37:535–540 (1997)). Los fármacos que aumentan el pH gástrico (por ejemplo, antagonistas de H_2, inhibidores de la bomba de protones) retardan la disolución de las formas de dosificación sólidas y disminuyen el fármaco disponible para la absorción en la luz intestinal. Debido a que los fármacos azoles son metabolizados por el sistema del citocromo hepático P-450, se pueden producir diversas interacciones entre estos agentes y otros medicamentos. Los antifúngicos azoles disminuyen el catabolismo de los numerosos fármacos que da como resultado un aumento de las concentraciones séricas de estos medicamentos y el potencial de toxicidad farmacológica (por ejemplo, antagonistas de los receptores de histamina H1, warfarina, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, digoxina, felodipino, lovastatina, midazolam, triazolam, metilprednisolona, glibenclamida, rifabutina, ritonavir, saquinavir, nevirapina, nortriptilina, sulfonilureas, omeprazol, y cisaprida). Por el contrario, ifampicina, isoniazida, fenitoína, fosfenitoína y carbamazepina disminuyen las concentraciones séricas de los triazoles (Albengres et al., Drug Saf, 18(2):83–97 (1998)). La griseofulvina es un inductor del CYP de los fármacos de tipo cumarina y los estrógenos (Kojo et al., Arch Toxicol, 72:336–346 (1998)).

Antifúngicos y la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART). Una de las cuestiones más difíciles con las que se enfrentan los proveedores que tratan a pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el complejo problema de la interacción farmacológica con otros asociada con la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART). Teniendo en cuenta los efectos del inhibidor de la proteasa (PI) y la clase de inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NNRTI) en el sistema CYP450, las interacciones farmacológicas del metabolismo son las más frecuentes y problemáticas cuando se prescribe HAART. Aproximadamente el 50 % de todos los fármacos son sustratos del CYP3A4, incluyendo los inhibidores de la proteasa del VIH (IP) y los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NNRTI). Los fármacos antifúngicos (ketoconazol, itraconazol, fluconazol) y los macrólidos (eritromicina, claritromicina) son inhibidores de CYP3A4 y aumentan las concentraciones plasmáticas de los NITR y Pis (Piscitelli et al., N Engl J Med, 344:984–996 (2001)). El antifúngico

azol ketoconazol es un potente inhibidor potente de CYP3 A4 y aumenta el nivel de exposición farmacológica al saquinavir y al amprenavir en un 190 % y 31 %, respectivamente. Por el contrario, se ha demostrado que ritonavir y lopinavir/ritonavir multiplican por tres los niveles de ketoconazol cuando se usan al mismo tiempo. Por lo tanto, no se recomiendan dosis> 200 mg/día de ketoconazol cuando se utilizan estos medicamentos al mismo tiempo. En general, debe evitarse el uso de ketoconazol con HAART concurrente. El antifúngico azol más reciente, voriconazol (*Vfend),* tiene una actividad significativa contra la aspergilosis y *Candida albicans*, pero debe vigilarse estrechamente en cuanto a la toxicidad, tal como la elevación de las transaminasas y la toxicidad visual.

Por lo tanto, además de los antibióticos no poliénicos clásicos (Gottlieb et al, Ann Rev Phytopathol., 8: 371-380 (1970): cicloheximida, griseofulvina, antimicina, las polioxinas, los oligomicinas y variotina), y las equinocandinas, se siguen descubriendo nuevos antibióticos antifúngicos: diazaquinomicina (Maskey et al., Nat Prod Res, 19(2):137–142 (2005)), norresistomicina y resistoflavina (Kock et al., J Antibiot (Tokio), 58(8):530–534 (2005)), fridamicina (Maskey et al., J Antibiot (Tokio), 56(11):942–949 (2003)) transvalencina (Hoshino et al., J Antibiot (Tokio), 57(12):803–807 (2004)), clavariopsinas – depsipéptidos cíclicos (Kaida et al., J Antibiot (Tokio), 54(1):17–21 (2001)). Las equinocandinas son modificaciones sintéticas de lipopéptidos producidos de forma natural; estos lipopéptidos naturales son producidos por hongos (Denning, J Antimicrob Chemother 49: 889-891 (2002)), que incluyen aculeacina A (*Aspergillus aculeatus),* equinocandina B *(Aspergillus rugulovalvus),* pneumocandina B (*Zalerion arboricola*), enfumafungina (hongos de tipo *Hormonema*) y las papulacandinas (*Papularia sphaerosperma*). Por otro lado, la fengicina es un lipopéptido producido por una bacteria, *Bacillus subtilis* (Vanittanakom et al., J Antibiot (Tokio), 39(7):888–901 (1986)).

Debido a los inconvenientes de los tratamientos antifúngicos existentes, hay una necesidad en la técnica de terapias antifúngicas mejoradas que tienen mayor eficacia, biodisponibilidad y/o efectos secundarios reducidos. En el documento WO 2004/069230 A1 se describe una composición farmacéutica que comprende un agente fisiológicamente activo y un agente de liberación sostenida o mucoadhesivo.
En los documentos WO 2007/063335 A2 y DE 24 17 993 A1 se describen una sal de anfotericina B y meglumina. Beezer et al, Inorganica Chima Acta, vol. 108, 117–122 y Beezer et al, Inorganica Chima Acta, vol. 108, 123–127 describen complejos de polieno con iones metálicos divalentes.
Los resúmenes químicos con números de acceso en la base de datos: 1982:466028, 1985:182317 y 1976:410426 muestran una sal de meglumina de anfotericina B. Los resúmenes químicos con número de acceso en la base de datos 1973: 453751 muestra una sal de etanodioato, una sal de butanodioato y una sal de calcio de anfotericina B.
En la patente de Estados Unidos 2.908.611 se describe la anfotericina A y la anfotericina B y determinadas sales de las mismas.

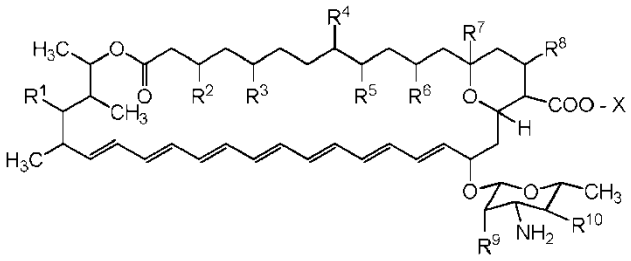
Sumario

La presente divulgación aborda necesidades de hace mucho tiempo en el campo de la medicina proporcionando nuevas composiciones y su uso en métodos para el tratamiento de las infecciones fúngicas y parasitarias. Mientras que los macrólidos polienos, como clase, están limitados por su insolubilidad en agua, la presente divulgación proporciona nuevos macrólidos polienos que son agentes de amplio espectro solubles en agua que exhiben actividades antibióticas, antifúngicas y antiparasitarias con una biodisponibilidad mejorada y baja toxicidad en animales.

La presente invención se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) a continuación para su uso en el tratamiento o la inhibición de la onicomicosis. La presente invención proporciona también el uso de un compuesto de fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y la inhibición de la onicomicosis. La presente invención proporciona también un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento o la inhibición de una infección por protozoos. La presente invención proporciona también el uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y la inhibición por protozoos. Los aspectos proporcionados a continuación que se extienden más allá del alcance de las reivindicaciones se proporcionan solo para referencia.

La presente divulgación proporciona composiciones útiles en métodos para el tratamiento y la inhibición de infecciones fúngicas y parasitarias. La presente divulgación se refiere a nuevos macrólidos polienos, métodos biosintéticos para producir estos macrólidos polienos y su uso en métodos de tratamiento de infecciones fúngicas y parasitarias usando los nuevos macrólidos polienos.

En varios aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones y usos médicos que implican compuestos de estructura (I):

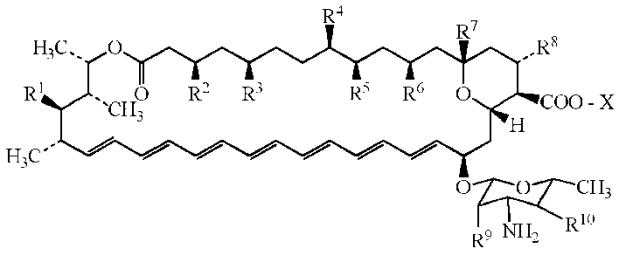


(I)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones y usos médicos que implican compuestos de estructura (II):

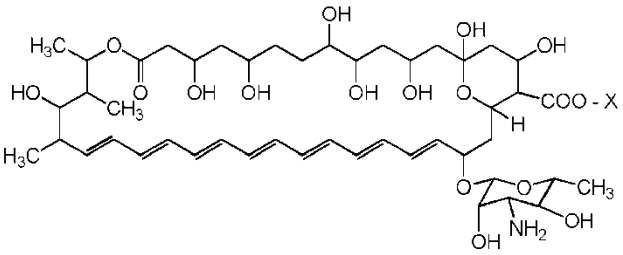


(II)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

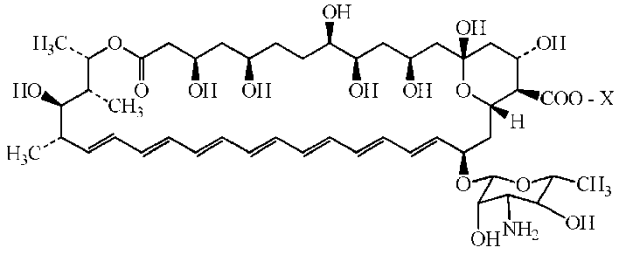
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones y usos médicos que implican compuestos de una de las siguientes estructuras (III) o (IV);



(III)

o

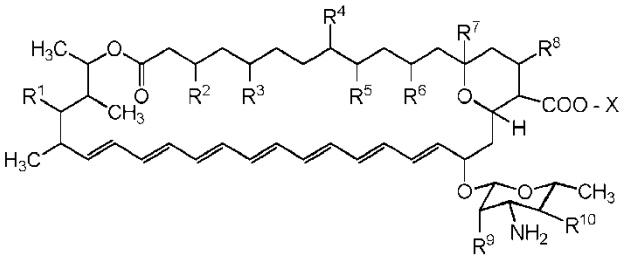


(IV)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que X es sodio.

En varios aspectos, los compuestos de la presente divulgación tienen actividad antifúngica. En varios aspectos, los compuestos de la presente divulgación tienen actividad antibacteriana. En todavía aspectos adicionales, los compuestos de la presente divulgación tienen actividad antiparasitaria.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona un compuesto para su uso en métodos para tratar o inhibir una infección fúngica en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de estructura (I):

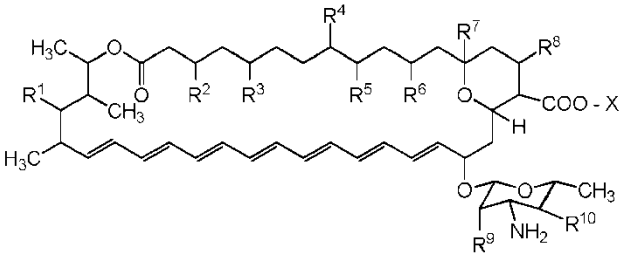


(I)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y X es sodio.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona un compuesto para su uso en métodos para tratar o inhibir una infección parasitaria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de estructura (I):



(I)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y X es sodio.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la presente divulgación junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En ciertos aspectos, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un excipiente. En otros aspectos, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un excipiente potenciador de la permeación. En algunos aspectos, la composición se formula en una forma de dosificación farmacéutica con recubrimiento entérico de liberación controlada.

Breve descripción de las figuras

La **Figura** 1 muestra el análisis LC-MS de corifungina, incluyendo el espectro de masas TIC del pico principal, el cromatograma UV y el cromatograma ELS.

La **Figura** 2 muestra los espectros de masas correspondientes a los picos menores observados en la **Figura** 1.

La **Figura** 3 muestra el análisis LC-MS de corifungina solubilizada en H_2O, incluyendo el espectro de masas TIC del pico principal, el cromatograma UV y el cromatograma ELS.

La **Figura** 4 muestra el espectro de RMN de 1H (500 MHz, DMSO-d6) de la muestra de corifungina (parte superior) y anfotericina B (parte inferior).

La **Figura** 5 muestra el espectro de masas TOF con electropulverización positiva de la corifungina.

La **Figura** 6 muestra el análisis de masas exacto de corifungina.

La **Figura** 7 muestra el análisis MS/MS de corifungina, seleccionada de [M + H] + ion en m/z 924 para la

fragmentación.

La **Figura** 8 muestra el espectro de masas TOF con electropulverización positiva de una muestra dopada con K+ y Na+ de corifungina.

La **Figura** 9 muestra el análisis el análisis de masas exacto de la muestra dopada con K+ y Na+ de corifungina.

La **Figura** 10 muestra el análisis MS/MS de la muestra dopada con K+ y Na+ de corifungina, seleccionando el ion a m/z 962 para la fragmentación.

La **Figura** 11 muestra el espectro visible a los rayos UV de corifungina.

La **Figura** 12 muestra el espectro visible a los rayos UV de anfotericina B.

La **Figura** 13 muestra los perfiles de destrucción en el tiempo de la corifungina contra *C. parapsilosis* en comparación con anidulafungina, voriconazol y anfotericina B.

La **Figura** 14 muestra los perfiles de destrucción en el tiempo de la corifungina contra *C. glabrata* en comparación con anidulafungina, voriconazol y anfotericina B.

La **Figura** 15 muestra los perfiles de destrucción en el tiempo de la corifungina contra *C. albicans* en comparación con anidulafungina, voriconazol y anfotericina B.

La **Figura** 16 muestra el efecto de corifungina sobre la supervivencia en ratones infectados con *C. albicans*. Se inoculó a los ratones por vía intravenosa (i.v.) una DL90-100 de *Candida albicans* (ATCC 44858), 5,2 x 10^5 ufc/ratón en 0,2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) sin mucina. La corifungina se administró por vía oral a los animales de ensayo 1 hora después de la inoculación de hongos. La mortalidad se monitorizó una vez al día durante 15 días.

La **Figura** 17 muestra que la corifungina redujo eficazmente la infección vaginal por *C. albicans* a 50 mg/kg dosis.

La **Figura** 18 muestra el impacto de una sola administración oral de corifungina sobre la carga de *C. albicans* en los riñones de ratones neutropénicos. Se infectó a los ratones neutropénicos por la vena de la cola 2 horas antes de la administración del fármaco. Se administraron dosis únicas de corifungina a los ratones mediante sonda oral. La carga del organismo en el riñón se utilizó como criterio de valoración del tratamiento en el tiempo. Se obtuvieron muestras de grupos de tres ratones en cada punto de tiempo. Cada símbolo representa la media log 10 ufc/riñones de tres ratones y las barras de error representan la desviación estándar. Los símbolos sólidos representan la carga en el organismo en los ratones de control no tratados. Cada dosis de corifungina inhibió el crecimiento del organismo en los riñones durante las primeras 24 horas de estudio. La dosis más alta proporcionó una protección similar durante 48 horas y demostró cierta eficacia a las 96 horas. En los puntos de tiempo de 48 y 96 horas se observó una relación dosis-respuesta. La efectividad en el tiempo una absorción lenta, saturable pero persistente en el tracto gastrointestinal.

La **Figura** 19 muestra el perfil farmacocinético de corifungina administrada por vía oral (v.o.) mediante sonda.

La **Figura** 20 muestra el perfil farmacocinético de corifungina administrada mediante inyección intravenosa (i.v.).

La **Figura** 21 muestra el estado de la enfermedad meningoencefalitis a los 11 día de la infección por *Naegleria fowleri* y después del tratamiento con un control de PBS. **(A)** 10X. **(B)** 20X. **(C)** 40X. **(D)** 60X.

La **Figura** 22 muestra el estado de la enfermedad meningoencefalitis después de la infección por *Naegleria fowleri* y el posterior tratamiento con anfotericina B (9 mg/kg/día durante un total de 10 días). **(A)** 10X. **(B)** 20X. **(C)** 40X. **(D)** 60X.

La **Figura** 23 muestra el estado de la enfermedad meningoencefalitis después de la infección por *Naegleria fowleri* y el posterior tratamiento con corifungina (9 mg/kg/día durante un total de 10 días). **(A)** 10X. **(B)** 20X. **(C)** 40X. **(D)** 60X.

La **Figura** 24 muestra el porcentaje de animales supervivientes como una función del tiempo después del tratamiento por (i) un control, (ii) anfotericina B y (iii) corifungina.

La **Figura** 25 muestra la infección de las células THP-1 con *L. donovani*. **(A), (B), (C) y (D)** representan la detección y segmentación de la célula huésped THP-1 y amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Las imágenes se obtuvieron con el Analizador INCell 1000 (20x) de las células THP-1 infectadas con *L. donovani* y tratadas con 1 % de DMSO ((A) y (B)) o anfotericina B 2 µM ((C) y (D)). E) representa la evolución de la relación entre parásitos y las células huésped y el número de células THP-1 huésped en un curso de tiempo de 72 horas para las muestras tratadas de anfotericina B.

La **Figura** 26 muestra el efecto de corifungina sobre el crecimiento intracelular de *L. donovani* y el crecimiento de las células huésped THP-1. (A) muestra una curva de respuesta a la dosis para corifungina trazando el porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito. Los valores representan la media de dos experimentos independientes. **(B)** Muestra el número de macrófagos THP-1 infectados con *L. donovani* para diferentes condiciones de tratamiento.

La **Figura** 27 muestra la eficacia *in vivo* de corifungina en un modelo de ratón de leishmaniasis. Los ratones Balb/c se infectaron con 10^7 promastigotes de *L. donovani*.

La **Figura** 28 muestra el efecto potenciador de la permeación de quitosano-4-tiobutilamidina (quitosano-TBA) con glutatión (o) en comparación con quitosano modificado (♦) en la mucosa del intestino delgado.

Descripción detallada

En pocas palabras, la presente divulgación proporciona compuestos y composiciones para el tratamiento de infecciones fúngicas y parasitarias.

Cualquier término no definido directamente en el presente documento se entenderá que tiene los significados

asociados habitualmente con ellos como se entiende dentro de la técnica de la presente divulgación. Ciertos términos se tratan en el presente documento para proporcionar orientación adicional al médico en la descripción de las composiciones, dispositivos, métodos y similares de las realizaciones de la presente divulgación y cómo hacer uso de ellas. Se apreciará que lo mismo se puede decir en más de una forma. En consecuencia, se pueden utilizar un lenguaje alternativo y sinónimos para uno cualquiera o más de los términos tratados en el presente documento. No se debe dar importancia sobre si un término se elabora o se discute en el presente documento. Se proporcionan algunos sinónimos o métodos sustituibles, materiales y similares. La mención de uno o unos pocos sinónimos o equivalentes no excluye el uso de otros sinónimos o equivalentes, a menos que se indique explícitamente. El uso de ejemplos, incluyendo ejemplos de términos, es solo a efectos ilustrativos y no limita el alcance y el significado de las formas de realización de la presente divulgación en el presente documento.

Detección selectiva de agentes antifúngicos

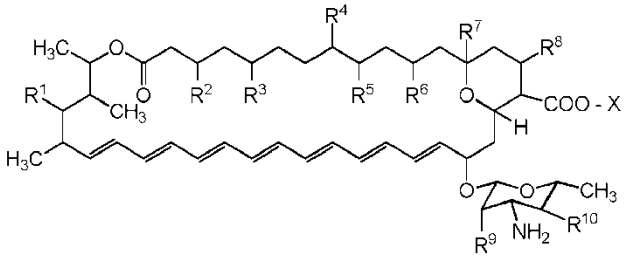
Los agentes antifúngicos se producen por vía sintética o como productos naturales de microorganismos. La detección selectiva de antifúngicos de fuentes naturales, especialmente actinomicetos, predominantemente da macrólidos polienos. Hasta 88 % de los actinomicetos son capaces de producir polienos (Ball et al., J Gen Microbiol, 17:96–101 (1957); Iznaga et al., Phytother Res, 18(6):494–496 (2004)), y hay al menos 185 polienos conocidos. Aunque los polienos no son solubles en agua debido a su estructura macrólido de doble enlace hidrofóbico, se encontró que la hidroheptina es solubles en agua (Tunac et al., J Antibiot (Tokio), 32(12):1230–1238 (1979)). Hasta la fecha, los antibióticos macrólidos polienos son todavía los agentes antifúngicos más eficaces debido a su potente actividad fungicida, de amplio espectro, y relativamente baja frecuencia de la resistencia entre los patógenos fúngicos. Sin embargo, los macrólidos polienos son particularmente tóxicos, causando efectos secundarios graves tales como insuficiencia renal, hipopotasemia y tromboflebitis, especialmente tras la administración intravenosa (Zotchev, Curr Med Chem, 10(3):211–223 (2003)).

Debido a la toxicidad asociada observada con polienos, hay un interés continuo en la detección selectiva de antifúngicos no poliénicos. Con el fin de aumentar las posibilidades de descubrimiento, se están investigando microorganismos o fuentes inusuales, incluidos aislados de actinomicetos clínicos (Lemriss et al., Can J Microbiol, 49:669–674 (2003)), microorganismos del suelo del desierto (Hacene et al., Microbios, 79(319):81–85 (1994)), microorganismos marinos (Bernan et al., Curr Med Chem – Anti–Infective Agents, 3(3):181–195 (2004)), invertebrados marinos (Antonio et al., JNat Prod, 56(1):54–61 (1993)) y organismos extremófilos (Horikoshi, Microbiol Mol Biol Rev, 63:735–750 (1999)) u organismos barófilos, que viven a presiones altas (Abe et al., Trends Biotechnol, 19:102–108 (2001)). ara estrategia consiste en el cambio de medio de cultivo (Tunac, Anticancer Drug Discovery and Development: Natural Products and New Molecular Models (1991)), o el entorno físico como de alta aireación (Tunac, J Ferment Bioeng, 68:157–159 (1989)).

Compuestos

La presente divulgación proporciona composiciones y compuestos para su uso en métodos para tratar o inhibir las enfermedades causadas por infecciones fúngicas o parasitarias. Los compuestos y composiciones de la presente divulgación se pueden administrar solos o en combinación con agentes adicionales y se utilizan para el tratamiento o la inhibición de infecciones fúngicas o parasitarias superficiales o sistémicas.

En varios aspectos, la presente divulgación proporciona compuestos de estructura (I):



(I)

o un isómero farmacéuticamente aceptable de los mismos; en la que:
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio.

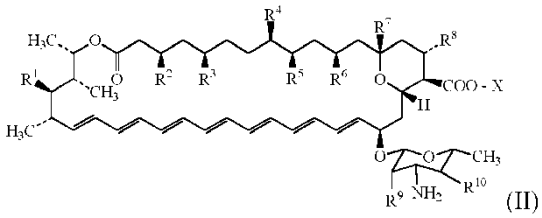
En ciertos aspectos de la estructura (I), el compuesto tiene actividad antifúngica.

En ciertos aspectos de la estructura (I), el compuesto tiene actividad antibacteriana.

En ciertos aspectos de la estructura (I), el compuesto tiene actividad antiparasitaria.

En ciertos aspectos de la estructura (I), el compuesto tiene actividad anti-*leishmania* o actividad anti–*Naegleria*.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona compuestos de estructura (II):



(II)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y X es sodio.

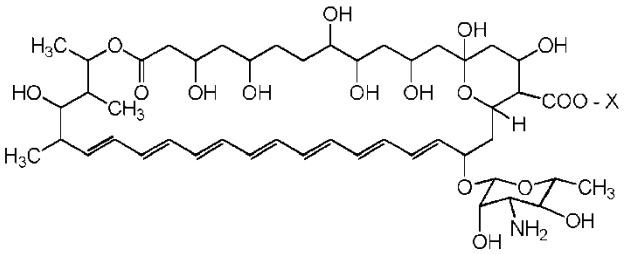
En ciertos aspectos de la estructura (II), el compuesto tiene actividad antifúngica.

En ciertos aspectos de la estructura (II), el compuesto tiene actividad antibacteriana.

En ciertos aspectos de la estructura (II), el compuesto tiene actividad antiparasitaria.

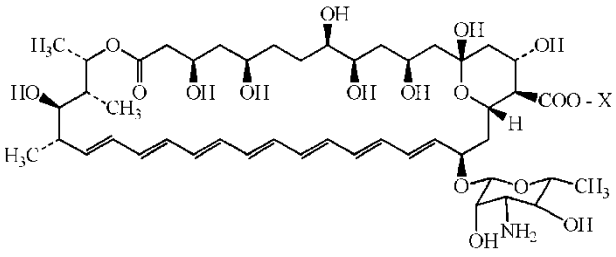
En ciertos aspectos de la estructura (II), el compuesto tiene actividad anti-*leishmania* o actividad anti–*Naegleria*.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona compuestos de una de las siguientes estructuras (III) o (IV);



(III)

o



(IV)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que
X es sodio.

En ciertos aspectos de la estructura (III) o (IV), el compuesto tiene actividad antifúngica.

En ciertos aspectos de la estructura (III) o (IV), el compuesto tiene actividad antibacteriana.

En ciertos aspectos de la estructura (III) o (IV), el compuesto tiene actividad antiparasitaria.

En ciertos aspectos de la estructura (III) o (IV), el compuesto tiene actividad anti-*leishmania* o actividad anti–

Naegleria.

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en la presente solicitud, incluidas la memoria y las reivindicaciones, tienen las definiciones que se proporcionan a continuación. Cabe indicar que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “una” y “el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La definición de los términos de química estándar se puede encontrar en trabajos de referencia, incluidos Carey y Sundberg (1992), Advanced Organic Chemistry 3ª Ed., Vols. A y B (2001), Plenum Press, New York. La práctica de la presente invención empleará, a menos se indique lo contrario, los métodos convencionales de espectroscopia de masas, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Las composiciones y formulaciones descritas en el presente documento pueden ponerse en práctica empleando los excipientes y sales farmacéuticamente aceptables disponibles en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

"Compuestos de la invención" hace referencia a compuestos abarcados por las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV) y (V) divulgadas en el presente documento. Los compuestos de la invención pueden identificarse por su estructura química y/o nombre químico. Cuando la estructura química y el nombre químico están en conflicto, la estructura química es determinante de la identidad del compuesto. Los compuestos de la invención pueden contener uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por tanto, pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros de doble enlace (es decir, isómeros geométricos), enantiómeros o diaestereómeros. De acuerdo con lo anterior, las estructuras químicas representadas en el presente documento abarcan todos los posibles enantiómeros y estereoisómeros de los compuestos ilustrados, incluida la forma estereoisoméricamente pura (p. ej., geométricamente pura, enantioméricamente pura o diaestereoméricamente pura) y mezclas enantioméricas y estereoisoméricas. Las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas pueden resolverse en sus enantiómeros o estereoisómeros componentes utilizando técnicas de separación o técnicas de síntesis quiral bien conocidas por el experto en la materia. Los compuestos de la invención pueden existir también en varias formas tautoméricas, incluyendo la forma enol, la forma ceto y mezclas de las mismas. De acuerdo con esto, las estructuras químicas representadas en el presente documento abarcan todas las posibles formas tautoméricas de los compuestos ilustrados. Los compuestos de la invención también incluyen compuestos marcados isotópicamente, donde uno o más átomos tienen una masa atómica diferente de la masa atómica del que se encuentra convencionalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de la invención incluyen, aunque sin carácter limitante, ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}O, ^{17}O, ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{18}F y ^{36}Cl. Además, debe entenderse, cuando se ilustran estructuras parciales de los compuestos de la invención, que los paréntesis de los guiones indican el punto de unión de la estructura parcial al resto de la molécula.

Los restos químicos a los que se hace referencia como restos químicos como univalentes (por ejemplo, alquilo, arilo, etc.) también abarcan restos multivalentes estructuralmente admisibles, tal como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, aunque un resto "alquilo" en general hace referencia a un radical monovalente (por ejemplo, CH_3CH_2–), en las circunstancias apropiadas, un resto "alquilo" también puede hacer referencia a un radical divalente (por ejemplo, –CH_2CH_2–, que es equivalente a un grupo "alquileno"). De manera similar, en las circunstancias en las que se requiere un resto divalente, los expertos en la técnica entenderán que el término "arilo" se refiere al grupo arileno divalente correspondiente.

Se entiende que todos los átomos tienen su número normal de valencias para la formación de enlaces (por ejemplo, 4 para carbono, 3 para N, 2 para O, y 2, 4, o 6 para S, dependiendo del estado de oxidación del átomo). En ocasiones un resto se puede definir, por ejemplo, como $(A)_aB$, en el que a es 0 o 1. En tales casos, cuando a es 0 el resto es B y cuando a es 1 el resto es AB.

Cuando un sustituyente puede variar en el número de átomos o grupos del mismo tipo (por ejemplo, los grupos alquilo pueden ser C_1, C_2, C_3, etc.), el número de átomos o grupos repetidos puede estar representado por un intervalo (por ejemplo, alquilo C_1–C_6) que incluye todos y cada uno de los números en el intervalo y todos los subintervalos. Por ejemplo, alquilo C_1–C_3 incluye C_1, C_2, C_3, $C_{1–2}$, $C_{1–3}$, y alquilo $C_{2–3}$.

"Alquilamino" hace referencia a un grupo amino sustituido por un grupo alquilo.

"Alcanoílo" hace referencia a un grupo R–C(= O)–, en el que R es un grupo alquilo como se define a continuación.

"Alcoxi" hace referencia a un átomo de O sustituido por un grupo alquilo como se define en el presente documento, por ejemplo, metoxi [–OCH_3,, un alcoxi C_1]. El término "alcoxi $C_{1–6}$ " abarca d alcoxi, C_1, alcoxi C_2, alcoxi C_3, alcoxi C_4, alcoxi C_5, alcoxi C_6 y cualquier subintervalo de los mismos.

"Alquilo", "alquenilo" y "alquinilo" hacen referencia a grupos alifáticos de cadena lineal y ramificada que tienen de 1 a 30 átomos de carbono, o, preferentemente, de 1 a 15 átomos de carbono, o, más preferentemente, de 1 a 6 átomos de carbono, cada uno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes en función de la valencia. Entre los ejemplos de tales grupos se incluyen, sin limitaciones, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, terc-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, vinilo, alilo, isobutenilo, etinilo, y propinilo. El término "alquilo $C_{1–6}$ " abarca alquilo, C_1, alquilo C_2,

alquilo C_3, alquilo C_4, alquilo C_5, alquilo C_6 y cualquier subintervalo de los mismos.

"Alquileno" hace referencia a un radical divalente que es un fragmento de hidrocarburo ramificado o no ramificado que contiene el número especificado de átomos de carbono, y que tiene dos puntos de unión. Un ejemplo es el propileno [$–CH_2CH_2CH_2–$, a C_3alquileno].

“Amino” hace referencia al grupo $-NH_2$.

"Aminoalquilo" hace referencia a un grupo alquilo sustituido por un grupo amino.

"Amina" hace referencia a un grupo –N(R')R", en el que R' y R" se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo, arilo, y alquilarilo.

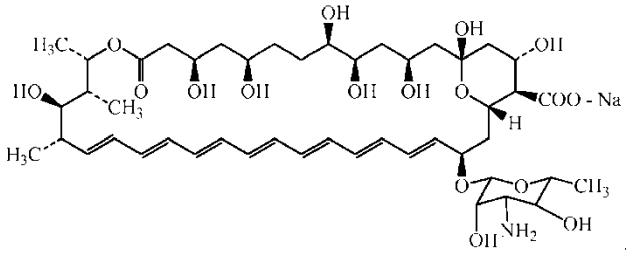
"Arilo" hace referencia a grupos aromáticos que tienen al menos un anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugado e incluye grupos arilo carbocíclico y biarilo, todos los cuales pueden estar opcionalmente sustituidos. Los grupos fenilo y naftilo son grupos arilo carbocíclicos preferentes.

"Aralquilo" o "arilalquilo" hacen referencia a grupos arilo sustituidos con alquilo. Entre los ejemplos de grupos aralquilo se incluyen butilfenilo, propilfenilo, etilfenilo, metilfenilo, 3,5-dimetilfenilo, terc-butilfenilo.

“Cicloalquilo" hace referencia a un anillo, que puede estar saturado o insaturado y ser monocíclico, bicíclico, o tricíclico formado enteramente de átomos de carbono. Un ejemplo de un grupo cicloalquilo es el grupo ciclopentenilo ($C_5H_7–$), que es un grupo cicloalquilo insaturado de cinco carbonos (C_5).

"Carbocíclico" hace referencia a un anillo que puede ser un anillo arilo o un anillo cicloalquilo, ambos como se ha definido anteriormente.

"Corifungina" hace referencia a la sal de sodio de la anfotericina B como se muestra a continuación en la estructura (V):



(V)

"Heterociclo" hace referencia a un sistema de anillo cicloalquilo de 5 a 7 miembros que contiene 1, 2 o 3 heteroátomos, que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de N, O o S, y que contiene opcionalmente un doble enlace.

“Halógeno" ” se refiere al radical de átomo de cloro, bromo, flúor o yodo. El término "halógeno" contempla también los términos "halo" o "haluro".

"Halo-alquilo" hace referencia a un grupo alquilo sustituido con un halógeno.

"Heteroátomo" hace referencia a un átomo que no es carbono, en el que son preferentes los heteroátomos de boro, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo, siendo particularmente preferentes los heteroátomos de nitrógeno, oxígeno y azufre, en los compuestos de la presente divulgación.

Heteroarilo" hace referencia a grupos arilo que tienen de 1 a 9 átomos de carbono y el resto de los átomos son heteroátomos, e incluye los sistemas heterocíclicos descritos en "Handbook of Chemistry and Physics," 49ª edición, 1968, R. C. Weast, editor; The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio. Véase en particular la Sección C, Reglas para la nomenclatura de compuestos orgánicos, B. Sistemas heterocíclicos fundamentales. Entre los heteroarilos adecuados se incluyen furanilo, tienilo, piridilo, pirrolilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, y similares.

"Hidroxialquilo" hace referencia a un fragmento de hidrocarburo ramificado o no ramificado vehículo de un grupo hidroxi (-OH). Entre los ejemplos se incluyen hidroximetilo ($–CH_2OH$, un hidroxialquilo C_1) y 1–hidroxietilo ($–CHOHCH_3$, un hidroxialquilo C_2).

“Isómero” hace referencia a compuestos de la presente invención que poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, enantiómeros, isómeros geométricos, isómeros

estructurales e isómeros individuales están destinados a estar abarcados dentro del alcance de la presente invención.

"Sulfinilo", utilizado solo o unido a otros términos tales como alquilsulfonilo, denota, respectivamente, radicales divalentes S(O)-.

"Alquilsulfinilo" o "sulfinilalquilo" son, como se usa en el presente documento, solos o como parte de otro grupo, para hacer referencia a un grupo alquilo, como se define en el presente documento, unido a un resto molecular parental mediante un grupo sulfinilo, como se define en el presente documento.

"Sulfonilo", como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, hace referencia a un grupo SO_2. El resto SO_2 está opcionalmente sustituido.

“Alquilsulfonilo" o "aminosulfonilo" hacen referencia a un grupo alquilo o amino, como se define en el presente documento, unido a un resto molecular parental mediante un grupo sulfonilo, como se define en el presente documento.

"Tioalquilo" o "alquiltio" hacen referencia a un átomo de azufre sustituido por un grupo alquilo, por ejemplo, metiltio, butiltio, y similares.

Un resto "sustituido" es un resto en el que uno o más átomos de hidrógeno han sido sustituidos independientemente con otro sustituyente químico. Como ejemplo no limitante, entre los grupos fenilo sustituidos se incluyen 2-fluorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 3-cloro-4-fluorofenilo, y 2-fluoro-3-propilfenilo. En algunos casos, un grupo metileno (–CH_2–) está sustituido con oxígeno para formar un grupo carbonilo (–CO).

Un grupo "opcionalmente sustituido" puede estar sustituido con de uno a cuatro, o preferentemente de uno a tres, o, más preferentemente, uno o dos sustituyentes que no son hidrógeno. Entre los ejemplos de sustituyentes adecuados se incluyen, sin limitaciones, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aroílo, halo, hidroxi, oxo, nitro, alcoxi, amino, imino, azido, mercapto, acilo, carbamoílo, carboxi, carboxamido, amidino, guanidino, sulfonilo, sulfinilo, sulfonamido, formilo, ciano, y ureido.

Los compuestos de la presente divulgación pueden existir como estereoisómeros, en los que hay centros asimétricos o quirales presentes. Los estereoisómeros se designan (R) o (S) dependiendo de la configuración de los sustituyentes alrededor del átomo de carbono quiral. Los términos (R) y (S) utilizados en el presente documento son configuraciones como se define en IUPAC 1974 Recommendations for Section E, Fundamental Stereochemistry, Pure Appl. Chem., (1976), 45: 13–30. La presente divulgación contempla diversos estereoisómeros y mezclas de los mismos y están específicamente incluidos dentro del alcance de la presente divulgación. Los estereoisómeros incluyen enantiómeros, diastereómeros y mezclas de enantiómeros o diastereómeros. Los estereoisómeros individuales de compuestos de la presente divulgación se pueden preparar sintéticamente a partir de materiales de partida disponibles comercialmente que contienen centros asimétricos o quirales o mediante la preparación de mezclas racémicas, seguido de resolución bien conocida por los expertos versados en la técnica. Estos métodos de resolución se ilustran mediante (1) unión de una mezcla de enantiómeros a un auxiliar quiral, separación de la mezcla resultante de diastereómeros por recristalización o cromatografía y liberación del producto ópticamente puro del auxiliar o (2) separación directa de la mezcla de enantiómeros ópticos en columnas cromatográficas quirales.

Además, los restos divulgados en el presente documento que existen en múltiples formas tautoméricas incluyen todas estas formas comprendidas por una estructura tautomérica dada.

“Farmacéuticamente aceptable” significa aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. Puede ser un material que no es biológicamente o, de otro modo, indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar ningún efecto biológico indeseable o interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

La expresión “sal farmacéuticamente aceptable” de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Dichas sales incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido y sales de adición de base.

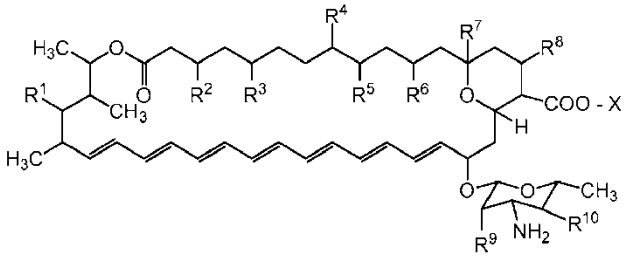
“Sales de adición de ácido” de acuerdo con la presente divulgación se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o se forman con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4—metilbiciclo-[2,2,2]oct-2-en-1-carboxílico, ácido

glucoheptónico, ácido 4,4'-metilenbis-(3-hidroxi-2-en-2-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares.

Las "sales de adición de base" de acuerdo con la presente divulgación se forman cuando un protón ácido presente en el compuesto parental se reemplaza por un ion metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica. Entre las bases orgánicas aceptables se incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido potásico, carbonato sódico, hidróxido sódico y similares. Debe entenderse que una referencia a una sal farmacéuticamente aceptable incluye las formas de adición de disolvente o formas cristalinas de las mismas, particularmente solvatos o polimorfos. Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente y a menudo se forman durante el procedimiento de cristalización. Se forman hidratos cuando el disolvente es agua o se forman alcoholatos cuando el disolvente es alcohol. Los polimorfos incluyen las diferentes disposiciones de empaquetamiento en cristal de la misma composición elemental de un compuesto. Normalmente, los polimorfos tienen diferentes patrones de difracción en rayos X, espectros en infrarrojos, puntos de ebullición, densidad, dureza, forma del cristal, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. Varios factores tales como el disolvente de recristalización, la tasa de cristalización y la temperatura de almacenamiento pueden producir que una forma en cristal sencillo domine.

Síntesis de compuestos

En el presente documento también se describen métodos de síntesis de los compuestos de la presente divulgación. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para producir un compuesto de estructura (I):



(I)

o un isómero farmacéuticamente aceptable de los mismos; en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y

X es un catión farmacéuticamente aceptable, en el que el catión es un catión orgánico o es un catión de aluminio, calcio, litio, magnesio o cinc;

Comprendiendo el método las etapas de:

combinar microorganismos con un medio de siembra que tiene un pH y una temperatura adecuados;

Combinar los microorganismos con un medio complejo;

Fermentar los microorganismos en el medios complejo;

Formar un producto de fermentación;

aislar el producto de fermentación mediante la extracción del producto de fermentación en un disolvente orgánico; y

formar la sal del producto de fermentación mediante la combinación del producto de fermentación con un catión farmacéuticamente aceptable, en el que el catión es un catión orgánico o es un catión de aluminio, calcio, litio, magnesio o cinc, formando de ese modo el compuesto de estructura (I).

Los compuestos de la presente divulgación se pueden sintetizar utilizando cualquier microorganismo adecuado. Entre los microorganismos adecuados de acuerdo con la presente divulgación se incluyen, por ejemplo, *Streptomyces nodosus* y mutantes del mismo. En diversos aspectos de la presente divulgación, se puede utilizar la cepa NRRL B–2371 de *Streptomyces nodosus* para sintetizar los compuestos de la presente divulgación. Las condiciones de pH y temperatura se pueden ajustar con el fin de optimizar la producción de los presentes compuestos. Típicamente, la agitación y la aireación del cultivo celular mejoran la producción del compuesto.

De acuerdo con un aspecto de los presentes métodos, los microorganismos se inocularon inicialmente en un medio de siembra líquido que comprende 1,0 % de dextrosa, 0,3 % de pelusa de soja, 0,3 % de levadura de cerveza (Tunac, J Ferment Bioeng, 68:15 – 159 (1989)), seguido de incubación y agitación durante la noche. Los compuestos pueden producirse mediante fermentación en un medio complejo que comprende 4,0 % de dextrosa, 2,0 % de pelusa de soja, 0,5 % de levadura de cerveza y 0,5 % de carbonato de calcio usando aireación y agitación.

La modificación de estas condiciones de reacción permite la producción de compuestos relacionados.

En varios aspectos, el pH de los medios de siembra está entre aproximadamente pH 3 y aproximadamente pH 10. En aspectos adicionales, el pH del medio de siembra está entre aproximadamente pH 5 y pH 7. En ciertos aspectos, el pH del medio de siembra es de aproximadamente pH 6. En varios aspectos, la temperatura de reacción está entre 18 ºC y 33 ºC. En aspectos adicionales, la temperatura de reacción está entre 21 ºC y 27 ºC. En ciertos aspectos, la temperatura de reacción es de aproximadamente 24 ºC. En diversos aspectos, los compuestos de la presente divulgación pueden extraerse utilizando un disolvente orgánico, en el que el disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, butanol y acetato de etilo.

Los compuestos de la presente divulgación se pueden producir a mayor escala mediante el uso de un biorreactor adecuado (por ejemplo, Tunac, patente de Estados Unidos n.º 5.075.234 (1991)), (incluyendo *Airmentors* de tamaño 94,6, 378,5, 1892,7liter 25, 100, 500 galones).

En matraces de agitación, la aireación se logra agitando los matraces para llevar a cabo la mezcla íntima del medio inoculado con el aire. En fermentadores de tanque estacionario, la agitación es proporcionada por los impulsores, que pueden adoptar la forma de turbinas de disco, discos de paletas o turbina abierta o propulsores marinos. La aireación se logra rociando aire u oxígeno en la mezcla agitada.

De acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, los productos de fermentación se pueden aislar y purificar a partir de los microorganismos de origen. Típicamente, el micelio se separa de todo el caldo por filtración o centrifugación después de un período de crecimiento adecuado. A continuación, el micelio puede extraerse por medio de un disolvente adecuado. Entre los disolventes adecuados se incluyen metanol, etanol, isopropanol, butanol, acetato de etilo, y disolventes similares. A continuación, el extracto de disolvente se evapora al vacío hasta sequedad y se lava con un segundo disolvente, por ejemplo acetona o similar.

Después, el producto de fermentación puede secarse en un desecador y procesarse adicionalmente para dar varias sales o solvatos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del producto de fermentación que contiene un resto básico o ácido por procedimientos químicos convencionales. Generalmente, las sales se preparan poniendo en contacto la base o ácido libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido o base inorgánico u orgánico formador de la sal deseada, en un disolvente o dispersante adecuado o a partir de otra sal mediante intercambio de cationes o de aniones. Los disolventes adecuados son, por ejemplo, acetato de etilo, éter, alcoholes, acetona, THF, dioxano o mezclas de estos disolventes.

En varios aspectos, se forma una sal de un catión inorgánico. En ciertos aspectos, se forma una sal de sodio, potasio, aluminio, calcio, litio, magnesio o cinc. Por ejemplo, en ciertos aspectos, la corifungina puede producirse mediante el tratamiento del producto de fermentación anterior con NaOH.

En varios aspectos, se forma la sal de un catión orgánico. En ciertos aspectos se forma una sal de una amina, alquilo C_1–C_{10}, haloalquilo C_1–C_6, alquenilo C_2–C_6, alquinilo C_2–C_6, sulfinilalquilo C_1–C_6, sulfonilalquilo C_1–C_6, tioalquilo C_1–C_6, aminoalquilo C_1–C_6, hidroxialquilo C_1–C_6, arilalquilo, cicloalquilo, heterociclo o heteroarilo. En aspectos adicionales, se forma una sal de una amina, en la que la amina es de tetrametilamonio, amoníaco, etilendiamina, N-metilglucamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, 1 -p-clorobencil-2-pirrolidin-1'-metIlbencimidazol, dietilamina, piperazina, morfolina, 2,4,4-trimetil-2-pentamina, o tris(hidroximetil)aminometano.

Formulaciones farmacéuticas y modos de administración

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende los compuestos de la presente divulgación junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. Tales excipientes incluyen líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, y similares.

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” hace referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra un compuesto de la presente divulgación. Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente del agente para proporcionar el resultado biológico deseado. Dicho resultado puede ser la reducción y/o alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para usos terapéuticos es la cantidad de la composición que comprende uno o más compuestos macrólidos polienos divulgados en el presente documento requeridos para tratar las enfermedades causadas por infecciones fúngicas para proporcionar una disminución clínicamente significativa de las infecciones. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad “eficaz” adecuada en cualquier caso individual usando únicamente experimentación rutinaria.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania. Mack

Publishing Company, 1990). Por ejemplo, se puede usar solución salina estéril o solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes. Por ejemplo, se pueden añadir benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico como conservantes. *Id.* en 1449. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. *Id.*

Los excipientes adecuados para formulaciones no líquidas también son conocidos por los expertos en la técnica. Una discusión minuciosa de los excipientes y sales farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

Adicionalmente, en dichos vehículos también puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampón biológicas, tensioactivos y similares. Un tampón biológico puede ser cualquier solución que sea farmacológicamente aceptable y que proporciona la formulación con el pH deseado, es decir un pH dentro del intervalo fisiológicamente aceptable. Ejemplos de soluciones tampón incluyen solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada con Hank y similares.

Dependiendo del modo de administración pretendido, las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de formas de dosificación sólidas semisólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, cremas, ungüentos, lociones o similares, preferentemente en forma de dosificación unitaria adecuada para la administración única de una dosis precisa. Las composiciones incluirán una cantidad eficaz del fármaco seleccionado, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes farmacéuticos, adyuvantes, diluyentes, tampones, etc.

Las composiciones incluirán una cantidad eficaz del fármaco seleccionado, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes farmacéuticos, adyuvantes, diluyentes, tampones, etc.

La presente divulgación incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente divulgación, incluyendo isómeros, mezclas racémicas o no racémicas de isómeros, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos.

La presente divulgación incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente divulgación, incluyendo isómeros, mezclas racémicas o no racémicas de isómeros, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos.

La presente divulgación proporciona compuestos y composiciones para su uso en métodos de tratamiento de infecciones fúngicas y parasitarias. Las infecciones fúngicas y parasitarias pueden ser superficiales o sistémicas. Los métodos de la presente divulgación comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente divulgación.

En general, los compuestos de la presente divulgación se administrarán en una cantidad terapéuticamente efectiva mediante cualquiera de los modos de administración aceptados. Los intervalos de dosificación adecuados dependen de numerosos factores, tales como la gravedad de la enfermedad que se va a tratar, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto utilizado, la vía y la forma de administración, la indicación hacia la que la administración está dirigida, y las preferencias y experiencia del practicante médico involucrado. Un experto ordinario en la técnica de tratar tales enfermedades será capaz, sin experimentación indebida y confiando en el conocimiento personal y la divulgación de la presente solicitud, de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente divulgación para una enfermedad dada.

Por lo tanto, los compuestos de la presente divulgación se pueden administrar en forma de formulaciones farmacéuticas que incluyen aquellas adecuadas para administración oral (incluyendo bucal y sublingual), administración rectal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación. En ciertos aspectos, la forma de administración es intravenosa, oral o tópica mediante un régimen de dosificación diaria conveniente que puede ajustarse de acuerdo con el grado de afección.

Para composiciones sólidas, vehículos sólidos no tóxicos convencionales incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato, y similares. Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables pueden prepararse, por ejemplo, mediante disolución, dispersión etc. de un compuesto activo como se ha descrito en el presente documento y adyuvantes farmacéuticos en un excipiente tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol y similares, para formar de este modo una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que se va a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón del pH y

similares, por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, etc. Los métodos reales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente.

Se administrará al sujeto una cantidad farmacéutica o terapéuticamente eficaz de la composición. La cantidad eficaz precisa variará de un sujeto a otro y dependerá de la especie, la edad, el tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y la extensión de la afección a tratar, las recomendaciones del médico encargado del tratamiento y la terapéutica o combinación de terapéuticas seleccionada para administración. Por lo tanto, la cantidad eficaz para una situación dada puede determinarse mediante experimentación de rutina. Para los propósitos de la presente divulgación, en general, una cantidad terapéutica estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, en al menos una dosis. En los mamíferos grandes, la dosificación diaria indicada puede ser de aproximadamente 1 mg a 300 mg, una o más veces al día, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10 mg a 200 mg. Se puede administrar al sujeto tantas dosis como sea necesario para reducir y/o aliviar los signos, síntomas o causas del trastorno en cuestión, o llevar a cabo cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Cuando se desee, las formulaciones pueden prepararse con recubrimientos entéricos adaptados para la administración de liberación sostenida o controlada del principio activo.

Las preparaciones farmacéuticas están, preferentemente, en formas de dosificación unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación empaquetada, en la que el paquete contiene cantidades pequeñas de la preparación, tal como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Asimismo, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, gragea o pastilla, o puede ser el número adecuado de cualquiera de estas en forma envasada.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende uno de los compuestos de estructura (I), (II), (III) o (IV), junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En ciertos aspectos, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un excipiente. En otros aspectos, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un excipiente potenciador de la permeación.

Administración oral

En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuados para administración oral. Para la administración oral, la composición tendrá, generalmente, la forma de un comprimido, cápsula, una cápsula de gelatina blanda, o puede ser una solución acuosa o no acuosa, suspensión o jarabe. Los comprimidos y cápsulas son formas de administración oral preferentes. Los comprimidos y cápsulas para uso oral pueden incluir uno o más vehículos de uso habitual, tales como lactosa y almidón de maíz. También se añaden de forma habitual agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Típicamente, los compuestos de la presente divulgación se pueden combinar con un vehículo oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, un vehículo inerte tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar a la mezcla agentes aglutinantes, lubricantes, disgregantes y colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, goma de tragacanto o alginato sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitaciones, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma de xantano y similares.

Por tanto, las cápsulas se pueden preparar mediante procedimientos convencionales de manera que la unidad de dosificación sea 100 mg de los compuestos de la presente divulgación, 100 mg de celulosa y 10 mg de estearato de magnesio. También se pueden preparar un gran número de cápsulas unitarias cargando cápsulas de gelatina dura convencionales de dos piezas con 100 mg de principio activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 10 mg de estearato de magnesio. O los comprimidos se pueden preparar por procedimientos convencionales de manera que la unidad de dosificación sea de 100 mg de los compuestos de la presente divulgación, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 10 mg de estearato de magnesio. Un gran número de comprimidos se puede preparar también por procedimientos convencionales de manera que la unidad de dosificación fue de 100 mg de los compuestos de la presente divulgación, y otros ingredientes pueden ser 0,2 mg de dióxido de silicio coloidal, 5 mg de estearato de magnesio, 250 mg de microcristalina celulosa, 10 mg de almidón y 100 mg de lactosa. Se pueden aplicar recubrimientos adecuados para incrementar la palatabilidad o retrasar la absorción.

Cuando se utilizan suspensiones líquidas, el agente activo se puede combinar con cualquier vehículo inerte farmacéuticamente aceptable oral, no tóxico tal como etanol, glicerol, agua, y similares, y con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea se pueden añadir también agentes aromatizantes, colorantes y/o edulcorantes. Otros componentes opcionales para incorporación en una formulación oral en el presente documento incluyen, entre otros, conservantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y similares.

Además de los elementos descritos anteriormente, los sistemas de administración oral de fármacos de la presente invención también pueden comprender excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, aglutinantes, estabilizantes, agentes formadores de volumen, agentes conservantes (por ejemplo, hidroxibenzoatos de metilo, etilo y propilo, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado), agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes de suspensión y agentes disgregantes (por ejemplo, crospovidona, croscarmelosa de sodio). El sistema se puede proporcionar en cualquier forma de dosificación adecuada para administración oral, tal como un comprimido, una cápsula, una pastilla, un gránulo, gránulos finos, una pastilla para chupar y un polvo. Preferentemente, el sistema se administra en forma de un comprimido o cápsula.

Administración parenteral

En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuados para administración parenteral.

Se pueden preparar formulaciones parenterales en formas convencionales, bien como soluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas adecuadas para solubilización o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Preferentemente, las suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando vehículos, agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La formulación inyectable estéril también puede ser una solución o una suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos, convencionalmente se emplean aceites fijos, ésteres grasos o polioles estériles como disolventes o medios de suspensión. Además, la administración parenteral puede implicar el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de tal manera que se mantiene un nivel constante de dosificación.

La administración parenteral incluye las vías intraarticular, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, y subcutánea e incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos, que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor que se pretenda;,y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. La administración a través de ciertas vías parenterales puede implicar la introducción de las formulaciones de la presente divulgación en el cuerpo de un paciente a través de una aguja o un catéter, impulsado por una jeringa estéril o algún otro dispositivo mecánico, tal como un sistema de infusión continua. Una formulación proporcionada por la presente divulgación se puede administrar usando una jeringa, inyector, bomba, o cualquier otro dispositivo reconocido en la técnica para administración parenteral.

Preferentemente, las suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando vehículos, agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La formulación inyectable estéril también puede ser una solución o una suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean aceites fijos, ésteres grasos o polioles estériles como disolventes o medios de suspensión. Además, la administración parenteral puede implicar el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de tal manera que se mantiene un nivel constante de dosificación.

Para la administración parenteral, las preparaciones de acuerdo con la presente divulgación incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Dichas formas de dosificación pueden también contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, mediante la incorporación de agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones bacterias o calentando las composiciones. También se pueden fabricar utilizando agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes de usar.

Las formulaciones pueden contener, opcionalmente, un agente de isotonicidad. Las formulaciones contienen, preferentemente, un agente de isotonicidad, y la glicerina es el agente de isotonicidad más preferente. La concentración de glicerina, cuando se usa, está en el intervalo conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml.

El pH de las formulaciones parenterales puede controlarse con un agente tampón, tal como fosfato, acetato, TRIS o L-arginina. La concentración del agente tampón es, preferentemente, adecuada para proporcionar tamponamiento del pH durante el almacenamiento para mantener el pH a un pH objetivo ± 0,2 unidades de pH. El pH preferente está entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8, cuando se mide a temperatura ambiente.

Otros aditivos, tales como solubilizantes farmacéuticamente aceptables como Tween 20® (polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán), Tween 40® (polioxietileno (20) monopalmitato de sorbitán), Tween 80® (polioxietileno (20) monooleato de sorbitán), Pluronic F68® (copolímeros de bloque de polioxietileno polioxipropileno) y PEG (polietilenglicol) pueden añadirse opcionalmente a la formulación y pueden ser útiles si las formulaciones entran en contacto con los materiales plásticos. Además, las formulaciones parenterales pueden contener varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenes, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares.

Se preparan soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de uno o más de los compuestos de la presente divulgación en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados en lo que antecede, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y/o liofilización, que dan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar. Por tanto, por ejemplo, una composición parenteral adecuada para administración mediante inyección se prepara agitando 1,5 % en peso del principio activo en 10 % en volumen de propilenglicol y agua. La solución se convierte en isotónica con cloruro sódico y se esterilizará.

Administración tópica

En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuados para administración tópica. En algunos aspectos, el potenciador de la permeación comprende una base. En ciertos aspectos, la base está presente a una concentración suficiente para proporcionar un pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente 7,5 a 13,0, preferentemente de aproximadamente 8,0 a 11,5, y lo más preferentemente, de aproximadamente 8,5 a 10,5.

En ciertos aspectos, la composición farmacéutica es acuosa. En algunos aspectos, la composición farmacéutica acuosa es una crema, gel, loción, pasta o solución. En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden además un vehículo tópico farmacéuticamente aceptable; un agente potenciador de la permeación de la piel que comprende un hidróxido inorgánico; y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno cualquiera de los compuestos de estructura (I), (II), (III), o (IV). En ciertos aspectos, el hidróxido inorgánico es hidróxido de amonio, hidróxido de metal alcalino, hidróxido de metal alcalinotérreo, o una combinación de los mismos. En otros aspectos, el hidróxido inorgánico es hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio, o una combinación de los mismos. En todavía aspectos adicionales, el hidróxido inorgánico es hidróxido de sodio.

En diversos aspectos, las presentes composiciones farmacéuticas comprenden una base. En aspectos adicionales, la base es una base inorgánica. Ejemplos de bases inorgánicas hidróxidos inorgánicos, óxidos inorgánicos, sales inorgánicas de ácidos débiles, y combinaciones de los mismos. Las bases inorgánicas preferidas son aquellas cuyas soluciones acuosas tienen un pH alto y son aceptables como aditivos alimentarios o farmacéuticos. Ejemplos de tales bases inorgánicas preferidas son las enumeradas a continuación, junto con sus respectivos valores de pH. Algunas de las bases se identifican por sus formas de hidrato y se entiende que cuando se hace referencia a una "base", se pretende incluir tanto las formas hidratadas como las no hidratadas.

En ciertos aspectos, las presentes composiciones farmacéuticas comprenden una base inorgánica. Los ejemplos de bases inorgánicas con sus respectivos valores de pH y de concentraciones se proporcionan a continuación: hidróxido de amonio (pH 11,27 (1 N), pH 10,27 (0,001 N)); hidróxido de sodio (pH 14 (5 %), pH 13 (0,5 %), pH 12 (0,05 %)); hidróxido de potasio (pH 13,5 (0,1 M)); hidróxido de calcio (pH 12,4 (solución saturada en agua)); hidróxido de magnesio (pH 9,5 a 10,5); óxido de magnesio (pH 10,3 (solución acuosa saturada)); óxido de calcio (soluble en agua como $Ca(OH)_2$); acetato de sodio (pH 8,9 (0,1 N)); acetato de sodio, trihidrato (pH 8,9 (0,1 N); acetato de sodio, anhidro (pH ~ 8,9 (0,1 N)); decahidrato de borato de sodio (pH 8,8-9,4, 9,15-9,2 (0,01 M)); borato de sodio (pH 8,8-9,4, 9,15-9,2 (0,01 M)); metaborato de sodio (fuertemente alcalino); carbonato de sodio (pH ~ 11,6); carbonato de sodio hidrato (pH ~ 11,6); carbonato de sodio anhidro (pH ~ 11,6); bicarbonato de sodio (pH 8,3 (0,1 M fresco)); fosfato de sodio, tribásico (pH ~ 11,5 (0,1 %), pH ~ 11,7 (0,5 %), pH ~ 11,9 (1,0 %)); fosfato de sodio, dodecahidrato tribásico (pH 11,5 (0,1 %), pH 11,7 (0,5 %), pH 11,9 (1,0 %)); fosfato de sodio, dibásico (pH 9,1 (1 %) anhidro); fosfato de sodio, dibásico, heptahidrato (pH ~ 9,5); fosfato de sodio, dibásico (pH ~ 9,5); fosfato de sodio, dibásico, deshidratado (pH ~ 9,5); fosfato de sodio dibásico, dodecahidrato (pH ~ 9,5); carbonato de potasio (pH ~ 11,6); bicarbonato de potasio (pH 8,2 (0,1 M)); citrato de potasio (pH ~ 8,5); citrato de potasio, monohidrato (pH 8,5); acetato de potasio (pH 9,7 (0,1 M)); fosfato de potasio (la solución acuosa es ligeramente dibásica alcalina); fosfato de potasio tribásico (la solución acuosa es fuertemente alcalina); fosfato de amonio dibásico (pH ~ 8). Detalles adicionales con respecto a las bases inorgánicas adecuadas y sus respectivos valores de pH se pueden encontrar en "Chemicals in Compliance with Pharmaceutical Standards: Inactive Ingredient Guide, "the "Handbook of Pharmaceutical Additives," y en la base de datos de aditivos alimentarios de la FDA.

En ciertos aspectos, las presentes composiciones farmacéuticas comprenden un hidróxido inorgánico. Entre los hidróxidos inorgánicos se incluyen, por ejemplo, hidróxido de amonio, hidróxido de metal alcalino e hidróxidos de metales alcalinotérreos, y mezclas de los mismos. Entre los hidróxidos inorgánicos preferidos se incluyen hidróxido de amonio; hidróxidos de metales alcalinos monovalentes, tales como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio; hidróxidos de metales alcalinotérreos divalentes, tales como hidróxido de calcio e hidróxido de magnesio; y combinaciones de los mismos.

La cantidad de hidróxido inorgánico incluida en las composiciones y los sistemas de la presente divulgación representará, típicamente, aproximadamente 0,3-7,0 % en peso, preferentemente 0,5-4,0 % en peso, más preferentemente aproximadamente 0,5-3,0 % en peso, lo más preferentemente aproximadamente 0,75-2,0 % en peso de una formulación aplicada por vía tópica o de un depósito de fármaco de un sistema de liberación de fármacos, o parche.

La formulación puede estar en cualquier forma adecuada para aplicación tópica, por ejemplo a la piel o las uñas y los tejidos circundantes, y puede comprender, por ejemplo, una crema, loción, solución, gel, ungüento, pasta, yeso, pintura, bioadhesivo, o similares, y/o se pueden preparar de manera que contengan liposomas, micelas, y/o microesferas. Para las formulaciones en las que la base farmacológicamente activa es un agente de liberación de hidróxido, se prefiere, aunque no es esencial, que haya agua presente. Por lo tanto, dicha formulación puede ser acuoso, es decir, contiene agua, o puede ser no acuosa y, opcionalmente, utilizarse en combinación con una capa superior oclusiva de modo que la humedad que se evapora de la superficie del cuerpo se mantiene dentro de la formulación después de la aplicación a la superficie del cuerpo y después.

Las formulaciones de la invención pueden contener, opcionalmente, un potenciador de la viscosidad y/o formador de película farmacéuticamente aceptable. Un potenciador de la viscosidad incrementa la viscosidad de la formulación con el fin de inhibir su propagación más allá de la zona de aplicación. El abeto balsámico (Oregón) es un ejemplo de un potenciador de la viscosidad farmacéuticamente aceptable.

Un formador de película, cuando se seca, forma una película protectora sobre la zona de aplicación. La película inhibe la eliminación del principio activo y lo mantiene en contacto con el sitio que se está tratando. Un ejemplo de un formador de película que es adecuado para su uso en la presente invención es colodión flexible, USP. Como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), en la página 1530, los colodiones son soluciones de éter de etilo/etanol que contienen piroxilina (una nitrocelulosa) que se evaporan para dejar una película de piroxilina. Un formador de película puede actuar adicionalmente como un vehículo. Las soluciones que se secan para formar una película se denominan, en ocasiones, pinturas.

Los ungüentos, como es bien conocido en la técnica de la formulación farmacéutica, son preparaciones semisólidas que se basan típicamente en vaselina u otros derivados del petróleo. La base de ungüento específica que se va a utilizar, tal como apreciarán los expertos en la técnica, es una que proporciona una administración óptima del fármaco, y, preferentemente, proporcionará otras características deseadas, así, por ejemplo, emoliencia o similares. Al igual que con otros portadores o vehículos, una base de ungüento debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Como se explica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), en las páginas 1399-1404, las bases de ungüento pueden agruparse en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases de emulsión; y bases solubles en agua. Las bases de ungüento oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de ungüento emulsionables, conocidas también como bases de ungüento absorbentes, contienen poco o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxiestearina, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases de ungüento en emulsión son emulsiones de agua en aceite (A/Ac) o emulsiones de aceite en agua (Ac/A), e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de ungüento solubles en agua preferidas se preparan a partir de polietilenglicoles de peso molecular variable; de nuevo véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy para obtener más información.

Las cremas, también conocidas en la técnica, son líquidos viscosos o emulsiones semisólidas, bien de aceite en agua o de agua en aceite. Las bases de crema son lavables con agua y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa, también llamada la fase "interna", está comprendida, generalmente, por vaselina y un alcohol graso, tal como alcohol cetílico o estearílico. La fase acuosa normalmente, aunque no necesariamente, supera la fase oleosa en volumen y, generalmente, contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema es, generalmente, un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

Como apreciarán por aquellos que trabajan en el campo de la formulación farmacéutica, los geles son sistemas de tipo suspensión semisólidos. Los geles monofásicos contienen macromoléculas orgánicas distribuidas sustancialmente de manera uniforme en todo el líquido vehículo, que normalmente es acuoso, pero también, preferentemente, contienen un alcohol y, opcionalmente, un aceite. Las "macromoléculas orgánicas," preferidas, es decir, agentes gelificantes, son polímeros de ácido acrílico reticulados, tales como la familia de "carbómero" de polímeros, por ejemplo, carboxipolialquilenos que pueden obtenerse comercialmente como la marca comercial Carbopol.RTM. También se prefieren polímeros hidrófilos, tales como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y alcohol polivinílico; polímeros celulósicos, tales como hidroxipropilcelulosa,

hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa; gomas, tales como goma de tragacanto y goma xantana; alginato de sodio; y gelatina. Con el fin de preparar un gel uniforme, se pueden añadir agentes dispersantes, tales como alcohol o glicerina, o el agente gelificante puede dispersarse por trituración, mezcla mecánica o agitación, o combinaciones de los mismos.

Las lociones, que se prefieren para la liberación de agentes cosméticos son preparaciones para su aplicación en la superficie de la piel sin fricción y, típicamente, son preparaciones líquidas o semilíquidas en las que las partículas sólidas, incluyendo el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son habitualmente suspensiones de sólidos y, preferentemente, para el presente fin, comprenden una emulsión oleosa líquida del tipo aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas en el presente documento para el tratamiento de áreas grandes del cuerpo, debido a la facilidad de aplicación de una composición más fluida. En general, es necesario que la materia insoluble en una loción se divida finamente. Las lociones típicamente contienen agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, o similares.

Las pastas son formas de dosificación semisólidas en las que el agente activo se suspende en una base adecuada. Dependiendo de la naturaleza de la base, las pastas se dividen entre pastas grasas o las elaboradas a partir de geles acuosos monofásicos. La base en una pasta grasa es, generalmente, vaselina o vaselina hidrófila o similares. Las pastas hechas a partir de geles acuosos monofásicos incorporan generalmente carboximetilcelulosa o similares como base.

Los yesos se componen de una mezcla pastosa que se extiende sobre el cuerpo, ya sea directamente o después de haber sido saturado en un material de base tal como tela. Los medicamentos, incluyendo las bases de la invención, se pueden disolver o dispersar en el yeso para hacer un apósito adhesivo medicamentoso.

Los bioadhesivos son preparaciones que se adhieren a las superficies de los tejidos del cuerpo. Las formulaciones bioadhesivas poliméricas son bien conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, Heller et al., "Biodegradable polymers as drug delivery systems," en Chasin, M. y Langer, R., eds.: Dekker, New York, pág.121-161 (1990); y la patente de Estados Unidos n.º 6.201.065. Los bioadhesivos no poliméricos adecuados también se conocen en la técnica, incluyendo ciertos ésteres de ácidos grasos (patente de Estados Unidos n.º 6.228.383).

Las formulaciones se pueden preparar también con liposomas, micelas, y microesferas. Los liposomas son vesículas microscópicas que tienen una pared lipídica que comprende una bicapa lipídica y se pueden utilizar como sistemas de liberación de fármacos en el presente documento también. En general, las formulaciones de liposomas preferentes para agentes farmacéuticos poco solubles o insolubles. Las preparaciones liposomales para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de N [1-2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) están disponibles con nombre comercial Lipofectin.RTM. (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.). Del mismo modo, los liposomas aniónicos y neutros también están fácilmente disponibles, por ejemplo, de Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.), o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Tales materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también se pueden mezclar con DOTMA en relaciones apropiadas. Los métodos para preparar liposomas usando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

En la técnica, se sabe que las micelas están compuestas por moléculas tensioactivas dispuestas de manera que sus grupos de cabeza polares forman una cáscara exterior esférica, mientras que las cadenas de hidrocarburos, hidrofóbicos se orientan hacia el centro de la esfera, formando un núcleo. Las micelas se forman en una solución acuosa que contiene tensioactivo a una concentración lo suficientemente alta de modo que dan lugar a micelas de forma natural. Los tensioactivos útiles para la formación de micelas incluyen, pero sin limitaciones, laurato de potasio, sulfonato de octano de sodio, sulfonato de decano de sodio, sulfonato de dodecano de sodio, laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, bromuro de deciltrimetilamonio, dodeciltrimetilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de dodecilamonio, polioxil 8 dodecil éter, polioxil 12 dodecil éter, nonoxinol 10 y nonoxinol 30. Las formulaciones de micelas se pueden utilizar junto con la presente invención, ya sea mediante incorporación en el depósito de un sistema de liberación tópica o transdérmica, o en una formulación que han de aplicarse a la uña y a los tejidos circundantes.

De manera similar, las microesferas se pueden incorporar en las presentes formulaciones y sistemas de liberación de fármacos. Al igual que los liposomas y las micelas, las microesferas encapsulan esencialmente un fármaco o una formulación que contiene el fármaco. Las microesferas se forman, generalmente, aunque no necesariamente, a partir de polímeros biocompatibles sintéticos o de origen natural, pero también pueden estar compuestas por lípidos cargados tales como fosfolípidos. La preparación de microesferas es bien conocida en la técnica y está descrita en los textos y la bibliografía pertinentes.

Aunque las bases en el presente documento son potenciadores de la permeación particularmente eficaces en formulaciones tópicas para el tratamiento de hongos de uñas, puede ser deseable, para otros usos, y en particular con bases más débiles o uñas más gruesas, incluir un potenciador de la permeación añadido en la formulación. Los

ejemplos de potenciadores adecuados incluyen, pero sin limitaciones, éteres tales como éter de dietilenglicolmonoetilo (disponible comercialmente como Transcutol.RTM) y éter de dietilenglicolmonometilo; tensioactivos tales como laurato de sodio, laurilsulfato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, Poloxamer (231, 182, 184), Tween (20, 40, 60, 80), y lecitina (patente de Estados Unidos n.º 4.783.450); alcoholes tales como etanol, propanol, octanol, alcohol bencílico, y similares; polietilenglicol y ésteres de los mismos, tales como monolaurato de polietilenglicol (PEGML; véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 4.568.343); amidas y otros compuestos nitrogenados, tales como urea, dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), 2-pirrolidona, 1-metil-2-pirrolidona, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina; terpenos; alcanonas; y ácidos orgánicos, en particular ácido cítrico y ácido succínico. Azona.RTM. y sulfóxidos tales como DMSO y C_{10} MSO también se pueden usar, pero son menos preferentes.

La mayoría de los potenciadores preferidos son aquellos copotenciadores lipófilos que típicamente se denominan potenciadores "plastificantes", es decir, potenciadores que tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 150 a 1000, una solubilidad acuosa de menos de aproximadamente 1 % en peso, preferentemente menos de aproximadamente 0,5 % en peso, y, lo más preferentemente, menos de aproximadamente 0,2 % en peso. El parámetro de solubilidad de Hildebrand de los potenciadores plastificantes se encuentra en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 10, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10. Tales potenciadores se describen con detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos de asignación conjunta pendiente de tramitación n.º de serie 09/738,410, presentada el 14 de diciembre de 2000, que ahora es la patente de Estados Unidos n.º 6.586.000, y en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US00/34483, presentada el 15 de diciembre de 2000, publicada el 21 de junio de 2001 WO 01/43775 A2. Los potenciadores lipófilos preferidos son ésteres grasos, alcoholes grasos y éteres grasos. Ejemplos de ésteres de ácidos grasos específicos y más preferidos incluyen laurato de metilo, oleato de etilo, monolaurato de propilenglicol, dilaurato de propilenglicerol, monolaurato de glicerol, monooleato de glicerol, n-decanoato de isopropilo y miristato de octildodecilo. Los alcoholes grasos incluyen, por ejemplo, alcohol estearílico y alcohol oleílico, mientras que los éteres grasos incluyen compuestos en los que un diol o triol, preferentemente un alcanodiol o triol C_2-C_4, están sustituidos con uno o dos sustituyentes de éter graso.

Los potenciadores de la permeación adicionales serán conocidos por los expertos normales en la técnica de la administración tópica de fármacos y/o se describen en los textos y la bibliografía pertinentes. Véase, por ejemplo, Percutaneous Penetration Enhancers, Smith et al., editores (CRC Press, 1995).

Varios aditivos, conocidos por los expertos en la técnica, pueden incluirse en las formulaciones tópicas. Por ejemplo, se pueden usar disolventes, incluyendo cantidades relativamente pequeñas de alcohol, para solubilizar ciertos componentes de la formulación. Las presentes formulaciones también pueden incluir aditivos convencionales tales como opacificantes, antioxidantes, fragancias, colorantes, agentes gelificantes, agentes espesantes, estabilizantes, agentes tensioactivos y similares. También pueden añadirse otros agentes, tales como agentes antimicrobianos, para evitar el deterioro durante el almacenamiento, es decir, para inhibir el crecimiento de microbios tales como bacterias, levaduras y mohos. Los agentes antimicrobianos adecuados se seleccionan típicamente del grupo que consiste en los ésteres de metilo y propilo de ácido p-hidroxibenzoico (es decir, metil y propilparabeno), benzoato de sodio, ácido sórbico, imidurea, y combinaciones de los mismos.

Las formulaciones también pueden contener aditivos atenuantes de la irritación para minimizar o eliminar la posibilidad de irritación de la piel o daños en la piel resultantes de la base o de otros componentes de la composición. Entre los aditivos atenuantes de la irritación adecuados se incluyen, por ejemplo: -tocoferol; inhibidores de la monoamina oxidasa, en particular alcoholes de fenilo tales como 2-fenil-1-etanol; glicerina; ácidos salicílicos y salicilatos; ácidos ascórbicos y ascorbatos; ionóforos tales como monensina; aminas anfifílicas; cloruro amónico; N-acetilcisteína; ácido cis-urocánico; capsaicina; y cloroquina. El aditivo atenuante de la irritación, si está presente, se puede incorporar en las presentes formulaciones en una concentración eficaz para mitigar la irritación o el daño en la piel, por lo general representa no más de aproximadamente 20 % en peso, más típicamente no más de aproximadamente 5 % en peso, de la composición.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también se pueden administrar a través de la piel o de las uñas y los tejidos circundantes usando un parche para la piel convencional, en el que el agente está contenido dentro de una estructura laminada que sirve como un dispositivo de liberación de fármaco que se fija a la superficie del cuerpo. En tal estructura, la formulación farmacéutica está contenida en una capa, o "depósito", subyacente a una capa de soporte superior. La estructura laminada puede contener un solo depósito o puede contener múltiples depósitos.

En una realización, el depósito comprende una matriz polimérica de un material adhesivo farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la uña o la piel durante la liberación del fármacos; típicamente, el material adhesivo es un adhesivo sensible a la presión (PSA) que es adecuado para el contacto prolongado con la piel o las uñas, y que debe ser física y químicamente compatible con la base y cualquier portador, vehículo u otros aditivos que están presentes. Entre los ejemplos de materiales adhesivos adecuados se incluyen, pero sin limitaciones los siguientes: polietilenos; polisiloxanos; poliisobutilenos; poliacrilatos; poliacrilamidas; poliuretanos; copolímeros de etileno-acetato de vinilo plastificados; y cauchos adherentes, tales como poliisobuteno, polibutadieno, copolímeros de poliestireno-isopreno, copolímeros de poliestireno-butadieno y neopreno (policloropreno). Los adhesivos

preferidos son los poliisobutilenos.

Las funciones de la capa de soporte como elemento estructural primario del sistema transdérmico y proporciona al dispositivo flexibilidad y, preferentemente, oclusividad. El material utilizado para la capa de soporte debería ser inerte e incapaz de absorber fármacos, bases o componentes de la formulación contenida dentro del dispositivo. El soporte se compone, preferentemente, de un material elastomérico flexible que sirve como cubierta protectora para evitar la pérdida de fármaco y/o vehículo a través de la transmisión a través de la superficie superior del parche, y, preferentemente, impartirá un grado de oclusividad al sistema, de manera que la área de la superficie corporal cubierta por el parche se hidrata durante el uso. El material utilizado para la capa de soporte debería permitir que el dispositivo siga los contornos de la piel y las uñas y se use cómodamente en áreas de la piel, tales como en las articulaciones u otros puntos de flexión, que normalmente están sometidos a tensión mecánica, con poca o ninguna probabilidad de que el dispositivo se suelte de la piel debido a diferencias en la flexibilidad o elasticidad de la piel y el dispositivo. Los materiales utilizados como capa de soporte son oclusivos o permeables, como se ha indicado anteriormente, aunque se prefieren los soportes oclusivos, y generalmente derivan de polímeros sintéticos (por ejemplo, poliéster, polietileno, polipropileno, poliuretano, cloruro de polivinilideno, y amida de poliéter), polímeros naturales (por ejemplo, materiales celulósicos) materiales tejidos y no tejidos macroporosos.

Durante el almacenamiento y antes de su uso, la estructura laminada incluye un recubrimiento de liberación. Inmediatamente antes del uso, esta capa se retira del dispositivo para que el sistema se pueda fijar a la piel, las uñas y/o la piel que rodea a la uña. El revestimiento de liberación debe estar hecho de un material impermeable al fármaco/vehículo y es un elemento desechable que sirve solo para proteger el dispositivo antes de la aplicación. Típicamente, el revestimiento de liberación está formado por un material impermeable al agente farmacológicamente activo y la base, y que se retira fácilmente del parche antes de su uso.

En una realización alternativa, el depósito que contiene el agente activo y el adhesivo de contacto con la piel o las uñas están presentes como capas separadas y distintas, con el adhesivo subyacente al depósito. En tal caso, el depósito puede ser una matriz polimérica como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, el depósito puede estar constituido por una formulación líquida o semisólida contenida en un compartimento cerrado o "bolsa", o puede ser un depósito de hidrogel, o puede tomar alguna otra forma. Los depósitos de hidrogel son particularmente preferidos en el presente documento. Como apreciarán los expertos en la técnica, los hidrogeles son redes macromoleculares que absorben agua y, por lo tanto, se hinchan pero no se disuelven en agua. Esto es, los hidrogeles contienen grupos funcionales hidrófilos que proporcionan absorción de agua, pero los hidrogeles están compuestos por polímeros reticulados que dan lugar a insolubilidad acuosa. Por tanto, en general, los hidrogeles están compuestos por polímeros hidrófilos reticulados, tales como un poliuretano, un alcohol polivinílico, un ácido poliacrílico, un polioxietileno, una polivinilpirrolidona, un poli(metacrilato de hidroxietilo) (poli(HEMA)), o un copolímero o mezcla de los mismos. Los polímeros hidrofílicos particularmente preferidos son copolímeros de HEMA y polivinilpirrolidona.

Las capas adicionales, por ejemplo, capas de tejido intermedias y/o membranas de control de la velocidad, también pueden estar presentes en cualquiera de estos sistemas de liberación de fármacos. Las capas de tela pueden usarse para facilitar la fabricación del dispositivo, mientras que una membrana de control de la velocidad se puede usar para controlar la velocidad a la que un componente sale del dispositivo. El componente puede ser un agente activo, un potenciador, o algún otro componente contenido en el sistema de liberación de fármacos. Una membrana de control de la velocidad, si está presente, se incluirá en el sistema en el lado de la piel de uno o más de los depósitos de fármaco. Los materiales usados para formar dicha membrana se seleccionan para limitar el flujo de uno o más componentes contenidos en la formulación del fármaco. Los materiales representativos útiles para formar membranas de control de la velocidad incluyen poliolefinas tales como polietileno y polipropileno, poliamidas, poliésteres, copolímero de etileno-etacrilato, copolímero de etileno-acetato de vinilo, copolímero de etileno-metilacetato de vinilo, copolímero de etileno-etilacetato de vinilo, copolímero de etileno-propilacetato de vinilo, poliisopreno, poliacrilonitrilo, copolímero de etileno-propileno, y similares.

En el caso del tratamiento de uñas, la superficie subyacente del dispositivo transdérmico, es decir, el área de contacto de las uñas y la piel, tiene un área en el intervalo de aproximadamente 0,25 cm^2 a 12 cm^2, preferentemente de aproximadamente 0,5 cm^2 a 7 cm^2, más preferentemente de aproximadamente 1 cm^2 a 5 cm^2. Esa área variará, por supuesto, con el tamaño de la zona a tratar. Serán necesarios parches más grandes para acomodar uñas de mayor tamaño, mientras que parches más pequeños se pueden utilizar para las uñas pequeñas. En el caso de tratamiento de la piel, el área de superficie del dispositivo transdérmico puede ser de cualquier tamaño adecuado que corresponda a la zona de la infección.

Tales sistemas de liberación de fármacos se pueden fabricar usando técnicas de recubrimiento y laminación convencionales conocidas en la materia. Por ejemplo, los sistemas de matriz de adhesivo se pueden preparar por moldeo de una mezcla fluida de adhesivo, agente activo y vehículo en la capa de soporte, seguido de laminación del revestimiento de liberación. Del mismo modo, la mezcla adhesiva puede verterse sobre el revestimiento de liberación, seguido de laminación de la capa de soporte. Como alternativa, el depósito de fármaco se puede preparar en ausencia de fármaco o excipiente, y después cargar mediante "inmersión" en una mezcla de fármaco/vehículo. En general, estos parches se fabrican mediante evaporación del disolvente, moldeo de película, extrusión en fusión, laminación de película fina, troquelado, o similares. El agente activo generalmente se incorporará en el dispositivo

durante la fabricación del parche en lugar de después de la preparación del dispositivo.

En un sistema de liberación preferido, una capa superior adhesiva que también sirve como soporte para el sistema de liberación se utiliza para asegurar mejor el parche a la piel o las uñas y al tejido circundante. Esta capa superior está dimensionada de tal manera que extiende más allá del depósito del fármaco de modo que el adhesivo en la capa superior entra en contacto con la superficie del cuerpo. En ciertos aspectos, la capa superior entrará en contacto con la piel que rodea la uña, mientras que el depósito de fármaco se coloca sobre la uña, en particular en las partes infectadas de la uña. La capa superior es útil porque la capa de adhesivo/depósito de fármaco puede perder su adherencia unas pocas horas después de la aplicación debido a la hidratación. Mediante la incorporación de tal capa superior adhesiva, el sistema de liberación se mantiene en su lugar durante el periodo de tiempo requerido.

Otros tipos y configuraciones de sistemas de liberación de fármacos de aplicación tópica se pueden usar también junto con la presente invención, como apreciarán los expertos en el técnica de la administración tópica de fármacos. Véase, por ejemplo, Ghosh, Transdermal and Topical Drug Delivery Systems (Interpharm Press, 1997), en particular los capítulos 2 y 8.

Diversos modos de administración

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estos pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también se pueden administrar por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la materia de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para potenciar la biodisponibilidad, propelentes tales como fluorocarburos o nitrógeno y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

Las formulaciones para administración bucal incluyen comprimidos, pastillas para chupar, geles y similares. Como alternativa, la administración bucal se puede efectuar utilizando un sistema de liberación transmucosa como conocen los expertos en la técnica. Los compuestos de la presente divulgación también se pueden liberar a través del tejido de la piel o la mucosa usando sistemas de administración transdérmica de fármacos convencionales, es decir, "parches" transdérmicos, en los que el agente está contenido típicamente dentro de una estructura laminada que sirve como dispositivo de liberación de fármacos que se fijará a la superficie del cuerpo. En tal estructura, la composición farmacológica está contenida típicamente en una capa, o "depósito", subyacente a una capa de soporte superior. El dispositivo laminado puede contener un solo depósito o puede contener múltiples depósitos. En una realización, el depósito comprende una matriz polimérica de un material adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la piel durante la liberación de fármacos. Entre los ejemplos de materiales adhesivos de contacto con la piel adecuados se incluyen, pero sin limitaciones, polietilenos, polisiloxanos, poliisobutilenos, poliacrilatos, poliuretanos, y similares. Como alternativa, el depósito que contiene el fármaco y el adhesivo para contacto con la piel están presentes como capas separadas y distintas, con el adhesivo subyacente al depósito que, en este caso, puede ser una matriz polimérica como se ha descrito anteriormente, o puede ser un depósito de líquido o gel o puede tomar alguna otra forma. La capa de soporte en estos laminados, que sirve como la superficie superior del dispositivo, funciona como el elemento estructural primario de la estructura laminada y proporciona al dispositivo gran parte de su flexibilidad. El material seleccionado para la capa de soporte debería ser sustancialmente impermeable al agente activo y a cualquier otro material que esté presente.

Los compuestos de la presente divulgación se pueden formular para la administración en aerosol, particularmente en el tracto respiratorio e incluyendo la administración intranasal. El compuesto tendrá, generalmente, un tamaño de partícula pequeño por ejemplo del orden de 5 micrómetros o menos. Un tamaño tal de partícula puede obtenerse por medios conocidos en la técnica, por ejemplo por micronización. El ingrediente activo se proporciona en un envase presurizado con un propelente adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC) por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol puede contener también convenientemente un tensioactivo, tal como lecitina. La dosis de fármaco puede controlarse mediante una válvula dosificadora. Como alternativa, los ingredientes activos se pueden proporcionar en forma de un polvo seco, por ejemplo una mezcla en polvo del compuesto en una base en polvo adecuada, tal como lactosa, almidón, derivados de almidón, tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP). El vehículo en polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina. o envases blíster a partir del cual el polvo se puede administrar por medio de un inhalador.

Potenciadores de la permeación

La liberación peroral de fármacos hidrófilos es uno de los mayores retos en investigación biofarmacéutica. Los fármacos hidrófilos por lo general presentan una baja biodisponibilidad tras la administración oral. Una de las causas

de esta baja biodisponibilidad es la mala permeación intestinal a través de la ruta paracelular. Esta vía está, en realidad, restringida por la presencia de uniones estrechas en la parte apical de los enterocitos. Los potenciadores de la permeación pueden mejorar ventajosamente la biodisponibilidad mediante la mejora de la permeación intestinal.

En ciertos aspectos, las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender potenciadores de la permeación. La expresión "potenciador de la permeación" o "potenciador de la penetración" como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que mejora la velocidad de transporte de un agente farmacológicamente activo (por ejemplo, los compuestos de estructuras (I), (II), (III), y (IV)) a través de la piel (para administración transdérmica de fármacos) o la superficie de la mucosa intestinal (para administración oral de fármacos). Normalmente, un potenciador de la permeación aumenta la permeabilidad de la piel o del tejido mucoso a un agente farmacológicamente activo. Los potenciadores de la permeación, por ejemplo, aumentan la velocidad a la que el agente farmacológicamente activo atraviesa la piel y entra en el torrente sanguíneo. La permeación mejorada efectuada mediante el uso de potenciadores de la permeación se puede observar, por ejemplo, mediante la medición del flujo del agente farmacológicamente activo a través de piel animal o humana, como se describe en el **Ejemplo 9** más adelante en el presente documento. Una cantidad "eficaz" de un potenciador de la permeación, como se usa en el presente documento, significa una cantidad que proporcionará un aumento deseado en la piel o la permeabilidad de la mucosa intestinal para proporcionar, por ejemplo, la profundidad deseada de penetración de un compuesto seleccionado, la velocidad de administración del compuesto y la cantidad de compuesto liberado.

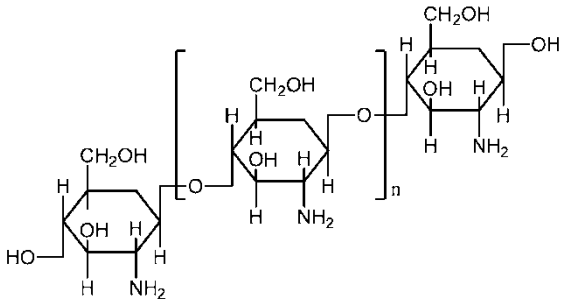
La expresión "potenciadores de la permeación" incluye todos los potenciadores que incrementan el flujo de un permeante, fármaco u otra molécula a través de la piel o la mucosa intestinal. En otras palabras, se pretende incluir todos los compuestos que alteran la envoltura celular, disolventes, detergentes esteroidales, sales biliares, agentes quelantes, agentes tensioactivos, no tensioactivos, ácidos grasos, y cualquier otro agente de potenciación química.

Los potenciadores de la permeación están compuestos por dos categorías principales de componentes, es decir, compuestos que alteran la envoltura celular y disolventes o sistemas binarios que contienen tanto compuestos que alteran la envoltura celular como disolventes. No obstante, se conocen otras categorías de potenciador de la permeación, tales como detergentes esteroidales, sales biliares, agentes quelantes, agentes tensioactivos, no tensioactivos y ácidos grasos.

Se sabe que los compuestos que alteran la envoltura celular son conocidos en la técnica son útiles en preparaciones farmacéuticas tópicas y funcionan también en la liberación de fármacos a través de la piel o la mucosa. Se cree que estos compuestos ayudan a la penetración dérmica alterando la estructura lipídica de las células del estrato córneo-envolturas. Se cree que cualquier compuesto que altera la envoltura celular es útil para los propósitos de la presente invención.

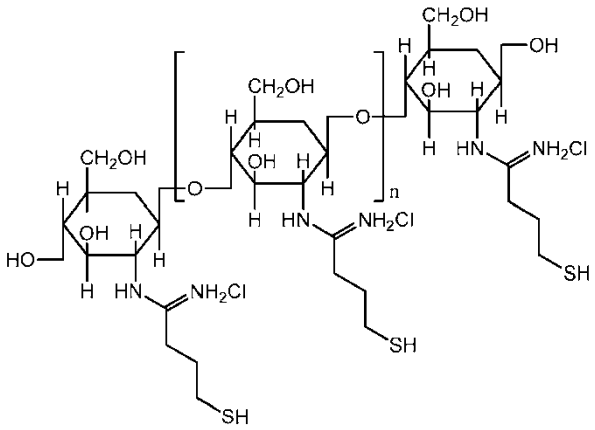
En aún otra realización es el uso de excipientes potenciadorES de la permeación, incluyendo polímeros tales como: policationes (quitosano y sus derivados de amonio cuaternario, poli-L-arginina, gelatina aminada); polianiones (N-carboximetilquitosano, ácido poli-acrílico); y, polímeros tiolados (carboximetilcelulosa-cisteína, policarbofil-cisteína, el quitosano-tiobutilamidina, quitosano-ácido tioglicólico, conjugados de quitosano-glutatión).

Un ejemplo de un potenciador de la permeación es quitosano para el transporte de un compuesto hidrófilo como los compuestos de las estructuras (I), (II), (III) o (IV). La estructura de quitosano se muestra a continuación como la estructura (VI):



(VI)

Sin estar limitado por ninguna teoría en particular, el mecanismo subyacente al efecto potenciador de la permeación del quitosano parece estar basado en las cargas positivas del quitosano, que interaccionan con la membrana celular que da lugar a una reorganización estructural de las proteínas asociadas a las uniones estrechas. El efecto potenciador de la permeación de quitosano puede mejorar ventajosamente mediante la inmovilización de los grupos tiol, por ejemplo mediante el uso de quitosano-4-tiobutilamidina (quitosano-TBA). La estructura de quitosano-TBA se muestra más adelante como la estructura (VII):



(VII)

Los quitosanos tiolados también muestran, además de sus excelentes propiedades mucoadhesivas de potenciación de la permeación, propiedades de cohesión excelentes. Las funciones tiol reducido en la estructura principal de quitosano permiten que los quitosanos tiolados no solo formen enlaces disulfuro con las glicoproteínas mucosas, sino también forman enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares. Tal reticulación de las cadenas poliméricas da como resultado una alta estabilidad de los sistemas vehículo de fármacos.

Un posible mecanismo para mejorar la potenciación de la permeación es a través de la inhibición de la enzima tirosina fosfatasa. Esta enzima parece estar implicada en el proceso de apertura y cierre de las uniones estrechas. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente pueden comprender cualquier agente potenciador de la permeación que inhibe la tirosina fosfatasa. Por ejemplo, la inhibición de la tirosina fosfatasa puede llevarse a cabo mediante compuestos, tales como óxido de fenilarsina, pervanadato o glutatión reducido conduce, en consecuencia, a la fosforilación y la apertura de las uniones estrechas. En ciertos aspectos, las presentes composiciones farmacéuticas comprenden glutatión. En otros aspectos, el glutatión se encuentra en un estado reducido.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende los compuestos de la presente divulgación junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En ciertos aspectos, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un excipiente. En otros aspectos, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un excipiente potenciador de la permeación. En otros aspectos, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un polímero. En ciertos aspectos, el polímero es un policatión, polianión, polímero tiolado, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, el polímero es un policatión y el policatión es quitosano, un derivado de amonio cuaternario de quitosano, poli-L-arginina, gelatina aminado, copolímero de metacrilato de dimetilaminoetilo-metacrilato de metilo, un dietilaminoacetato de polivinil acetal, o una combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el policatión es quitosano. En algunos aspectos, el polímero es un polianión y el polianión es quitosano N-carboximetilo, ácido poli-acrílico, o una combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el polímero es un polímero tiolado y el polímero tiolado es carboximetilcelulosa-cisteína, policarbofil-cisteína, quitosano-tiobutilamidina, quitosano-ácido tioglicólico, un conjugado de quitosano-glutatión, o una combinación de los mismos. En aspectos adicionales, el polímero tiolado es quitosano-4-tiobutilamidina. En todavía aspectos adicionales, el polímero tiolado es un conjugado de quitosano-glutatión. En aspectos adicionales, el excipiente potenciador de la permeación es glutatión.

En varios aspectos, el excipiente farmacéuticamente aceptable tiene una concentración de entre 0,1 % y 40,0 % en p/p.

En ciertos aspectos, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende una combinación de quitosano-4-tiobutilamidina y glutatión. En ciertos aspectos, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende de 0,1 % a 1,0 % de quitosano-4-tiobutilamidina y de 1 % a 10 % de glutatión. En aspectos adicionales, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende de 0,25 % a 0,75 % de quitosano-4-tiobutilamidina y de 2,5 % a 7,5 % de glutatión. En todavía aspectos adicionales, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende 0,5 % de quitosano-4-tiobutilamidina y 5 % de glutatión.

Recubrimientos entéricos

En diversos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden estar recubiertas entéricamente. El material de polímero de recubrimiento entérico, es decir, el polímero que no se disuelve en el estómago sino en el intestino delgado, puede ser cualquier material polimérico farmacéuticamente aceptable. En particular, se prefieren los materiales poliméricos que se disuelven a un pH de aproximadamente 6 o superior. Entre los ejemplos de polímeros de recubrimiento entérico adecuados se incluyen, sin limitaciones, un copolímero de metacrilato de metilo-ácido metacrílico (1:1) (por ejemplo, Eudragit L; Rohm & Haas Co.), un copolímero de

metacrilato de metilo-ácido metacrílico (2:1) (por ejemplo,, Eudragit S; Rohm & Haas Co.), un copolímero de acrilato de etilo-ácido metacrílico (1:1) (por ejemplo, Eudragit LD-55; Rohm & Haas Co.), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (JPXII), ftalato de acetato de celulosa (JPXII), goma laca (JPXII), y combinaciones de los mismos. Preferentemente, el polímero de recubrimiento entérico es un copolímero de metacrilato de metilo-ácido metacrílico (1:1) (por ejemplo, Eudragit L). El polímero puede comprender además un plastificante, tal como triacetina, Macrogol 400, citrato de trietilo, Tween 80, aceite de ricino, etc., así como minerales tales como hidróxido de silicato de magnesio (es decir, talco). El polímero de recubrimiento entérico está presente en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 % p/p, preferentemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/p, más preferentemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/p. En una realización preferida, el recubrimiento entérico comprende un polímero de recubrimiento entérico (por ejemplo, Eudragit L100), citrato de trietilo, hidróxido de silicato de magnesio (es decir, talco) y, opcionalmente, un fármaco y un agente tampón.

En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se formulan en una forma de dosificación farmacéutica de liberación controlada en el tiempo con recubrimiento entérico. En ciertos aspectos, el recubrimiento entérico es una mezcla de grasa-ácidos grasos, ftalato acetato de celulosa, polímero de ácido acrílico, copolímero de ácido acrílico, polímero de ácido acrílico sustituido con alquilo, copolímero de ácido acrílico sustituido con alquilo, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, el recubrimiento entérico es ftalato acetato de polivinilo, dióxido de titanio, talco, dióxido de silicio coloidal, citrato de trietilo, polietilenglicol, bicarbonato de sodio, ácido esteárico purificado, alginato de sodio, copolímero de metacrilato de metilo-ácido metacrilato (1:1), un copolímero de metacrilato de metilo-ácido metacrilato (2:1), un copolímero de acrilato de etilo-ácido metacrílico (1:1), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato ftalato de celulosa, goma laca, o una combinación de los mismos. En aspectos adicionales, el recubrimiento entérico es un polímero que contiene ácido acrílico y que contiene ácido metacrílico. En todavía aspectos adicionales, el recubrimiento entérico es poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico).

En ciertos aspectos, el recubrimiento entérico comprende además un agente tampón.

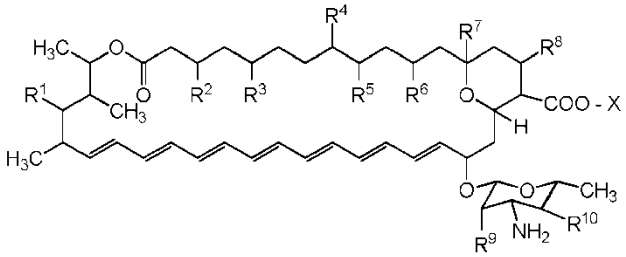
Usos en métodos de tratamiento

En varios aspectos, los compuestos de la presente divulgación tienen actividad antifúngica. Se considera un compuesto que tiene actividad antifúngica si tiene un efecto inhibidor sobre los hongos. El hongo es inhibido si se destruye, se impide el crecimiento del hongo o si se retarda el crecimiento del hongo. El compuesto antifúngico puede tener un efecto inhibidor sobre cualquier forma de hongo.

En diversos aspectos, los compuestos de la presente divulgación tienen actividad antibacteriana. Se considera que un compuesto tiene actividad antibacteriana si tiene un efecto inhibidor sobre las bacterias. Las bacterias son inhibidas si se destruyen, se impide el crecimiento de las bacterias o si se retarda el crecimiento de las bacterias. El compuesto antibacteriano puede tener un efecto inhibidor sobre cualquier forma de bacterias.

En aspectos adicionales, los compuestos de la presente divulgación tienen actividad antiparasitaria. Se considera que un compuesto tiene actividad antiparasitaria si tiene un efecto inhibidor sobre un parásito. Un parásito es inhibida si se destruye, se impide el crecimiento del parásito o si se retarda el crecimiento del parásito. El compuesto antiparasitario puede tener un efecto inhibidor sobre cualquier forma de parásito, tal como, por ejemplo, nematodos, cestodos, trematodos, protozoos infecciosos o amebas. En algunos aspectos, los compuestos de la presente divulgación inhiben los parásitos protozoos. En aspectos adicionales, los compuestos de la presente divulgación inhiben el parásito protozoario *Naegleria.* En aspectos adicionales, los compuestos de la presente divulgación inhiben el parásito protozoario *Leishmania.*

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona un compuesto para su uso en métodos para tratar o inhibir una infección fúngica en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de estructura (I):



(I)

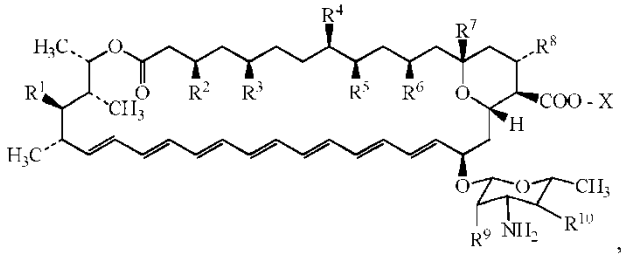
o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio.

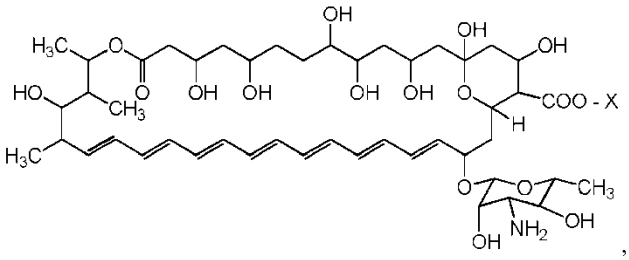
En ciertos aspectos, el método de la divulgación trata una infección fúngica sistémica. En ciertos aspectos, el método trata una infección fúngica no sistémica. En algunos aspectos, la infección fúngica es onicomicosis. En ciertos aspectos, el sujeto está inmunodeprimido. En aspectos adicionales, el sujeto está inmunodeprimido por SIDA, cáncer o tratamiento con agentes inmunosupresores.

En ciertos aspectos, el compuesto se administra por vía oral. En aspectos adicionales, el compuesto se administra parenteralmente. En aspectos adicionales, el compuesto se administra por vía tópica.

En ciertos aspectos, el compuestos de estructuras (I) tiene una de las estructuras (II), (III) o (IV) siguientes:

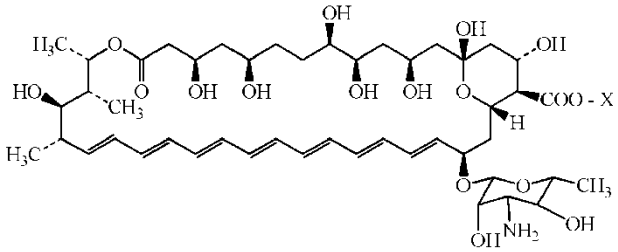


(II)



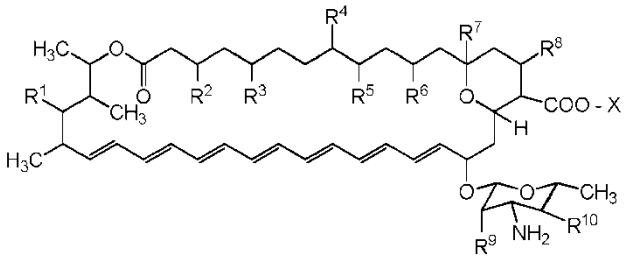
(III)

o



(IV)

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona un compuesto para su uso en métodos para tratar o inhibir una infección parasitaria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de estructura (I):



(I)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

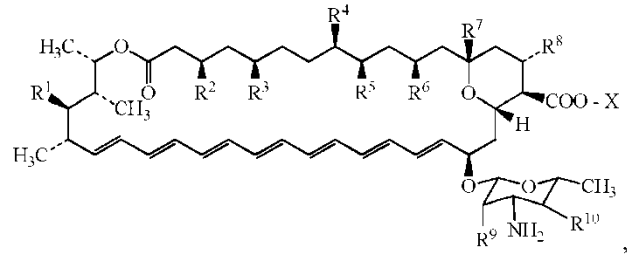
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio.

En ciertos aspectos, el método de la divulgación trata una infección parasitaria sistémica. En ciertos aspectos, el método trata una infección parasitaria no sistémica. En algunos aspectos, la infección parasitaria es del sistema nervioso central. En ciertos aspectos, la infección parasitaria es de los órganos internos. En aspectos adicionales, la infección parasitaria es de la piel.

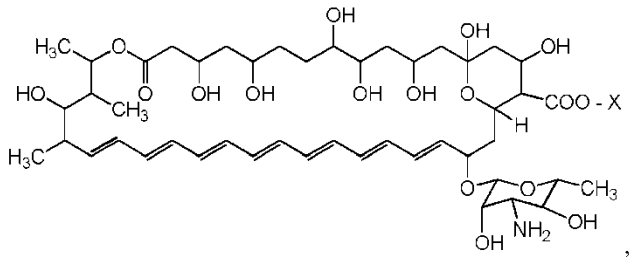
En ciertos aspectos de la infección parasitaria es una infección protozoaria. En algunos aspectos, la infección parasitaria es leishmaniasis. En aspectos adicionales, la infección parasitaria es leishmaniasis visceral. En aún otros aspectos, la infección parasitaria es leishmaniasis cutánea. En algunos aspectos, la infección parasitaria es meningoencefalitis amebiana primaria.

En ciertos aspectos, el compuesto se administra por vía oral. En aspectos adicionales, el compuesto se administra parenteralmente. En aspectos adicionales, el compuesto se administra por vía tópica.

En ciertos aspectos, el compuestos de estructuras (I) tiene una de las estructuras (II), (III) o (IV) siguientes:

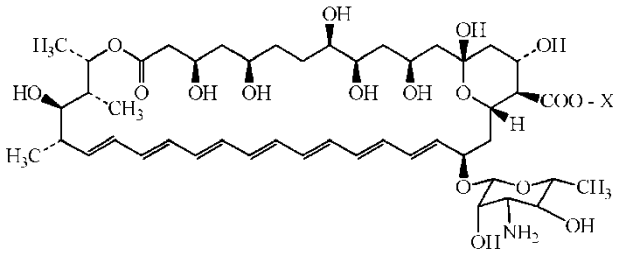


(II)



(III)

o



(IV)

El término "que trata" incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención a un sujeto para prevenir o retrasar, para aliviar o para detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o afecciones asociadas con infecciones fúngicas o parasitarias. Un médico experto sabrá cómo utilizar los métodos estándar para determinar si un paciente sufre una enfermedad asociada con una infección fúngica o parasitaria, por ejemplo, mediante el examen del paciente y determinando si el paciente sufre una enfermedad que se sabe que está asociada con una infección fúngica o parasitaria o sometiendo a analizando los niveles de hongos o parásitos en el plasma sanguíneo o tejido del individuo que se sospecha que sufre una infección fúngica o parasitaria. Se da a conocer un método que comprende la administración de un compuesto de la presente invención a un sujeto y determinar la presencia de una infección fúngica o parasitaria en el sujeto. Las infecciones fúngicas o parasitarias en el sujeto pueden determinarse antes y/o después de la administración del compuesto.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de compuesto que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará en función del compuesto, la enfermedad y es gravedad y la edad, peso, etc., del paciente que se va a tratar, y puede determinarla un experto en la técnica sin experimentación indebida.

Excepto cuando se indique, los términos "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como animales experimentales tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. En consecuencia, el término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento significa cualquier paciente o sujeto mamífero al cual se pueden administrar los compuestos de la invención. En un aspecto de ejemplo de la presente invención, para identificar a los pacientes sometidos a tratamiento de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento, se emplean métodos de detección selectiva aceptados para determinar los factores de riesgo asociados con una enfermedad o afección específica o posible o para determinar el estado de una enfermedad o afección existente en un sujeto. Estos métodos de detección selectiva incluyen, por ejemplo, intervenciones convencionales para determinar los factores de riesgo que se asocian con la enfermedad o afección específica o posible. Estos y otros métodos de rutina permiten al médico seleccionar pacientes con necesidad de terapia utilizando las formulaciones de la presente invención.

Usos en Métodos de tratamiento por vía tópica de infecciones fúngicas o parasitarias

En diversos aspectos, los compuestos descritos en el presente documento se pueden utilizar para tratar tópicamente infecciones fúngicas o parasitarias. Por ejemplo, las presentes composiciones farmacéuticas se pueden administrar para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (una infección parasitaria de la piel) y onicomicosis (una infección fúngica de la uña).

La leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente de leishmaniasis. Es una infección de la piel causada por un parásito unicelular que se transmite por la picadura de flebótomos. Hay aproximadamente 20 especies de Leishmania que pueden causar leishmaniasis cutánea. En ciertos aspectos, la leishmaniasis cutánea puede tratarse mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los compuestos de estructura (I), (II), (III) o (IV).

Las infecciones fúngicas de la uña, que se denominan "hongos ungueales", "onicomicosis", o "tiña ungueal" son frecuentes en todo el mundo. Se estima que el 2-13 % de la población se ve afectada en América del Norte, con al menos un 15-20 % de los 40-60 años de edad que tiene una o más uñas de las manos o uñas de los pies infectadas. Las infecciones pueden variar desde superficial, causando poco más que decoloración, a graves, lo que da como resultado la pérdida de la uña junto con deformidades de los dígitos circundantes. La incidencia de onicomicosis ha ido en aumento en las últimas décadas, debido a factores tales como un aumento de la población de edad avanzada, un aumento de la participación en la actividad física enérgica mientras se llevan zapatos y calcetines que retienen la humedad, un aumento del número de individuos infectados por el VIH, una mayor incidencia de la diabetes, y un mayor uso de los esteroides, antibióticos y otros agentes terapéuticos que pueden suprimir respuestas inmunológicas a los hongos. En ciertos aspectos, la onicomicosis puede tratarse mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los compuestos de estructura (I), (II), (III), o (IV).

En varios aspectos, se puede extender una crema, pomada, pasta, yeso, o loción en el área afectada o se frota suavemente sobre la misma. Del mismo modo, una formulación bioadhesiva o polimérica se puede extender o frotar

sobre el área afectada. Una solución puede aplicarse de la misma forma, pero más típicamente se aplicará con un cuentagotas, hisopo, o similares, y cuidadosamente se aplica a la zona afectada. La vaselina puede extenderse sobre la piel que rodea a la zona afectada para protegerla de la posible irritación durante el tratamiento.

El régimen de dosis dependerá de una serie de factores que pueden determinarse fácilmente, tal como la extensión del área y el espesor de la piel o uña afectada y la capacidad de respuesta de la infección al tratamiento, pero normalmente será una o más dosis al día, con un curso de tratamiento que dura desde varias semanas a varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se consigue una reducción significativa de la infección. Un experto puede determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. En general, se contempla que la formulación se aplicará de una a cuatro veces al día. Con un parche para la piel, el dispositivo se mantiene en general en su lugar en la superficie del cuerpo a lo largo de un período de administración de fármacos, típicamente en el intervalo de 8 a 72 horas, y se sustituye cuando sea necesario.

Estos y otros aspectos de la presente divulgación se pondrán de manifiesto mediante referencia a la siguientes descripción detallada.

Aspectos de ejemplo

A continuación se encuentran ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente divulgación. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no están destinados a limitar el ámbito de la presente divulgación de ningún modo. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permiten algunos errores y desviaciones experimentales.

EJEMPLO 1

Producción de corifungina

Los compuestos de la presente divulgación se sintetizaron utilizando un microorganismo, en particular una cepa de *Streptomyces nodosus* NRRL B-2371. El microorganismo se mantuvo como reserva en viales congelados: para las transferencias de contenido de un vial congelado se descongela y se inocula en 100 ml de semilla líquida (SD-01) 1,0 % de dextrosa, 0,3 % de pelusa de soja; 0,3 % de levadura de cerveza en matraces de 300 ml *Ful-Baf Tunair* (Tunac, J Ferment Bioeng, 68:15 - 159 (1989)). Los matraces se incubaron a 28 ºC en un agitador de 245 rpm durante 2 días. Para la producción por fermentación del compuesto, un medio complejo compuesto por 4,0 % de dextrosa; 2,0 % de pelusa de soja; 0,5 % de levadura de cerveza; 0,5 % de carbonato de calcio, se incubó a 28 ºC en un agitador de 245 rpm. Para los rendimientos óptimos de los antibióticos, normalmente los matraces se recogían 3-4 días después de la inoculación.

El compuesto se produce mediante fermentación mediante medios de fermentación patentados. La producción de las muestras se llevó a cabo en matraces de alta aireación: el sistema de *matraz Tunair* (http://www.sheltonscientific.com) (Tunac, J Ferment Bioeng, 68:15 – 159 (1989)).

La producción de compuestos adicionales se llevó a cabo en biorreactores patentados (Tunac, patente de Estados Unidos n.º 5.075.234 (1991)), incluyendo *Airmentors de tamaño* 25, 100, 500 galones.

Para iniciar el proceso de fermentación, la semilla de *Streptomyces sp.* se preparó en el matraz de agitación *Tunair* y, después, se transfirió sucesivamente a vasos de mayor tamaño. El número de transferencias de siembras depende del tamaño final de la producción *Airmentor*. Una secuencia típica sería una siembra preparada inicialmente en un matraz *Tunair* de 300 ml, incubado mediante agitación durante la noche, después se transfirieron 10 ml de crecimiento a un matraz *Tunair* de 3 l; se utilizarían tres matraces de siembra *Tunair* para inocular una producción en *Airmentor* de 25 l. El *Airmentor* de 25 l se incubó durante 3 días.

El medio de fermentación se preparó disolviendo o suspendiendo los ingredientes en agua y, posteriormente, esterilizando el medio resultante mediante tratamiento en autoclave o mediante calentamiento con vapor. El medio esterilizado se enfrió a una temperatura de entre 16 ºC y 45 ºC, se inoculó con el microorganismo y, después de ello, la fermentación se llevó a cabo con aireación y agitación utilizando matraces de agitación o fermentadores de tanque estacionario. En los matraces de agitación, la aireación se logra agitando los matraces para lograr un mezclado íntimo del medio inoculado con el aire. En fermentadores de tanque estacionario, la agitación es proporcionada por los impulsores, que pueden adoptar la forma de turbinas de disco, discos de paletas o turbina abierta o propulsores marinos. La aireación se logra rociando aire u oxígeno en la mezcla agitada.

La actividad biológica de los caldos de fermentación se analizó mediante el ensayo de difusión en agar que implica *Saccharonyces cerevisiae* (RSY) y *Aspergillus terreus* (MEVS).

Fermentación en jarra de 25 galones con agitación

Un vial criogénico que contiene aproximadamente 1 ml de una suspensión del cultivo se utilizó para inocular 100 ml

de medio de cultivo de siembra (SCM) en un matraz de agitación 300 ml *Tunair Ful-Baf* de 300 ml. El matraz inoculado se incubó durante aproximadamente 16-24 horas a 28 ºC durante 16-24 horas agitando (agitador giratorio a 180 rpm, 5 cm de recorrido). Después de obtener un crecimiento suficiente, se transfirieron alícuotas de 10 ml del crecimiento microbiano asépticamente a cuatro matraces de siembra Erlenmeyer de 2 l que contenían 500 ml de SMC. El medio inoculado se incubó a 28 ºC durante 16-24 horas en agitación (agitador giratorio a 180 rpm, 5 cm de recorrido). El crecimiento microbiano de estos cuatro matraces se reunió y se utilizó para inocular un *Airmentor* de 25 galones. El fermentador de producción contenía 20 galones (80 litros) de medio de cultivo de producción (CPM), que se "esterilizó con vapor" durante 40 minutos a 121 ºC. El medio se enfrió a 28 ºC antes de la inoculación. La fermentación se realizó durante aproximadamente 20 horas, se agitó a 155 rpm y se roció con aire a 1 CFM de aire. Se usó un antiespumante a base de silicona se utiliza para controlar la formación de espuma, según sea necesario.

Aislamiento y purificación. Después de completado el crecimiento, el micelio se separa del caldo por filtración o centrifugación y el micelio se extrajo con 3 partes de acetato de etilo. Se evaporó el extracto de acetato de etilo al vacío hasta sequedad, a continuación se lavó con acetona, produciendo un polvo de color amarillo claro, que se secó en un desecador. El polvo amarillo se procesó adicionalmente como se ilustra a continuación:

1 g de polvo amarillo claro

↓

Disolver en 5 ml de EtOH

Añadir NaOH (0,347 g de NaOH/g de polvo amarillo)

25 ml adicionales de EtOH

Dejar en la bancada con agitación ocasional durante aproximadamente 1 hora

Decantar, después centrifugar para recuperar el precipitado

Lavar con acetona

Evaporar el acetona (por ejemplo, secar en horno durante ~5 horas a 40 ºC)

Corifungina

(~ 500 mg:polvo de color marrón oscuro/naranja ladrillo)

EJEMPLO 2

Caracterización de corifungina

Análisis LC-MS

Se realizaron una serie de análisis LC-MS para determinar la composición de la muestra anterior con las siguientes condiciones:

Columna: Phenomenex Luna C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm p/n 00G-4252-E0

Detección: UV: DAD (200-600 nm)

Fase móvil A: H_2O (NH_4OAc 5 mM)

Fase móvil B: acetonitrilo (NH_4OAc 5 mM)

Velocidad de flujo: 1000 µl/min

Temperatura: ambiente

Volumen de inyección: 30 µl

Gradiente:

Tiempo	% A	% B
0,0	90	10
40,0	40	60
40,1	90	10
47,0	90	10

La Figura 1 muestra los resultados del análisis de LC-MS de la muestra de corifungina disuelta en DMSO-metanol (1: 1). El pico principal en el cromatograma UV se observó a 33,18 min (33,58 min en el ELS y 33,18 min en el TIC). El espectro de masa correspondiente a este pico se muestra en el segundo panel de la **Figura 1** y se indicó un potencial de [M + H] + ion en *m*/*z* 924 (es decir, el peso molecular de la anfotericina B).

Además, se determinaron los espectros de masas para varios de los picos menores (28,24, 32,19, 33.98, y 39,35 min en el cromatograma UV mostrados en la **Figura 1**. El análisis de los espectros de masas de los picos menores indicó que cada uno parece estar relacionado con el componente principal en la muestra como se muestra en **Figura 2.**

La LC-MS de corifungina disuelta en agua se muestra en la **Figura 3.** Al igual que con el análisis en DMSO-metanol, el pico principal en el cromatograma UV de la **Figura 3** corresponde a *m*/*z* 924 (es decir, el peso molecular de la anfotericina B). Como se ha demostrado en la **Figura 3,** la corifungina es soluble en agua.

Análisis de RMN:

Los datos de la LC-MS anterior sugiere que el componente principal presente en la corifungina era indistinguible de los espectros de la anfotericina B. Los espectros de RMN de 1H, aunque en general similares, diferían en varias regiones. Estas variaciones se deben, probablemente, a las variaciones en la composición de la muestra, lo que podría indicar que la corifungina estaba en forma de sal **(Figura 4).**

Análisis de MS:

Una muestra de corifungina se preparó en un tampón de MS estándar que consistía en acetonitrilo-H_2O con ácido fórmico al 0,1 %. Esta muestra se analizó en un espectrómetro de masas Waters Premier Q-TOF. El espectro de masas Tof de ionización por electropulverización positiva se muestra en la **Figura 5.**

El espectro de masas Tof proporcionó resultados similares a los observados por la LC-MS. El análisis de masas preciso de [M + H]+ ion observado en *m*/*z* 9240,4987 indicó que coincidía con la fórmula molecular $C_{47}H_{73}NO_{17}$ (masa calculada para $C_{47}H_{74}NO_{17}$: 924.4957, error: 3,2 ppm) para el componente principal presente en la muestra de corifungina **(Figura 6).**

Esta es la misma fórmula molecular que la anfotericina B. El análisis MS/MS con electropulverización positiva con selección de [M + H]+ ion a m/z 924 se muestra en la **Figura 7.**

Se observaron iones importantes en *m*/*z* 9060,4865 y 743,4026 que corresponden a la pérdida de H_2O y la pérdida de H_2O junto con el glicósido, respectivamente. La muestra de corifungina se analizó adicionalmente después de la adición de una pequeña cantidad de KCl y NaCl a la muestra. Como se muestra en **Figura 8,** la adición de K + y Na + permitió la adquisición de un espectro de masa similar al proporcionada con la muestra que mostró un ión significativo a *m*/*z* 9620.4553, con poco o ningún ión observado en *m*/*z* 924.

El análisis de masa exacta de los iones en m/z 946,4736 y 962,4553 indicó que correspondían a los aductos [M + Na]+ y [M + K]+, respectivamente, del componente con una fórmula molecular de $C_{47}H_{73}NO_{17}$ **(Figura 9).**

El análisis MS/MS con electropulverización positiva seleccionando el ion [M + K]+ en *m*/*z* 962 se muestra en la **Figura 10** y era idéntico al espectro de MS/MS provisto de la muestra de corifungina. Estos datos, tomados en conjunto, indican que el ion observado en *m*/*z* 962 en los datos proporcionados es casi seguro el ion [M + K]+ de un componente con la fórmula molecular $C_{47}H_{73}NO_{17}$.

Espectro UV-Vis (0,050 mg/ml 10 % de DMSO/metanol)

Comparación química: corifungina frente a anfotericina B. Se observó que la corifungina era una sal de sodio soluble en agua de la anfotericina B. Un resumen de las propiedades químicas de corifungina y anfotericina B se muestra a continuación en la **Tabla 1.**

Tabla 1. *Peso molecular, fórmula molecular y propiedades de solubilidad en agua de la corifungina.*

	Peso molecular	**Fórmula molecular**	**Solubilidad en agua**
Corifungina	946,5	$C_{47}H_{73}NO_{17}Na$	Muy soluble: > 100 mg/ml
Anfotericina B	924,5	$C_{47}H_{73}NO_{17}$	insoluble

EJEMPLO 3

Actividad antifúngica *in vitro*

Se adoptaron los ensayos de susceptibilidad antifúngica in vitro utilizando CLSI M27-A2 para especies de *Candida* y CLSI M38-A para mohos (Método de referencia para pruebas de sensibilidad a antifúngicos en dilución de caldo de levaduras; Segunda edición estándar aprobada. documento CLSI M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, Pennsylvania, EE.UU. 200); la actividad se expresó en términos de concentración mínima inhibitoria (CMI). Además, La CFM (concentración fungicida media) se realizó para cada especie. La media geométrica (MG) se calculó para cada aislado usando los tres resultados. Todas las pruebas se realizaron por triplicado para verificar la reproducibilidad de los datos.

Actividad antifúngica contra *Candida, Aspergillus,* y otros mohos frecuentes:

Se evaluaron ochenta y tres cepas *Candida*. Esto incluyó 12 especies diferentes de *Candida*, que son las especies que participan con mayor frecuencia en la mayoría de las infecciones por Candida en seres humanos. Las especies incluyen diez aislados de *C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. krusei, C. lusitaniae*, *y C. kefyr*, junto con cinco aislados de *C. dubliniensis,* y dos aislados de cada uno de *C. guilliermondii* y *C. rugosa.* Además, también había un aislado de cada uno de *C. motivo*, *C. lipolytica*, *C. sphaerica* y *C. norvegica.*

Se evaluó un total de 31 aislados de *Aspergillus* Esto incluyó seis especies diferentes de *Aspergillus* que incluía seis cepas de *A. fumigatus,* y 5 cepas de *A. flavus, A. terreus, A. niger* y *A. glaucus.*

Varios de los mohos más frecuentes también se analizaron y evaluaron, incluyendo cinco cepas de *Alternaria, Cladosporium*, *Scopulariopsis, Acremonium*y *Paecilomyces.* También se evaluaron algunos de los hongos más infrecuentes, tales como *Exophilia jeanselmei* (3), *Emmonsia parvum* (*Chrysporium parvum*) (2) y *Epioccum* spp. (2). Se usaron cepas convencionales de la ATCC de diferentes especies de *Candida* y *Aspergillus* como controles.

Los resultados de este estudio se muestran en **Tabla 2** más adelante. Estos resultados demuestran que la corifungina tiene una actividad in vitro sustancial contra numerosas especies de Candida. La concentración mínima inhibitoria media (CMI) de corifungina y anfotericina B para *C. albicans* era 0,5 µg/ml para ambos antifúngicos; para *C. tropicalis* 0,5 y 1 µg/ml; para *C. dubliniensis* 0,125 y 0,5 µg/ml; para *C. parapsilosis* 1 y 0,5 µg/ml; para *C. lusitaniae* 0,5 para ambos; para *C. krusei y C. glabrata* 1,0 µg/ml para ambos, respectivamente. Véase, por ejemplo, la **Tabla 2**.

Las CMI más bajas para corifungina se observaron en *C. albicans, C. lusitaniae* y *C. dubliniensis* a 0,5 µg/ml. Del mismo modo, las CMF para todas las especies de Candida evaluadas fueron entre 1- 2 µg/ml para corifungina y anfotericina B.

Tabla 2. *Ensayos de susceptibilidad in vitro de comparación de corifungina, anfotericina B y voriconazol frente a Candida spp.*

		CMI (µg /ml)				
Candida spp.	Agente antifúngico	Intervalo	CMI_{50}	CMI_{90}	MG	CFM
C. albicans (10)	corifungina	0,12–1	0,5	1	0,612	2
	Anfotericina B	0,12–1	0,5	1	0,612	1
	Voriconazol	< 0,03–0,25	0,03	0,06	0,06	nd
C. glabrata (10)	corifungina	0,5–1,0	1	1	0,9	2
	Anfotericina B	0,5–1,0	1	1	0,9	1
	Voriconazol	0,12–2	0,5	0,5	0,56	Nd
C. parapsilosis (10)	corifungina	0,5–1,0	1	1	0,9	2
	Anfotericina B	0,5–1,0	0,5	1	0,7	2
	Voriconazol	< 0,03–0,12	< 0,03	0,03	0,04	Nd
C. tropicalis (10)	corifungina	0,5–1,0	1	1	0,95	2
	Anfotericina B	0,5–1,0	1	1	0,95	2
	Voriconazol	< 0,03–0,5	0,06	0,12	0,13	Nd

		CMI (µg /ml)				
C. lusitaniae (10)	corifungina	0,25–1,0	0,5	1,0	0,575	2
	Anfotericina B	0,25–1,0	0,5	1,0	0,575	0,5
	Voriconazol	< 0,03–0,06	< 0,03	0,03	0,03	Nd
C. kefyr (10)	corifungina	0,5–2	1	2	1,02	2
	Anfotericina B	0,12–2,0	1	2	1,25	1
	Voriconazol	< 0,03–16	< 0,03	0,6	1,63	Nd
C. krusei (10)	corifungina	0,5–2,0	1	2	1,41	2
	Anfotericina B	0,5–2,0	1	2	1,29	2
	Voriconazol	0,25–0,5	0,25	0,5	0,425	nd
C. rugosa (2)	corifungina	0,5–1,0			0,83	2
	Anfotericina B	0,5–1,0			0,83	2
	Voriconazol	0,25			0,25	Nd
C. guilliermondii (2)	corifungina	0,5			0,5	1
	Anfotericina B	0,5			0,5	1
	Voriconazol	0,06			0,06	Nd
C. dubliniensis (5)	corifungina	0,125– 1	0,125	1	0,375	
	Anfotericina B	0,125– 1	0,5	1	0,4	
Otras *Candida* spp. (4)	corifungina	0,5–1,0	1		0,83	2
	Anfotericina B	0,5–1,0	1		0,95	2
	Voriconazol	< 0,03–1,0	0,06		0,39	nd
• MG= Media geométrica • Otras especies de *Candida* (*C. lipolytica, C. sake, C. sphaerica, C. norvegica)*						

La concentración mínima inhibitoria media (CMI_{50}) de corifungina y anfotericina B fue de 0,5 µg/ml para *A. glaucus;* 1 µg/ml para *A. niger* y *A. versicolor*, y 2 µg/ml para A*. fumigatus* y *A. flavus,* respectivamente (**Tabla 3**). En general, el intervalo de corifungina para todas las cepas de *Aspergillus* analizadas fue 0,5-2,0 µg/ml, con la excepción de un aislado de *A. flavus* que mostró una CMI de 16 µg/ml. La CMI_{50} más alta se vio en las cepas de *A. terreus*, que se sabe que son menos susceptibles o intrínsecamente resistentes a los polienos. Además, la corifungina también mostró una actividad *in vitro* excelente contra una amplia gama de mohos, incluyendo *Alternaria, Cladosporium, Scopulariopsis* y *Paecilomyces*. Por el contrario, *Acremonium* y *Exophilia* parecen ser resistentes a la misma.

Tabla 3. *Susceptibilidad in vitro, ensayos de comparación de corifungina con anfotericina B y voriconazol frente a Aspergillus spp y otros mohos*.

Fungoso	N. de aislados	corifungina			Anfotericina B		
		Intervalo	CMI_{50}	MG	Intervalo	CMI_{50}	MG
Aspergillus spp.							
A. fumigates	6	0,5 – 2	2	1,75	0,5 – 2	2	1,58
A. niger	5	0,5 – 1	1	0,8	0,5 – 1	1	0,8
A. glaucus	5	0,25–1	0,5	0,7	0,25 – 1	0,5	0,7
A. terreus	5	2–4	4	3,2	2–4	2	2,0
A. flavus	5	2–16	2	4,8	2–16	2	4,8

Fungoso	N. de aislados	corifungina			Anfotericina B		
		Intervalo	CMI_{50}	MG	Intervalo	CMI_{50}	MG
A. versicolor	5	0,25 – 2	1	0,9	0,25 –2	1	0,9
Alternaria spp.	5	0,06–0,5	0,25	0,262	0,25–0,5	0,25	0,25
Cladosporium spp.	5	0,5 –2	1	0,9	0,25–0,5	0,25	0,7
Scopulariopsis spp.	5	0,5–1	1	0,95	0,5–1	1	0,95
Acremonium spp.	5	4–8	8	7,2	8	8	8
Paecilomyces spp.	5	1 –2	1	1,6	0,5–2	1	1,4
E. jeanselmei	3	2–8	4	4,67	2–8	4	4,67
Emmonsia parvum	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Epioccum spp. (*Chrysporium parvum*)	2	1	1	1	1	1	1

Actividad frente a patógenos fúngicos endémicos

La terapia actual para los patógenos endémicos es lentamente biocida i*n vivo* o tiene problemas de toxicidad, y se necesitan alternativas. La macrodilución del caldo y los métodos de CMI (concentración mínima inhibitoria) recomendados por CLSI (se usaron en este estudio contra 14 aislados clínicas: *Coccidioides* (C) (5 aislados), *Blastomyces* (2), *Histoplasma capsulatum* (H) (5) y *Paracoccidioides* (P) (2). El criterio de valoración de CMF (concentración mínima fungicida) fue ≥ 96 % de destrucción del inóculo.

Como se demuestra en la **Tabla 4**, las CMI de la corifungina variaron poco de 0,5 (el 2 P) a 2 mcg/ml en 14/14 casos. Las CMI de la anfotericina B variaron de 0,5 (para 4 de la H) a 4 (para 3 de la C) mcg/ml. La CMF de corifungina igualaron las CMI en 14/14 casos. Las CMF de la anfotericina B variaron de 0,5 (para 4 de la H) a ≥8 (para 3 de la C), e igualó las CMI de la anfotericina B en 11/14 casos, con 3 C con CMF de la anfotericina B de 1 a ≥3 diluciones más altas que la CMI de la anfotericina B. Las CMI de la corifungina eran ≤2 diluciones dobles diferentes de anfotericina B en las 14 pruebas, con 5 corifungina <anfotericina B (3 de ellas C, 2 P), 5 corifungina> anfotericina B (4 de ellos H), y 4 iguales. Las CMF de la corifungina fueron ≤ 2 diluciones diferentes de la anfotericina B en12/14 casos con 2 C aislados que tienen CMF de anfotericina B ≥4 veces mayores que la corifungina.

Tabla 4. *Ensayos de susceptibilidad in vitro comparando corifungina con anfotericina B contra patógenos fúngicos endémicos.*

N. º de aislado	CMI/CFM de corifungina	CMI/CFM de anfotericina B
Coccidioides sp		
1	2/2	2/8
2	1/1	4/8
3	2/2	1/>8
4	2/2	4/4
5	1/1	4/4
Blastomyces dermatitidis:		
1	16/16	2/2
2	8/8	1/1

Ensayos de destrucción en el tiempo (EDT)

Los perfiles de actividad de corifungina otros antifúngicos utilizando el ensayo de tiempo de destrucción (ATR). **Las figuras 13, 14,** y **15** demuestran la actividad fungicida sustancial de corifungina en comparación tanto con la anfotericina B como también con anidulafungina contra los tres aislados de *Candida spp que se aísla con mayor frecencia.*

EJEMPLO 4

Actividad antifúngica *in vivo*

Actividad contra *Candida* en ratones inmunocompetentes

Metodología

Ratones CD-1 macho (*Crl*.) con un peso 24 ± 2 g se mantuvieron en un ambiente de temperatura (22 ºC - 24 ºC) y humedad (60 % - 70 %) controladas con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad durante al menos una semana. El libre acceso a comida de laboratorio estándar para ratones (MF-18, Oriental Yeast Co., Ltd. Japón) y agua RO y la realización de estudio se efectuaron de acuerdo con el Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy Press, Washington, DC, 1996).

Se inoculó a los ratones por vía intravenosa (i.v.) una DL90-100 de *Candida albicans* (ATCC 44858), 5,2 x 10^5 UFC/ratón en 0,2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) sin mucina. Se administraron corifungina a 0,5, 5,0 y 50 mg/kg y vehículo de control por vía oral (v.o.) a los animales de ensayo una hora después de la inoculación de los hongos. Se administró el agente de referencia positivo de anfotericina B (3 mg/kg) (v.o.). El volumen de dosificación fue de 10 ml/kg.

La corifungina, anfotericina B y el vehículo control (agua destilada) se administraron por vía oral a los animales de ensayo una hora después de la inoculación de los hongos. La mortalidad se monitorizó una vez al día durante 15 días.

Resultados

Como se demuestra en la **Figura 16**, se observó una protección significativa (incremento > 50 % de la tasa de supervivencia) para corifungina a las dosis de 5,0 y 50,0 mg/kg (aumento del 80 % en la supervivencia) con respecto al grupo de vehículo control (0 %) durante el período de observación de 15 días. La dosis mínima eficaz está en el intervalo de 0,5-1,0 mg/kg. El control positivo, la anfotericina B a 3 mg/kg, v.o. exhibió aumento del 80 % en la tasa de supervivencia.

Actividad contra las infecciones vaginales en ratones

Metodología

A ratones hembra C3H (en lugar de CBA/J) de 8-10 semanas de edad y un peso de 20 g obtenidos de los Institutos Nacionales de Salud (NCI, Frederick, MD) se inyectó primero por vía subcutánea (con sujeción manual) 1,0 mg de valerato de estradiol disuelto en aceite de sésamo 72 horas antes de la inoculación vaginal. Para obtener una infección vaginal persistente en los roedores era necesario que estuvieran en un estado de seudoestro. Las inyecciones semanales satisfacen este requisito. Por tanto, para estos experimentos, el estrógeno se administró el día -2 con inoculación el día 0. Para la inoculación vaginal, se anestesió a los animales “hasta su efecto" mediante inhalación de isofluorano. A los animales anestesiados se introdujeron 5x10^5 blastosporas de *C*. *albicans* en 20 µl de PBS en la vagina, usando un Pipetman. Los tratamientos con corifungina administrados por sonda oral (5 y 50 mg/kg en 250 µl de agua y 50 mg/kg en 250 µl de PBS pH 7,5) comenzaron el día 2 después de la inoculación y continuaron una vez al día hasta el día 4. La corifungina se disolvió en agua y después se diluyó con PBS. El tratamiento de corifungina administrado mediante inyección intraperitoneal (IP) fue 50 mg/kg en 500 µl de agua. Los controles positivos para la infección y los controles negativos para el fármaco incluyeron animales infectados tratados con vehículo (agua/PBS). El día 5, se sacrificó a grupos distintos de 6 animales mediante dislocación cervical y se lavaron las vaginas con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS). El líquido de lavado se cultivó posteriormente para el recuento de organismos. El líquido de lavado se diluye en serie utilizando diluciones 1:10 (10 µl en 90 µl de PBS). De cada tubo de dilución, se añaden 10 µl a una placa de agar Sabouraud con cloranfenicol 50 µ/ml y se extendieron con un extendedor. Las placas se incuban a 30 ºC durante 48-72 horas. El número de colonias de levadura se cuentan en las placas y se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC).

Resultados

Como se demuestra en la **Figura 17**, la corifungina disuelta en agua y administrada por vía oral por sonda o por vía intraperitoneal era activa contra *Candida albicans* DB597.94 a una dosis de 50 mg/kg.

Actividad frente a las infecciones por hongos en ratones neutropénicos

Metodología

Para todos los estudios se utilizaron ratones hembra sin patógenos específicas ICR/Swiss de seis semanas de edad y un peso de 23 a 27 g (Harlan Sprague Dawley, Madison, Wis.). Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Comité de Investigación Animal del Hospital William S. Middleton Memorial VA. Se indujo neutropenia en todos los ratones (<100 leucocitos polimorfonucleares por mm^3) mediante inyección con ciclofosfamida (Mead Johnson Pharmaceuticals, Evansville, Ind.) por vía intraperitoneal 4 días (150 mg/kg de peso corporal) y 1 día (100 mg/kg) antes de la infección.

Se infectó a los ratones neutropénicos con un aislado clínico de *Candida* mediante inyección de 0,1 ml de inóculo a través de la vena lateral de la cola 2 horas antes del comienzo de la terapia farmacológica. Dos horas después de la infección, se trató a los ratones con dosis únicas de sonda oral de corifungina (2, 10, 50 y 250 mg/kg) administrados en volúmenes de 0,2 ml. Al final del período de estudio, se sacrificó a los animales mediante asfixia con CO_2. Después del sacrificio, se extirparon los riñones de cada ratón inmediatamente y se introdujeron en solución salina estéril al 0,9 % a 4 ºC. A continuación, el homogeneizado se diluyó en serie a 1:10, y las alícuotas se sembraron en agar dextrosa Sabouraud (SDA) para el recuento de las colonias de hongos viables después de la incubación durante 24 horas a 35 ºC. El límite inferior de detección fue de 100 UFC/ml. Los resultados se expresaron como la media de UFC por riñón para dos ratones (cuatro riñones).

Resultados

La carga del organismo en el riñón se utilizó como criterio de valoración del tratamiento en el tiempo. Se obtuvieron muestras de grupos de tres ratones en cada punto de tiempo. Los resultados de este estudio se muestran en la **Figura 18**. Cada símbolo representa la media del log_{10} de ufc/riñones de tres ratones y las barras de error representan la desviación estándar. Como se demuestra en la **Figura 18**, la corifungina fue muy eficaz en la reducción de la carga de C. *albicans* en los riñones de los ratones neutropénicos. Cada dosis de corifungina inhibió el crecimiento del organismo en los riñones durante las primeras 24 horas de estudio. La dosis más alta proporcionó una protección similar durante 48 horas y demostró cierta eficacia a las 96 horas.

Se obtuvieron muestras de suero de tres ratones en cada uno de los puntos de tiempo para los que se evaluó la carga renal. Se usó un ensayo microbiológico descrito anteriormente para medir las concentraciones de corifungina. El ensayo inicial mostró sensibilidad muy deficiente y no detectó concentraciones mensurables de corifungina. La resolución de problemas del ensayo mejoró la sensibilidad del ensayo hasta valores cercanos a los del ensayo original (0,5 mg/ml). La repetición de la ejecución de las muestras detectó concentraciones en el límite de detección para el nivel de dosis más alta (250 mg/kg) a las 12 horas. La corifungina demostró una actividad estática para cada uno de los 4 niveles de dosis durante períodos prolongados de tiempo. El período de supresión del crecimiento dependía de la dosis, lo que sugirió una absorción gastrointestinal saturable pero continua. El ensayo microbiológico de corifungina no era lo suficientemente sensible para caracterizar la farmacocinética.

EJEMPLO 5

Toxicología, histopatología y farmacocinética (PK) de la corifungina

Toxicología

Metodología

Ratas SD con la vena yugular canulada (JVC), después de un periodo de aclimatación de 7-12 días, se pesaron y se distribuyeron al azar en 7 grupos experimentales de 4 animales. Se administró corifungina diariamente a las ratas de estudio mediante sonda oral durante 28 días a tres dosis de 0,5, 50, y 250 mg/kg y la anfotericina B se administró por vía intravenosa tres días a la semana a una dosis de 0,5, 1,0 o 1,5 mg/kg. Durante todo el estudio, se observó diariamente a los animales. Se pesó a los animales una vez a la semana y el día de la muerte. El día 30 del estudio, se dosificó a los animales la última vez y, después, se recogieron muestras de plasma de cada animal a los 15 minutos y 1, 2, 6, 24, 48 y 72 horas después de la dosis para un análisis farmacocinético final de anfotericina B o corifungina. Se sacrificó a los animales el día 33 del estudio. Se mantuvo a los animales en ayunas durante la noche y se introdujeron en jaulas metabólicas para la obtención de la orina. Antes del sacrificio se extrajo sangre (0,5-1,0 ml) se recogió mediante punción cardíaca o sangrado orbital para el análisis hematológico y bioquímico. Los animales fueron sacrificados mediante asfixia con dióxido de carbono. El análisis hematológico y bioquímico se llevó a cabo en todas las muestras de sangre y suero recogidas. Además, se realizó un panel de análisis de orina con todas las muestras de orina recogidas.

Resultados del análisis de bioquímica clínica

En la **Tabla 5** resumen los resultados del estudio de bioquímica clínica. Los animales toleraron bien la corifungina. A 250 mg/kg, los valores de bioquímica clínica están dentro del intervalo normal. Los animales toleraron bien la corifungina hasta un nivel de 250 mg/kg cuando se administró por sonda oral durante 28 días. Se determina que el nivel sin efecto adverso (NOAEL) para corifungina en este estudio es de 250 mg/kg. No se observó toxicidad en ratas cuando se administró anfotericina B por vía intravenosa a 1,5 mg/kg tres veces a la semana durante 28 días.

Tabla 5. *Valores de bioquímica clínica de los sueros de ratas a las que se administró diariamente por vía oral corifungina durante 28 días hasta 250 mg/kg en comparación con el control y el tratamiento con anfotericina B*

Dosis de tratamiento	Na	K	Cl	Mg	BUN	Creat	ALT	ALK	TP	ALB	GLOB	A/G
Corifungina												
0,5 mg	139	4,8	98	1,5	13	0,5	35	82	60	3,4	2,6	1,3
50,0 mg	140	4,6	99	1,8	16	0,6	34	61	60	3,3	2,7	1,3
250,0 mg	142	6,3	97	2,1	26	0,8	43	121	57	2,9	2,8	1,1
Control												
(H_2O)	1141	5,0	101	1,5	16	0,6	33	101	57	3,3	2,4	1,4
Anfotericina B												
0,5 mg	140	4,7	103	1,7	15	0,6	37	74	59	3,2	2,6	1,2
1,0 mg	140	5,1	102	1,7	16	0,6	37	61	6,0	3,2	2,7	1,3
1,5 mg	132	4,8	93	1,5	17	0,6	36	69	65	3,4	2,4	1,4
Electrolitos: Na^+ = Sodio; K^+ = Potasio; Cl = cloruro; Mg^{2+} = = magnesio *Marcador renal*: BUN = nitrógeno ureico en sangre; Creat = Creatinina *Marcador hepático:* ALT = Alanina aminotransferasa; ALK = fosfatasa alcalina *Var*: TP = Proteína total; ALB = albúmina; GLOB = globulina; A/G = relación albúmina/globulina												

Histopatología

Metodología

Se administró a las ratas corifungina todos los días mediante sonda oral durante 28 días a tres dosis de 0,5, 50, y 250 mg/kg. Se sacrificó a los animales el día 33 del estudio. Después del sacrificio se realizó una necropsia macroscópica completa y se recogieron los siguientes tejidos y se fijaron en formalina al 10 % para su análisis histopatológico: pulmón y tráquea, hígado, bazo, esófago, estómago, intestino y ganglios linfáticos submandibulares/glándulas salivales. Se prepararon portaobjetos histológicos con H y E que contenían los tejidos y examinaron con microscopia óptica.

Resultados

No se produjo ningún hallazgo histomorfológico relacionado con el artículo de ensayo. No hubo signos de cambios infecciosos, tóxicos, neoplásicos o del desarrollo ni transformaciones en ninguna de las secciones de tejido evaluadas.

Perfil farmacocinético

Metodología

Se pesó a las ratas hembra SD con la vena yugular canulada después de un mínimo de 7 días de periodo de aclimatación y se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales formados por 3 animales cada uno. Los grupos 1, 2 y 3 recibieron dosis de corifungina a través de una sonda oral de 0,5 mg/kg, 50,0 mg/kg y 250 mg/kg, respectivamente. Los grupos 4, 5 y 6 recibieron dosis corifungina por vía intravenosa (i.v.) de 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente. Los grupos 7, 8 y 9 recibieron dosis de anfotericina B de 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg y 1,5 mg/kg respectivamente. Se prepararon soluciones de dosificación de corifungina directamente en agua estéril para sonda oral; las soluciones de dosificación i.v. de corifungina se prepararon directamente en dextrosa al 5 %. La anfotericina B-desoxicolato se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, se resuspendieron en 10 ml de agua y se diluyeron más en 5 % de dextrosa). La administración i.v. se llevó a cabo a través de la cánula de la vena yugular.

Las muestras de sangre (~200-300 µl) se obtuvieron de todos los animales de los grupos 1-9 a los 15 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas después de la administración de la dosis. Se extrajeron al menos 200 µl de sangre tirando hacia atrás del émbolo de la jeringa; la sangre se extrajo directamente de la vena de la cola en tubos de heparina. El tubo/jeringa S-Monovet que contenía la muestra de sangre recogida se invirtió para mezclar la sangre con el anticoagulante inmediatamente después de la recolección y después se colocó en hielo. Los tubos S-Monovet se centrifugaron después para separar el plasma y las muestras de plasma se transfirieron a nuevos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml etiquetados y se almacenaron a -80 ºC hasta el momento de análisis.

Resultados

El nivel de corifungina en las muestras de plasma se determinó mediante ensayo microbiológico. Por lo tanto, se establece una curva estándar de actividad del antibiótico para la corifungina y la actividad antifúngica observada en el plasma de la muestra se representa frente a la curva para determinar la concentración de antibiótico. Los resultados de este estudio se muestran en la **Figura 19** (administración v.o.) y la **Figura 20** (administración i.v.).La corifungina administrada v.o. se absorbe a través de la mucosa intestinal y permanece en la corriente sanguínea incluso después de 4 días (96 horas): la dosis de 0,5 mg/kg produce un máximo a las 48 horas, mientras que la dosis de 50 mg/kg produce un máximo a las 6 horas (véase la **Figura 19**). Por otro lado, la corifungina administrada i.v. mostró un perfil de distribución en estado estacionario con una concentración máxima justo después de la inyección (15 min) y va disminuyendo gradualmente, pero todavía es detectable después de 4 días (véase la **Figura 20**).

EJEMPLO 6

Tratamiento de la meningoencefalitis amebiana primaria con corifungina

Metodología

Diez animales (cada uno de un mes de edad) por grupo se usaron para un estudio *in vivo* en el que se investigó el tratamiento de la meningoencefalitis amebiana primaria utilizando corifungina. Los ratones Balb/c se infectaron con $2x10^4$/ 20 µl de trofozoítos de *Naegleria fowleri.* Se trató a los ratones infectados con uno de (i) un control (PBS), (ii) anfotericina B (9 mg/kg/día para un total de 10 días), o (iii) corifungina (9 mg/kg/día durante una total de 10 días). La necropsia de los ratones se realizó 17 días después de la infección. Las muestras representativas del cerebro se fijaron en paraformaldehído al 4 %/PBS, se embebieron, seccionaron y tiñeron con H & E.

Resultados

Grupo control. La **Figura 21** muestra el estado de la enfermedad meningoencefalitis a los 11 día de la infección por *Naegleria fowleri* y siguiendo un tratamiento con un control de PBS. La **Figura 21 (A)** representa meningoencefalitis en ratón Balb/c desarrollada en los bulbos olfatorios después de la infección con *Naegleria fowleri*. Se observó una reacción inflamatoria compuesta principalmente por neutrófilos. La necrosis de tejido en el grupo control fue generalizada. La **Figura 21 (B)** muestra la misma área y demuestra que había numerosos trofozoítos (puntas de flecha) y células inflamatorias (flechas) presentes en la muestra de tejido. Las **figuras 21 (C)** y **(D)** muestran un mayor aumento de la misma zona y demuestra que había amebas (puntas de flecha) y neutrófilos (flechas) presentes en la muestra de tejido.

Grupo de anfotericina B. La **Figura 22** muestra el estado de la enfermedad meningoencefalitis después de la infección por *Naegleria fowleri* y el posterior tratamiento con anfotericina B (9 mg/kg/día durante un total de 10 días). Las **Figuras 22 (A)** y **(B)** representan meningoencefalitis en ratón Balb/c desarrollado en los bulbos olfatorios después de la infección con *Naegleria fowleri*. Los bulbos olfatorios mostraron varias amebas (puntas de flecha) y células inflamatorias (flechas). Las **figuras 22 (C)** y **(D)** muestran un mayor aumento de la misma zona.

Grupo de corifungina. La **Figura 23** muestra el estado de la enfermedad meningoencefalitis después de la infección por *Naegleria fowleri* y el posterior tratamiento con corifungina (9 mg/kg/día durante un total de 10 días). Las **Figuras 23 (A)** y **(B)** representan meningoencefalitis en ratón Balb/c desarrollada en los bulbos olfatorios después de la infección con *Naegleria fowleri*. Los bulbos olfatorios mostró múltiples focos inflamatorios sin trofozoítos (flechas). Las **figuras 23 (C)** y **(D)** muestran un mayor aumento de la misma zona.

La tasa de supervivencia se comparó tras la infección por *Naegleria fowleri* y el posterior tratamiento con (i) un control, (ii) anfotericina B (9 mg/kg/día durante un total de 10 días), y (iii) corifungina (9 mg/kg/día durante un total de 10 días). La **Figura 24** muestra el porcentaje de animales supervivientes como una función del tiempo después del tratamiento con (i) un control de PBS, (ii) anfotericina B y (iii) corifungina. Como se muestra en la **Figura 24**, la anfotericina B no produjo ninguna mejora en la supervivencia sobre el control. Sorprendentemente, no se observaron muertes de animales tratados con corifungina.

EJEMPLO 7

Tratamiento de la Leishmaniasis visceral usando corifungina

Análisis *in vitro*

Metodología

La **Figura 19** demuestra la distribución farmacocinética favorable para corifungina. Los animales toleraron bien la corifungina con una toxicidad mínima. Como se demuestra en la **Tabla 5**, los valores de bioquímica clínica para

corifungina están dentro del intervalo normal a 250 mg/kg. Los animales toleraron la corifungina hasta un nivel de 250 mg/kg cuando se administra por sonda oral durante 28 días. Se determina que el nivel sin efecto adverso (NOAEL) para la corifungina de este estudio es> 250 mg/kg.

Dado que la corifungina pertenece a la misma clase de antibióticos que la muy potente anfotericina B anti-Leishmania, su actividad se analizó frente a **Leishmania donovani** (es decir, uno de los agentes conocidos por causar leishmaniasis visceral). Se desarrolló un ensayo de alto contenido que permitió la detección selectiva de la actividad de los compuestos contra el estadio de amastigotes intracelulares de *Leishmania* infecciosos para seres humanos. La ventaja de esta técnica es que la actividad de los compuestos se evalúa directamente en contra del estadio del parásito relevante para la infección humana. Además, da una indicación importante de la toxicidad del compuesto hacia las células humanas.

Este ensayo basado en células utiliza una línea celular de monocitos humana, THP-1 (ATCC TIB202) (Ogunkolade et al, Acta Trop., 47: 171-176 (1990)). Mediante crecimiento exponencial, las THP-1 ($5x10^5$ células/ml) se diferenciaron en macrófagos mediante tratamiento con miristato acetato de forbol (PMA) 0,1 µM a 37 ºC durante 48 h. Después de la activación por PMA, las células se lavaron y se incubaron con promastigotes de fase estacionaria de *L. donovani* (cepa IS, clon 2D (MHOM/SD/62/1S-cl2D)) en una relación macrófago/promastigote de 1/15. Después de 4 horas de incubación a 37 ºC, los promastigotes no internalizados se eliminaron mediante 2-3 lavados sucesivos y se añadieron los compuestos de interés a los cultivos. La actividad de la corifungina se analizó en un estudio de respuesta a la dosis: los compuestos se diluyeron en serie 2 veces en agua con concentraciones del ensayo finales que van desde 10 µM a 0,005 µM. Se añadieron al cultivo anfotericina B (concentración final 2 µM) y agua como controles positivos y negativos, respectivamente. Los cultivos se incubaron a 37 ºC durante 72 horas. A continuación, las células se fijaron con formaldehído y se tiñeron con el marcador de ADN DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol), lo que permite la visualización de los núcleos de la célula huésped y los cinetoplastos parasitarios. Las imágenes obtenidas con un microscopio epi-fluorescente InCell Analyzer automatizado 1000 (G. E. Healthcare) mostraron una diferencia significativa de tamaño entre estos dos orgánulos. Esta característica se explotó para la segmentación de imágenes y la determinación del número de parásitos y células huésped para cada condición, como se muestra en las **figuras 25** y **26**. La proporción de ADN del parásito con los núcleos del huésped se seleccionó como la salida de medición. El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calculó basándose en los controles positivos y negativos.

Resultados

La **Figura 25** muestra la infección de las células THP-1 con *L. donovani*. La **Figura 25 (A), (B), (C)** y **(D)** representan la detección y segmentación de la célula huésped THP-1 y los amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Las imágenes se obtuvieron con el INCell Analyzer 1000 (20x) de las células THP-1 infectadas con *L. donovani* y tratadas con 1 % de DMSO (**Figura 25 (A)** y **(B)**) o anfotericina B 2 µM (**Figura 25 (C)** y **(D)**). La segmentación de los núcleos de células huésped y el parásito cinetoplasto fueron imágenes utilizando el software InCell desarrollador caja de herramientas (**La Figura 25 (B)** y **(D)**). Los contornos grandes de **la Figura 25 (B)** y **(D)** representan los núcleos de la célula huésped y los bordes que representan los límites de las células huésped. Los contornos de los gránulos pequeños dentro de las células huésped en **la Figura 25 (B)** representan el cinetoplasto del parásito.

La **Figura 25 (E)** representa la evolución de la relación entre parásitos y las células huésped y el número de células huésped THP-1 en un curso de tiempo de 72 horas para las muestras tratadas con anfotericina B. Las células THP-1 y de *L. donovani* se contaron en varios puntos de tiempo después de la infección usando un InCell 1000. Los cuadrados blancos representan el número promedio de núcleos del huésped por pocillo (n = 8); los círculos negros representan el número promedio de parásitos contados por pocillo dividido por el número de núcleos del huésped por pocillo (n = 8). Como se demuestra en la **Figura 25 (E)**, la relación entre el parásito y la célula huésped aumentó durante el curso de la infección con *L. donovani* y el número de células huésped se mantuvo esencialmente constante.

La **Figura 26** muestra el efecto de la corifungina sobre el crecimiento intracelular de *L. donovani* y el crecimiento de las células huésped THP-1. La **Figura 26(A)** muestra una curva de respuesta a la dosis para corifungina que representa el porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito. Los valores representan la media para dos experimentos independientes.

La corifungina inhibió el crecimiento del parásito a 10 µM (inhibición de crecimiento del 100 %). Su CI_{50} contra los amastigotes intracelulares de *L. donovani* fue 0,09 µM, que es comparable con lo observado para la anfotericina B (la CI_{50} calculada para la anfotericina B fue 0,05 µM) (véase la **Figura 26 (A)**). Estos resultados indicaron una actividad *in vitro* muy potente de corifungina contra *L. donovani*.

La **Figura 26 (B)** compara el número de macrófagos THP-1 infectados *con L. donovani* después del tratamiento con corifungina 10 µM, corifungina 5 µM, corifungina 1 µM, anfotericina B 2 µM y agua. La corifungina a la concentración más alta analizada (10 µM) no afectó el número de THP-1 por pocillo, excluyendo un efecto tóxico importante del compuesto hacia las células huésped (véase la **Figura 26 (B)**).

Análisis *in vivo*

Metodología

La eficacia *in vivo* de la corifungina se evaluó en un modelo de ratón de leishmaniasis visceral (Seifert, Antimicrob Agents Chemother 50: 73-79 (2006)). Los promastigotes de *L. donovani* (10^7/ratones) se inyectaron por vía intravenosa. Siete días después de la infección, se trató a los ratones con agua o con corifungina a 30 mg/kg (3 ratones por grupo). Se administró corifungina por vía intraperitoneal, todos los días durante 5 días. Los ratones se pesaron y se sacrificaron tres días después de la finalización del tratamiento (15 días después de la infección). La carga parasitaria en el tejido hepático se cuantificó mediante cultivo cuantitativo de dilución límite: se homogeneizaron los hígados y, a continuación, se sembraron diluciones en serie por cuatro de la suspensión de tejido homogeneizado y se cultivaron a 26 ºC durante 3 semanas. Se examinaron los pocillos para detectar promastigotes viables a intervalos de 3 días y se consideró que el recíproco de la dilución más alta positivo para los parásitos era la concentración de los parásitos (Melby, et al, Infect Immun 66: 18-27 (1998)).

Resultados

La **Figura 27** muestra la eficacia *in vivo* de la corifungina en un modelo de ratón con leishmaniasis. Los puntos de datos representan las cargas de parásito de los ratones individuales infectados tratados o no tratados. Los datos se presentan como las medias ± SD (n= 3). Como se muestra en la **Figura 27**, la corifungina a 30 mg/kg inhibió completamente el crecimiento del parásito. Por lo tanto, se demostró que la corifungina era activa contra *L. donovani* tanto *in vitro* como i*n vivo*. Su CI_{50} *in vitro* fue comparable a la de la anfotericina B.

EJEMPLO 8

Tratamiento tópico de la onicomicosis usando corifungina

Evaluación dermatológica por un podólogo clínico:

El paciente se ha quejando de uñas descoloridas con hongos, especialmente el dedo gordo del pie derecho. El problema ha persistido durante un tiempo. Es algo doloroso e incómodo. El paciente tiene también algunos problemas con el pulgar de la mano derecha y algunos de sus miembros menores también.

Algo de lisis y decoloración verdosa de la uña del dedo pulgar de la mano derecha, distrofia del dedo gordo del pie derecho con restos subungueales e hiperqueratosis. OM leve de la izquierda y algunos de los dedos menores bilateralmente. En total afecta a aproximadamente 6 uñas. El color de la piel, la humedad, la temperatura y la textura carecen esencialmente sin complicaciones. No se observan signos de petequias, equimosis o erupciones. Los espacios entremedias son claros, no hay signos de tiñas. No se observa ninguna señal de intertrigo. La temperatura de la piel es caliente de proximal a distal. No se observan lesiones plantares. No se observan cambios atróficos en la piel. No se observaron signos de dermatitis por estasis ni pigmentaciones. No se observan eczemas.

Infección por hongos en las uñas de los pies, que no ha respondido a PENLAC® y LAMISIL®. Se prescribe PENLAC® NAIL LACQUER (ciclopirox), solución tópica al 8 %, como componente de un programa de gestión integral de la onicomicosis (infección ungueal fúngica). La retirada de la uña infectada desprendida con una frecuencia mensual por parte de un profesional sanitario y el recorte semanal de la uña por parte del paciente y la aplicación diaria de la medicación son parte integral de esta terapia. Ciclopirox (también denominado LOPROX®, PENLAC® y STIEPROX®) es un agente antifúngico sintético para uso tópico dermatológico. Actualmente se está investigando como tratamiento alternativo al ketoconazol para la dermatitis seborreica, ya que suprime el crecimiento de la levadura *Malassezia furfur.* Los resultados iniciales muestran una eficacia similar a la del ketoconazol con un aumento relativo del alivio del síntoma subjetivo debido a sus propiedades antiinflamatorias inherentes. A menudo se prescribe LAMISIL® (comprimidos de clorhidrato de terbinafina) 250 mg por vía oral para el tratamiento de la onicomicosis de la uña del pie o la uña de la mano producida por el dermatofito *Tinea unguium.* Las infecciones fúngicas ungueales se encuentran en profundas debajo de la uña en la cutícula a la que los tratamientos aplicados tópicamente son incapaces de penetrar en cantidades suficientes. Los comprimidos pueden, en raras ocasiones, provocar hepatotoxicidad, por lo que se advierte de ello a los pacientes y se puede realizar un seguimiento con pruebas de la función hepática. El clorhidrato de terbinafina es un antifúngico de alilamina sintético; de naturaleza altamente lipófila y tiende a acumularse en los tejidos de la piel, las uñas y las grasas.

Tratamiento prescrito

Dado que la infección en la uña del pie no respondía a PENLAC® ni a LAMISIL®, se aplicó con hisopo 1 mg/ml (solución acuosa) de corifungina en el dedo del pie infectado dos veces al día durante 1 semana.

Resultados

Después de un mes, un podólogo examinó al paciente y realizó las siguientes observaciones: las dos uñas del dedo

gordo del pie están mejorando. Hay crecimiento de la uña, pero asintomática. Las placas de las uñas sí parecen estar mejorando. Este **EJEMPLO** demuestra que la corifungina trata con eficacia las infecciones fúngicas de las uñas de los pies cuando se administra por vía tópica.

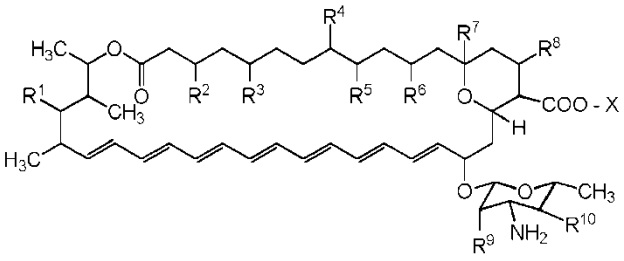
EJEMPLO 9

Formulaciones de corifungina

En este **EJEMPLO** se describen dos formulaciones de ejemplo de corifungina que exhiben ventajosamente una absorción elevada en la mucosa del intestino delgado. En cada formulación, la absorción mejora mediante el uso de un potenciador de la permeación. En la primera formulación, la corifungina se formuló con 0,5 % (m/v) del potenciador de la permeación, quitosan-4-tiobutilamidina (quitosano-TBA), y 5 % (m/v) de glutatión. En la segunda formulación, la corifungina se formuló con 0,5 % (m/v) del potenciador de la permeación, quitosano, y 5 % (m/v) de glutatión. Para cada formulación, los componentes se homogeneizaron y directamente se prensaron formando comprimidos. El efecto de cada formulación se evaluó mediante la determinación de la cantidad de rodamina que se pasó a través de una muestra de mucosa del intestino delgado.
Como se muestra en la **Figura 28**, la primera y la segunda formulación mejoran de forma significativa la permeación de la mucosa del intestino delgado. En particular, la primera formulación que comprende quitosan-4-tiobutilamidina presentó una potenciación de la permeación de la membrana particularmente significativa.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de estructura I en la fabricación de un medicamento para tratar o inhibir la onicomicosis en un sujeto;

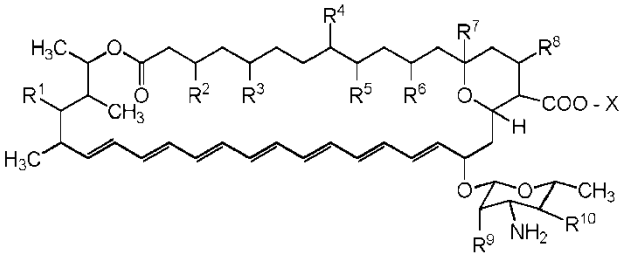


(I)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoílo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio.

2. Un compuesto de estructura I:



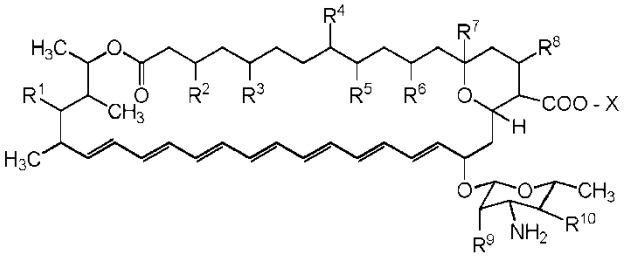
(I)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoilo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio;

para su uso en el tratamiento o la inhibición de la onicomicosis en un sujeto.

3. Uso de un compuesto de estructura I en la fabricación de un medicamento para tratar o inhibir una infección parasitaria en un sujeto:



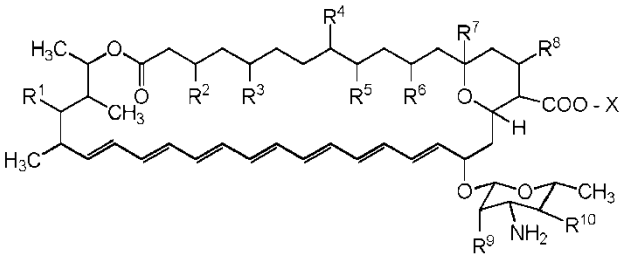
(I)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoilo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio;

en el que la infección parasitaria es una infección por protozoos.

4. Un compuesto de estructura I:



(I)

o un estereoisómero o tautómero farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente hidrógeno, -OH, -SH, amino, nitro, ciano, halo, alcoxi C_1–C_6 opcionalmente sustituido, alcanoilo C_1–C_6 opcionalmente sustituido, amida, carboxi, o éster; y
X es sodio;

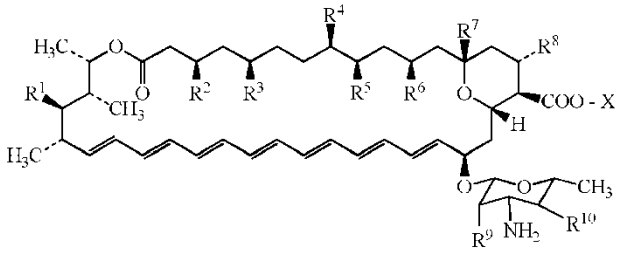
para su uso en el tratamiento o la inhibición de una infección parasitaria en un sujeto, en el que la infección parasitaria es una infección por protozoo.

5. El uso de la reivindicación 3, o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la infección parasitaria es meningoencefalitis amebiana primaria.

6. El uso de la reivindicación 3, o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la infección parasitaria es leishmaniasis, por ejemplo en el que la leishmaniasis es leishmaniasis visceral o leishmaniasis cutánea.

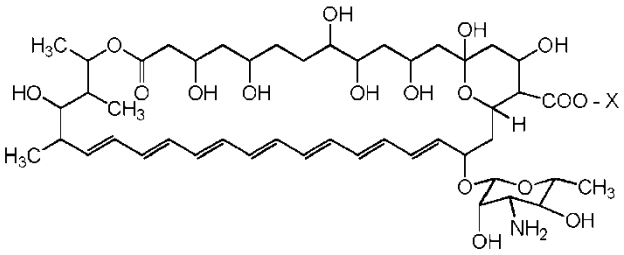
7. El uso de la reivindicación 1, o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el compuesto se administra por vía oral, parenteral o tópica.

8. El uso de las reivindicaciones 1 o 3, o el compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 4, en el que el compuesto tiene la siguiente estructura (II):



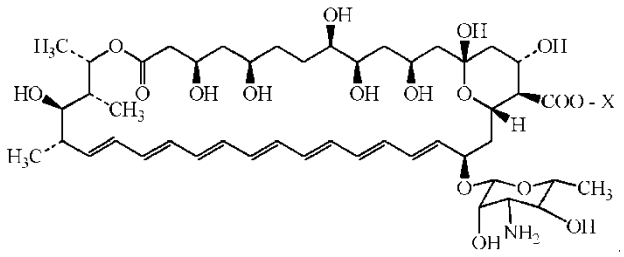
(II).

9. El uso de las reivindicaciones 1 o 3, o el compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 4, en el que R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente -OH y el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (III) o (IV)



(III)

o



(IV)

10. El uso de las reivindicaciones 1 o 3, o el compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 4, en el que el compuesto se formula en una composición farmacéutica junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

11. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable es un excipiente potenciador de la permeación.

12. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el excipiente potenciador de la permeación es quitosano.

13. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el excipiente potenciador de la permeación es N-carboximetilquitosano, ácido poli-acrílico, o una combinación de los mismos.

14. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el excipiente potenciador de la permeación es quitosan–4–tiobutilamidina.

15. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el excipiente potenciador de la permeación es un conjugado de quitosan–glutatión.

16. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable tiene una concentración de entre 0,1 % y 40,0 % p/p.

17. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con reivindicación 16, en el que el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende quitosan-4-tiobutilamidina y glutatión, preferentemente de 0,1 % a 1,0 % de quitosan-4-tiobutilamidina y de 1 % a 10 % de glutatión, más preferentemente de 0,5 % de quitosan-4-tiobutilamidina y 5 % de glutatión.

18. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que: (a) la composición farmacéutica está en forma de un comprimido o gránulo, o (b) la composición farmacéutica es acuosa, por ejemplo en la que la composición farmacéutica acuosa es una crema, gel, loción, pasta o solución.

19. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, que además comprende:
un vehículo farmacéuticamente aceptable tópico; y
un agente piel-potenciador de la permeación de la piel que comprende un hidróxido inorgánico.

20. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el pH está entre 8,0 y 11,5, preferentemente en el que el pH está entre 8,0 y 10,5.

21. El uso o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el hidróxido inorgánico es hidróxido amónico, hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio, o una combinación de los mismos.

22. El uso o compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el hidróxido inorgánico es hidróxido de sodio.

23. El uso de la reivindicación 1 o 3, o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, en el que el compuesto es:

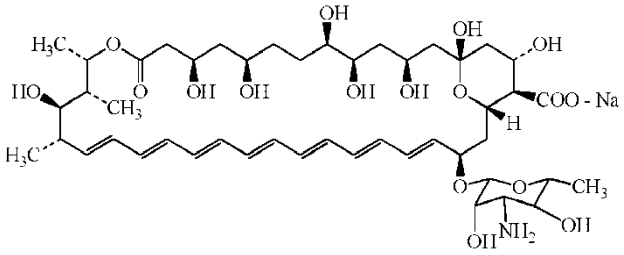


Figura 1

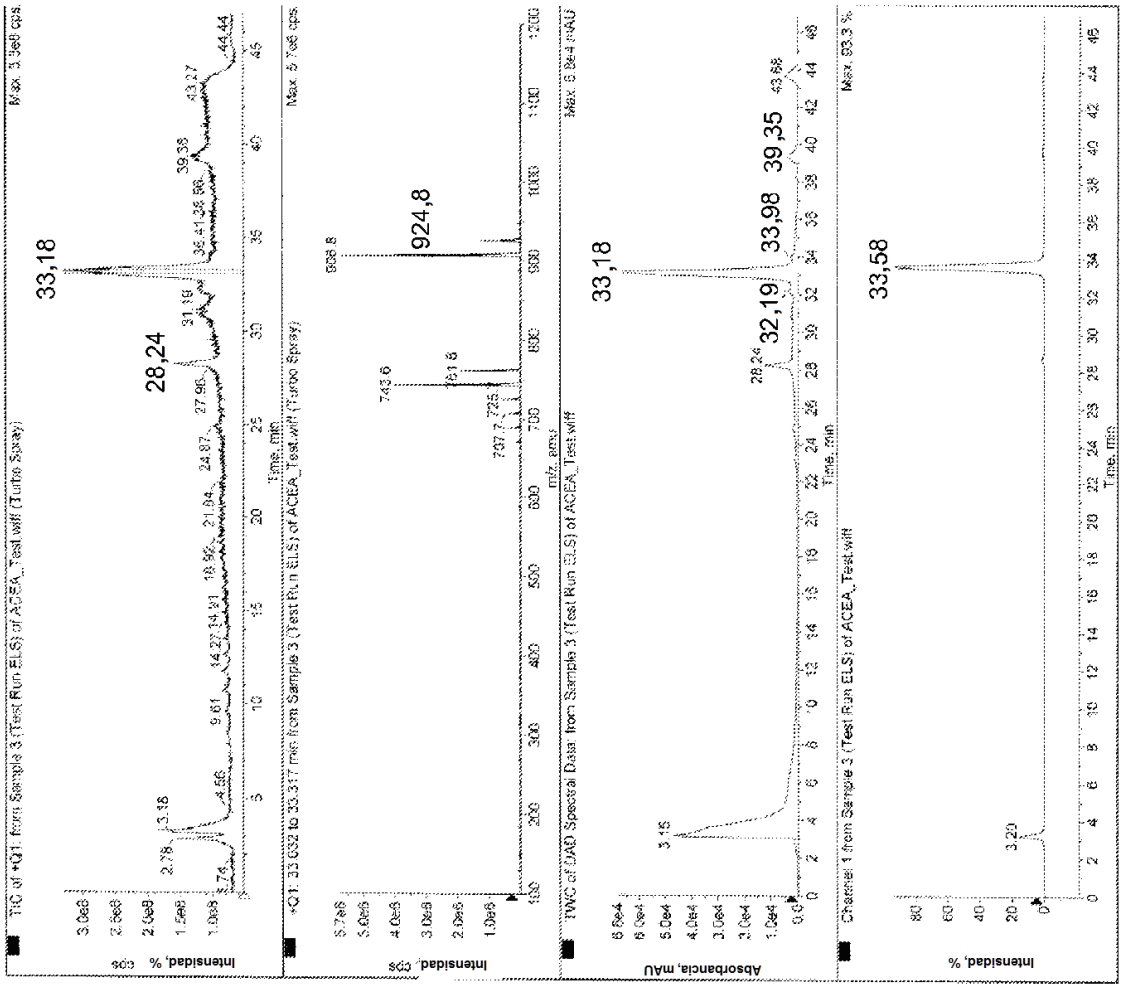


Figura 2

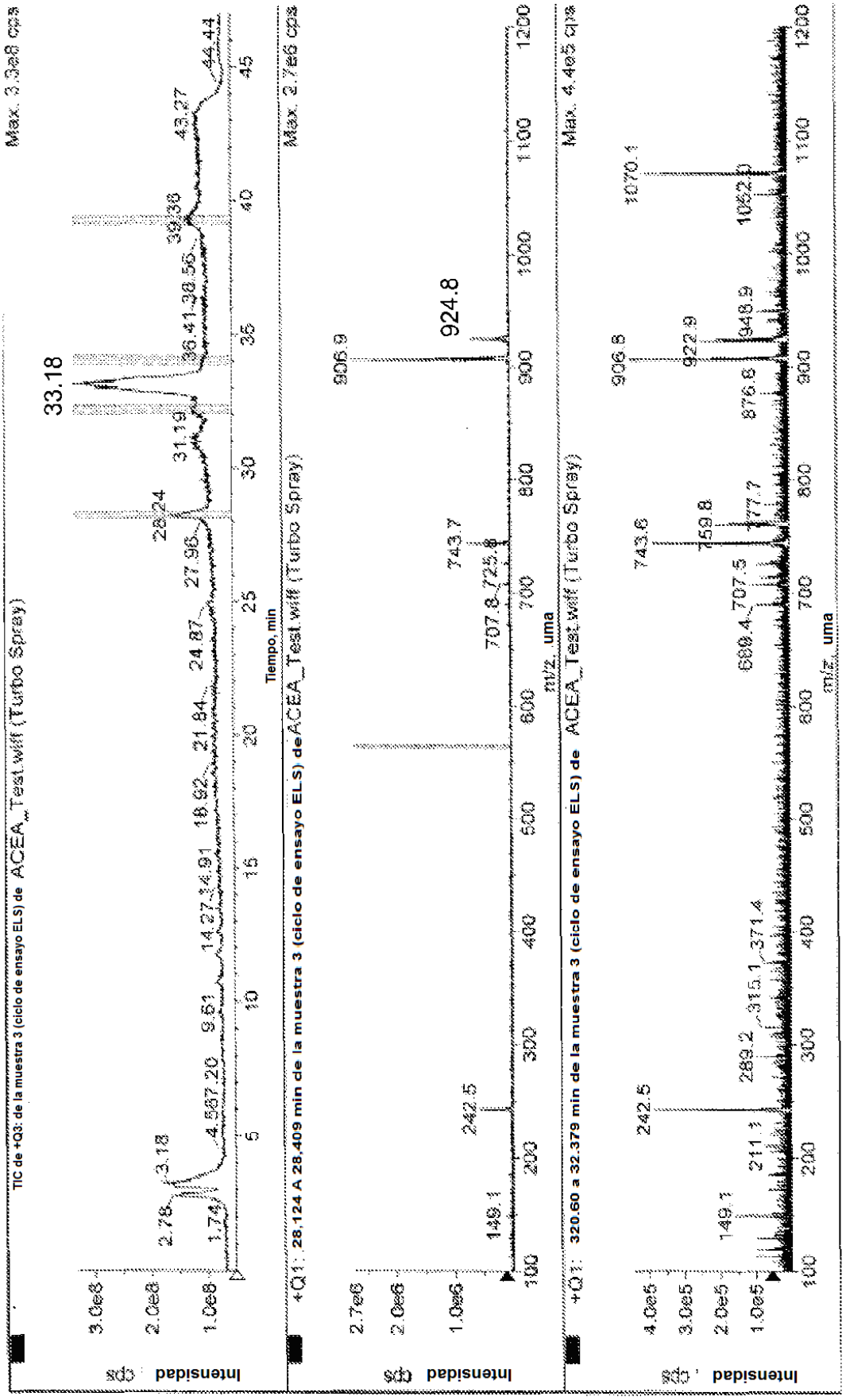

TIC de +Q3: de la muestra 3 (ciclo de ensayo ELS) de ACEA_Test.wiff (Turbo Spray)
Max. 3.3e8 cps
Intensidad, cps
Tiempo, min
33.18
+Q1: 28.124 A 28.409 min de la muestra 3 (ciclo de ensayo ELS) de ACEA_Test.wiff (Turbo Spray)
Max. 2.7e6 cps
924.8
m/z, uma
+Q1: 320.60 a 32.379 min de la muestra 3 (ciclo de ensayo ELS) de ACEA_Test.wiff (Turbo Spray)
Max. 4.4e5 cps

Figura 2 (cont.)

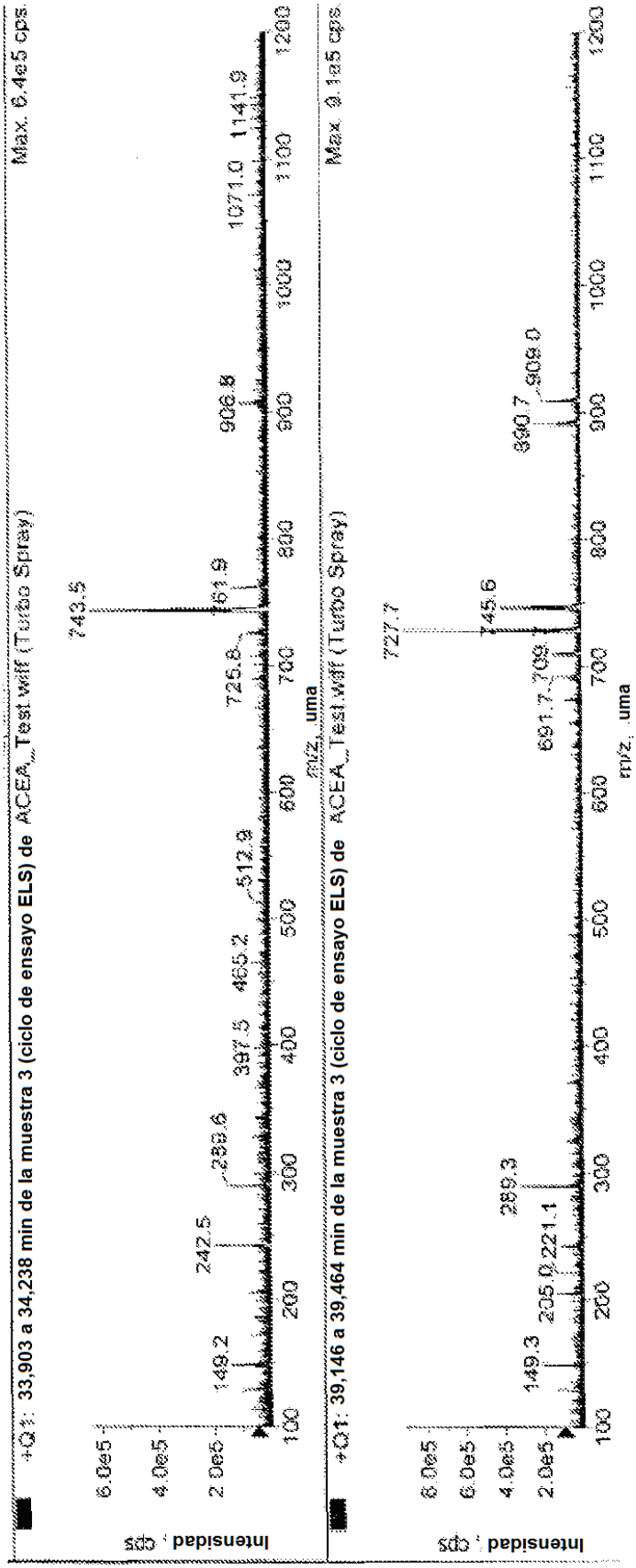


Figura 3

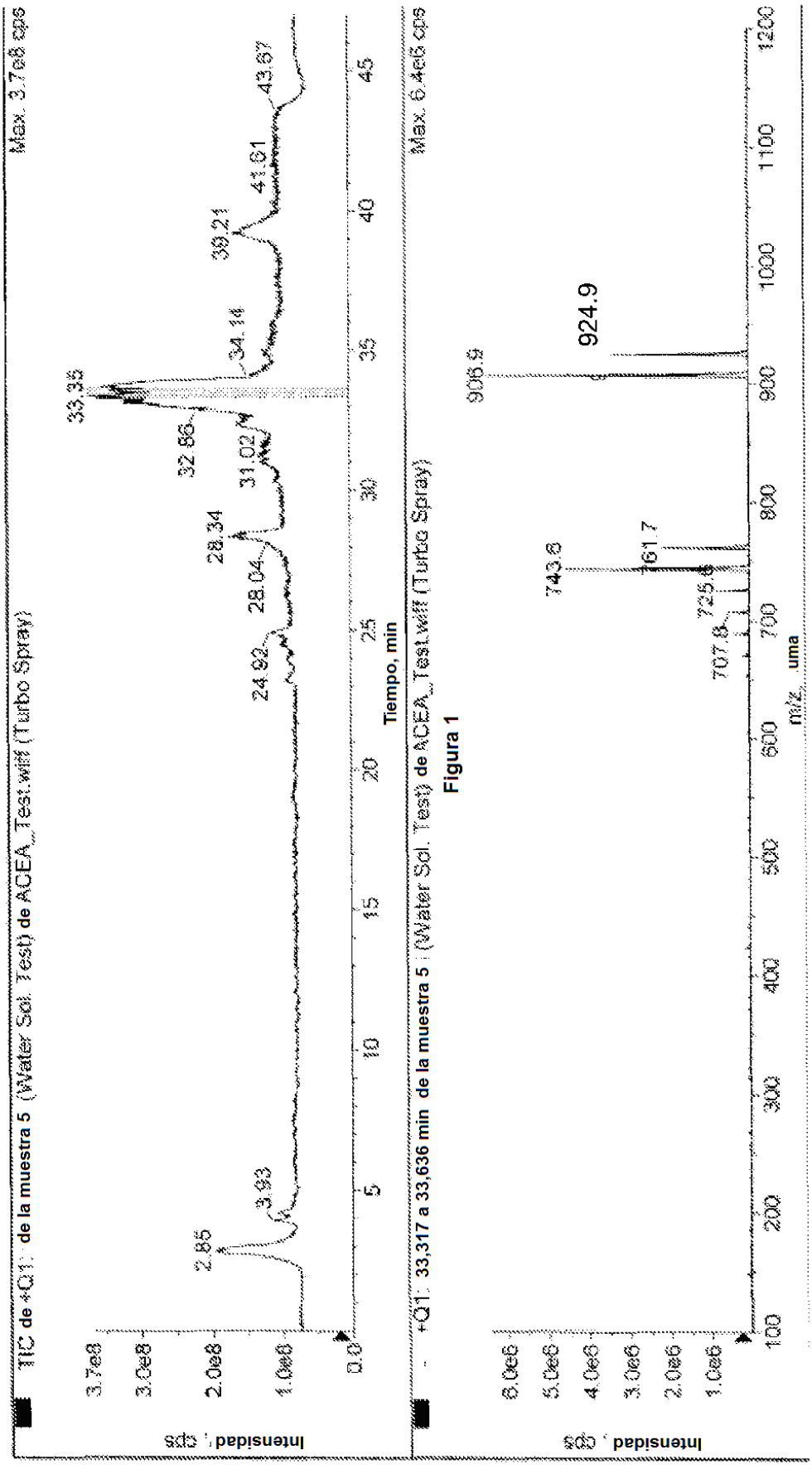


Figura 1

Figura 3 (cont.)

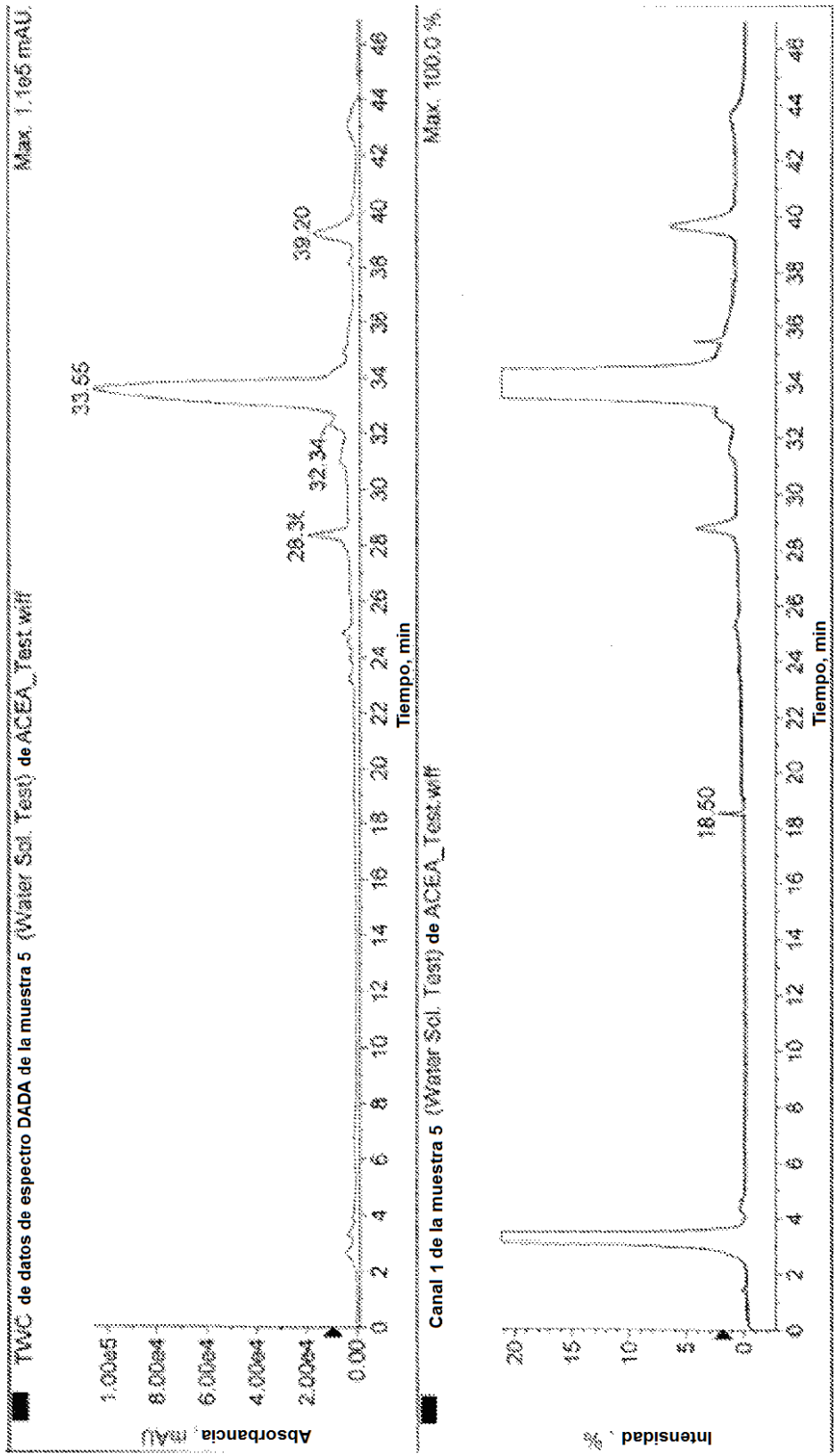


Figura 4

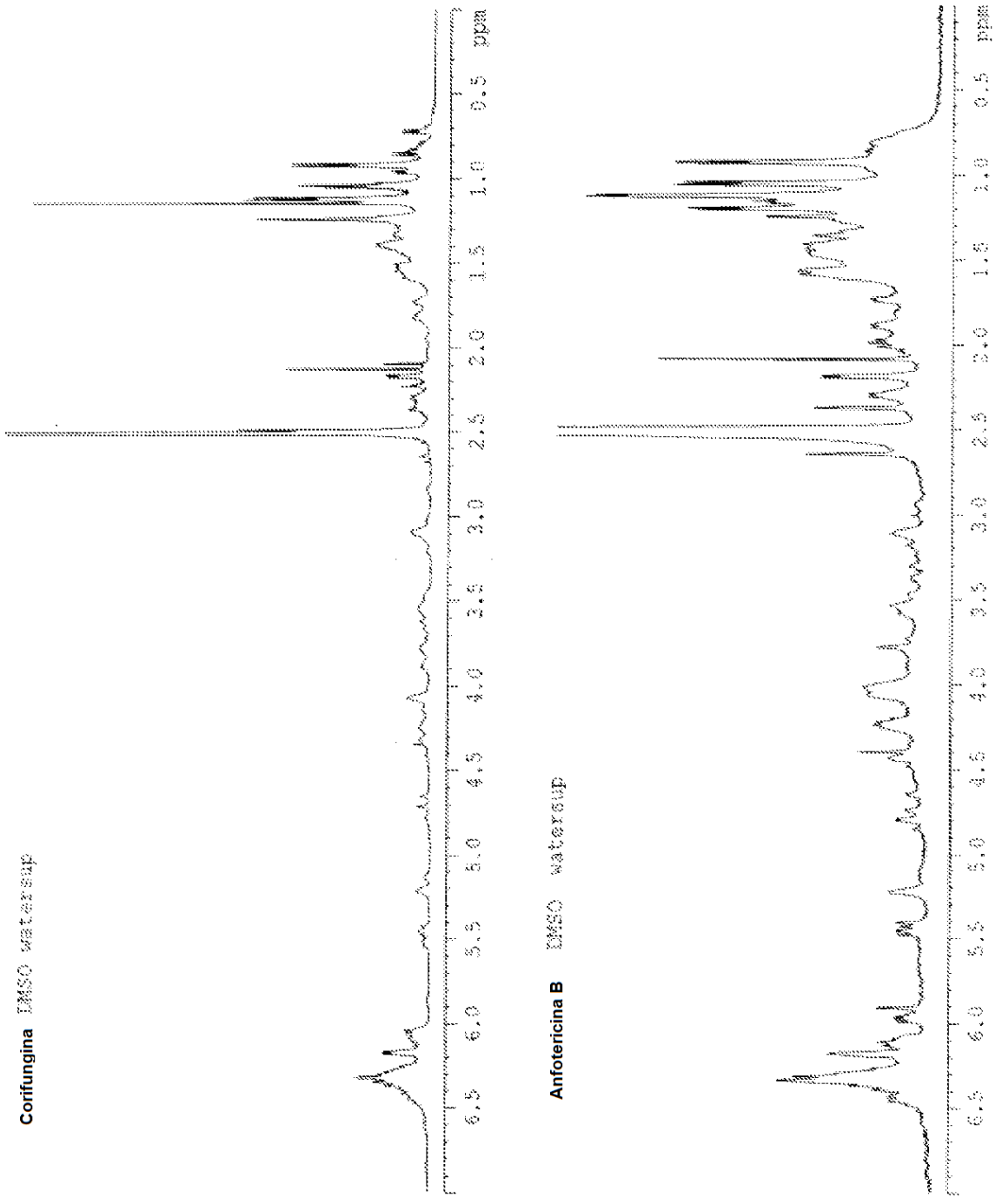

Corifungina DMSO waterexp
6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
Anfotericina B DMSO waterexp
6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm

Figura 5

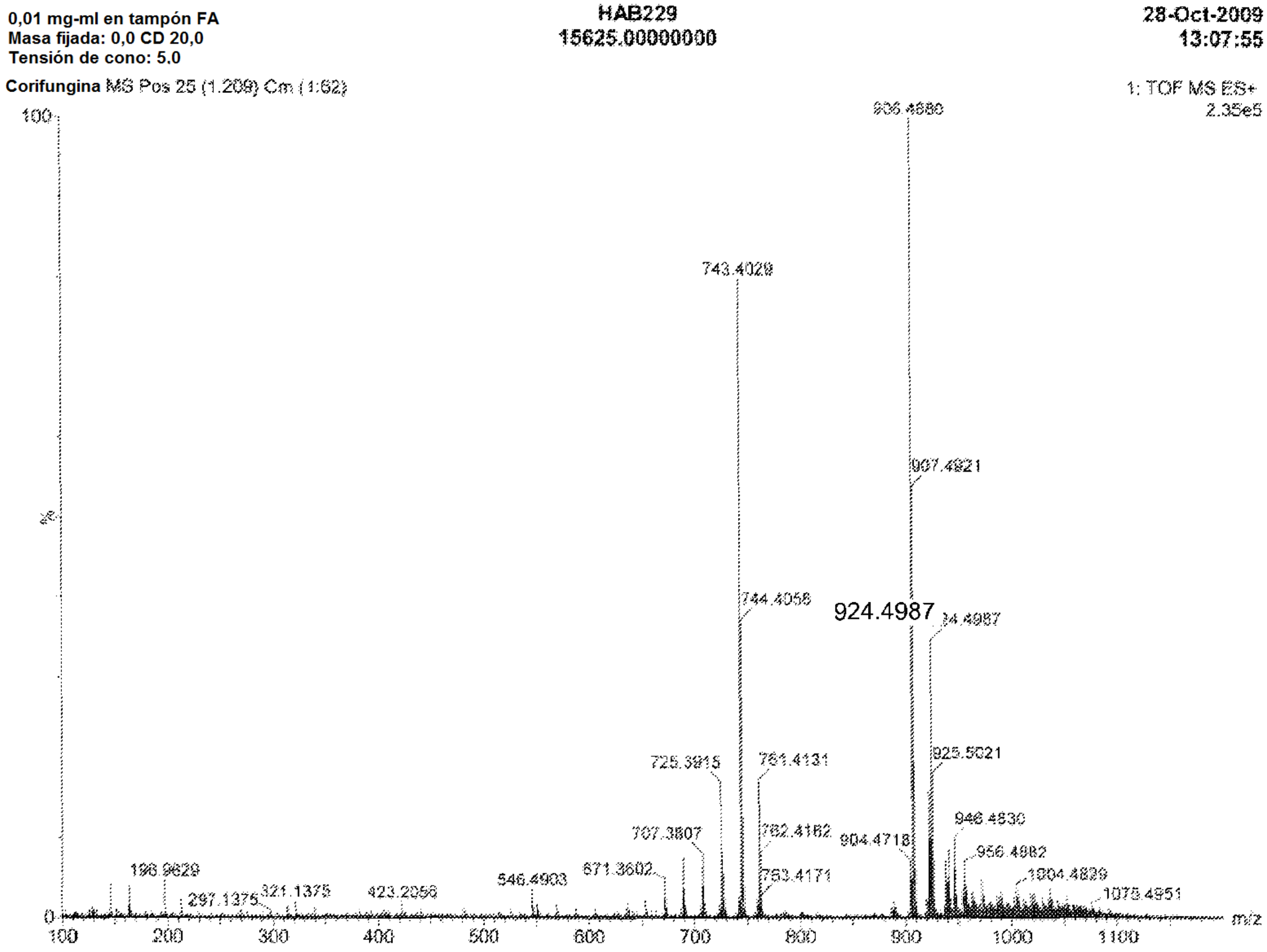

0,01 mg-ml en tampón FA
Masa fijada: 0,0 CD 20,0
Tensión de cono: 5,0
Corifungina MS Pos 25 (1.209) Cm (1:62)
HAB229
15625.00000000
28-Oct-2009
13:07:55
1: TOF MS ES+
2.35e5
100
%
0
906.4880
743.4029
907.4921
744.4056
924.4987
725.3915
761.4131
925.5021
707.3807
762.4162
904.4718
946.4830
956.4982
196.9629
297.1375
321.1375
423.2056
546.4903
671.3602
763.4171
1004.4829
1075.4951
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
m/z

Figura 6

Análisis de masas sencillo

Tolerancia= 5,0 PPM/DBE:min= -1,5, máx= 50,0

Filtros seleccionados: Ninguno

Masa monoisotópica, iones even electron

114 (fórmula(s) evealuadas con 2 resultados dentro de los límites (hasta 50 resultados más próximos para cada masa)

Elementos usados:

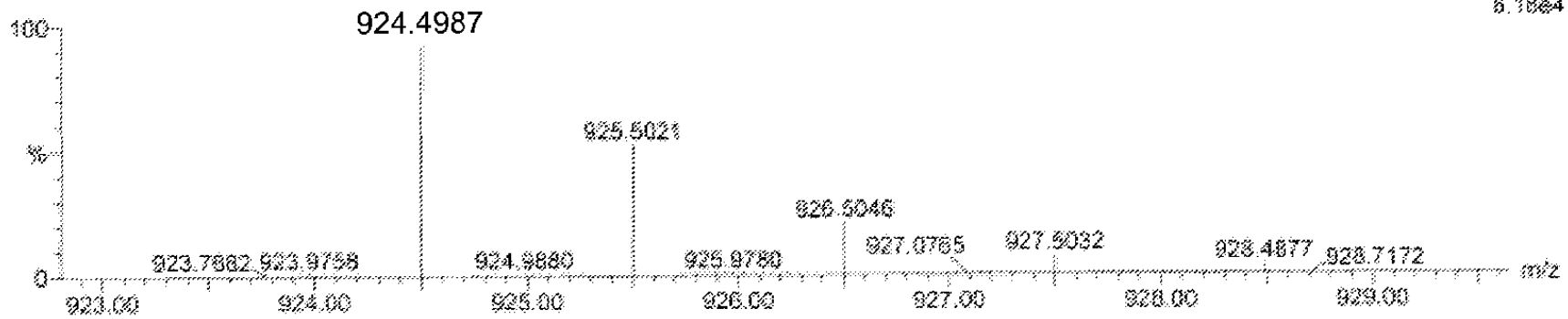
C: 40-60 H: 60-90 N: 0-2 O: 10-30

0,01 mg-ml en tampón FA
Masa fijada: 0,0 CE 20,0
Tensión de cono: 5.0
Corifungina MS Pos 25 (1.209) Cm (1:62)

HAB229
15825.00000000

28-Oct-2009
13:07:55

1: TOF MS ES+
6.18e4



Mínimo:				-1.5		
Máximo:		5.0	5.0	50.0		
Masa	Masa calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Fórmula
924.4987	924.5015	-2.8	-3.0	2.5	563.2	C40 H78 N O22
	924.4957	3.0	3.2	11.5	156.5	C47 H74 N O17

Figura 7

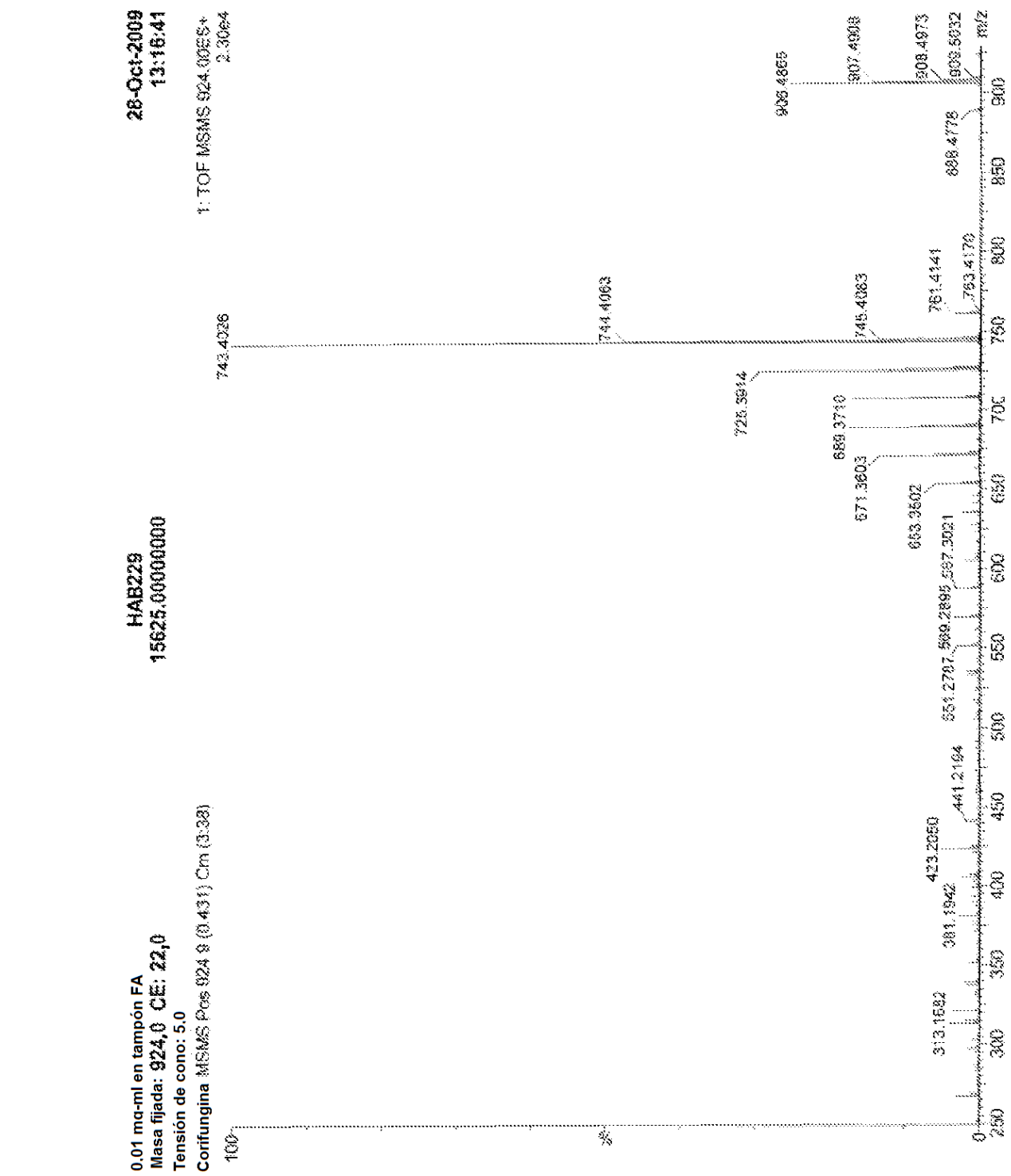

0.01 mg-ml en tampón FA
Masa fijada: 924,0 CE: 22,0
Tensión de cono: 5.0
Corifungina MSMS Pos 924.9 (0.431) Cm (3:38)
HAB229
15625.00000000
28-Oct-2009
13:16:41
1: TOF MSMS 924.00ES+
2.30e4
100
%
0
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
800
850
900
m/z
313.1682
381.1942
423.2650
441.2164
551.2707
589.2895
587.3021
653.3502
671.3603
699.3710
728.3914
742.4036
744.4063
745.4083
761.4141
763.4178
808.4778
905.4865
907.4908
908.4973
909.5032

Figura 8

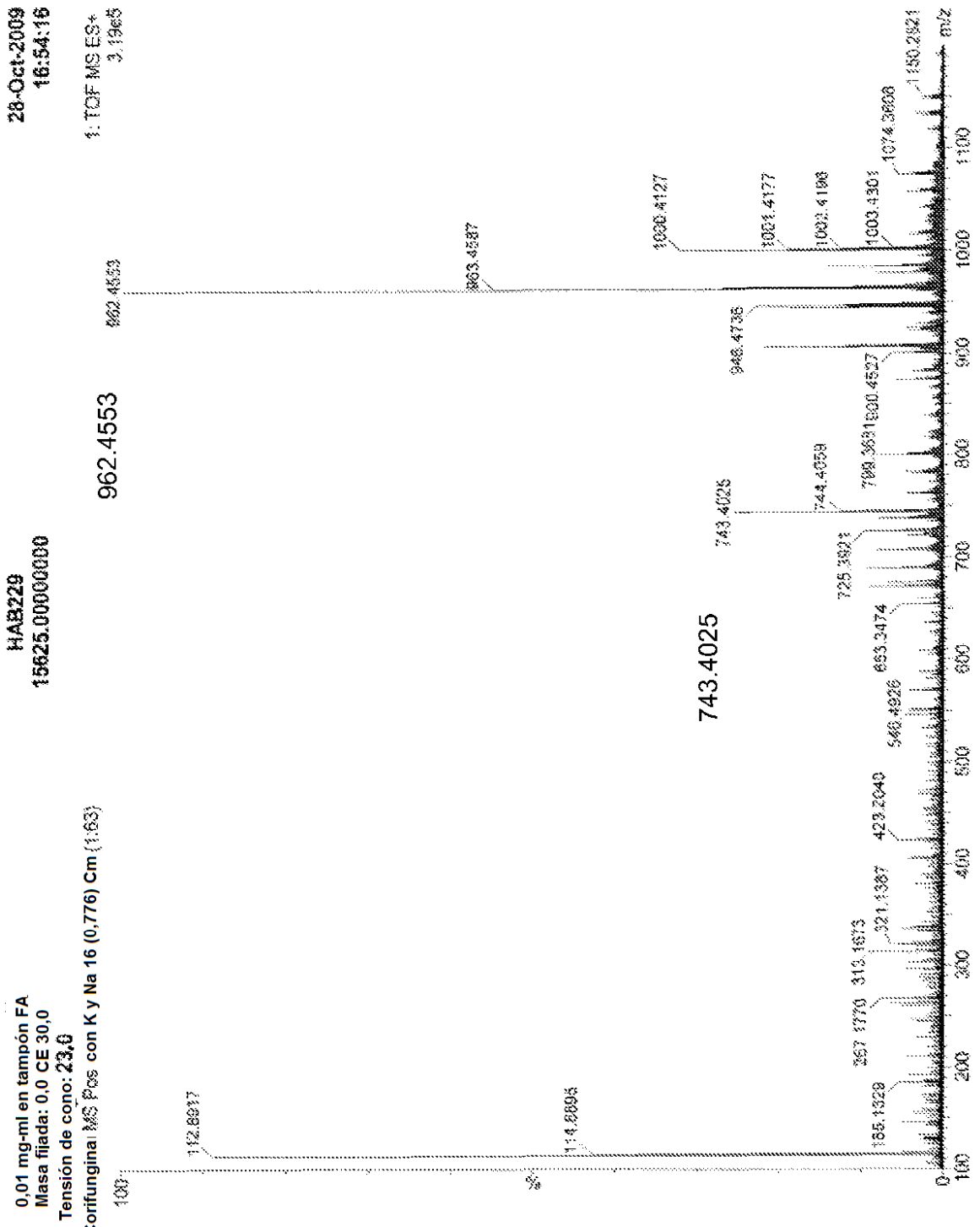
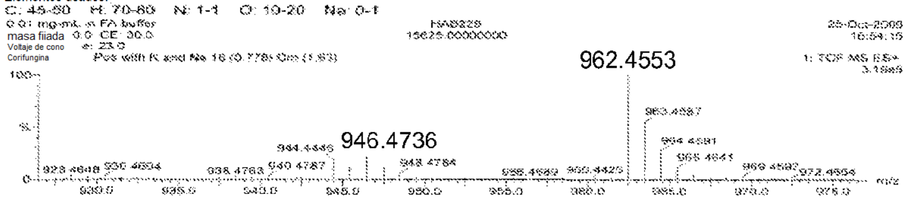

0,01 mg-ml en tampón FA
Masa fijada: 0,0 CE 30,0
Tensión de cono: 23,0
Corifungina MS Pos con K y Na 16 (0,776) Cm (1:63)
HAB229
15625.00000000
28-Oct-2009
16:54:16
1: TOF MS ES+
3.19e5
962.4553
743.4025
100
%
0
162.8917
114.8895
185.1328
267.1770
313.1873
321.1387
423.2640
540.4926
653.3474
725.3923
743.4025
744.4659
789.3631
800.4527
948.4736
962.4553
963.4587
1026.4127
1051.4177
1052.4198
1063.4301
1074.3808
1180.2821
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100

Figura 9

(a) Aducto de Na:

Análisis de masas sencillo

Tolerancia= 5,0 PPM/DBE: min= 1,5 máx= 50,0
Filtros seleccionados: ninguno
Masa monoisotópica, iones even electron
7 (fórmula(s) evealuadas con 1 resultados dentro de los límites (hasta 50 resultados más próximos para cada masa)
Elementos usados:
C: 45-50 H: 70-80 N: 1-1 O: 10-20 Na: 0-1



Minimum:				-1.5		
Maximum:		5.0	5.0	50.0		
Masa	Masa calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Fórmula
946.4736	946.4776	-4.0	-4.2	11.5	415.9	C47 H73 N O17 Na

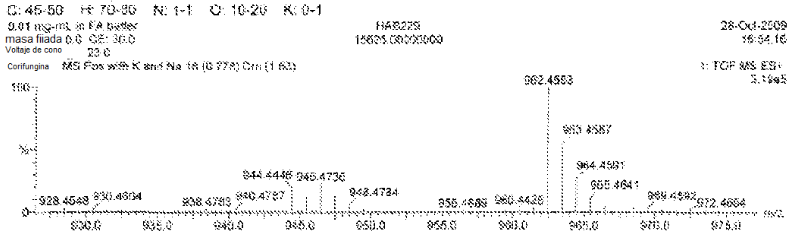
(b) **Aducto de K:**

Análisis de masas sencillo

Tolerancia= 5,0 PPM/DBE: min= 1,5 máx= 50,0 ax = 50,0
Filtros seleccionados: ninguno

ra cada masa)

Masa monoisotópica, iones even electron
7 (fórmula(s) evealuadas con 1 resultados dentro de los límites (hasta 50 resultados más próximos para cada masa)
Elementos usados:
C: 45-50 H: 70-80 N: 1-1 O: 10-20 K: 0-1



Minimum:				-1.5		
Maximum:		5.0	5.0	50.0		
Masa	Masa calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Fórmula
962.4553	962.4516	3.7	3.8	11.5	178.0	C47 H73 N O17 K

Figura 10

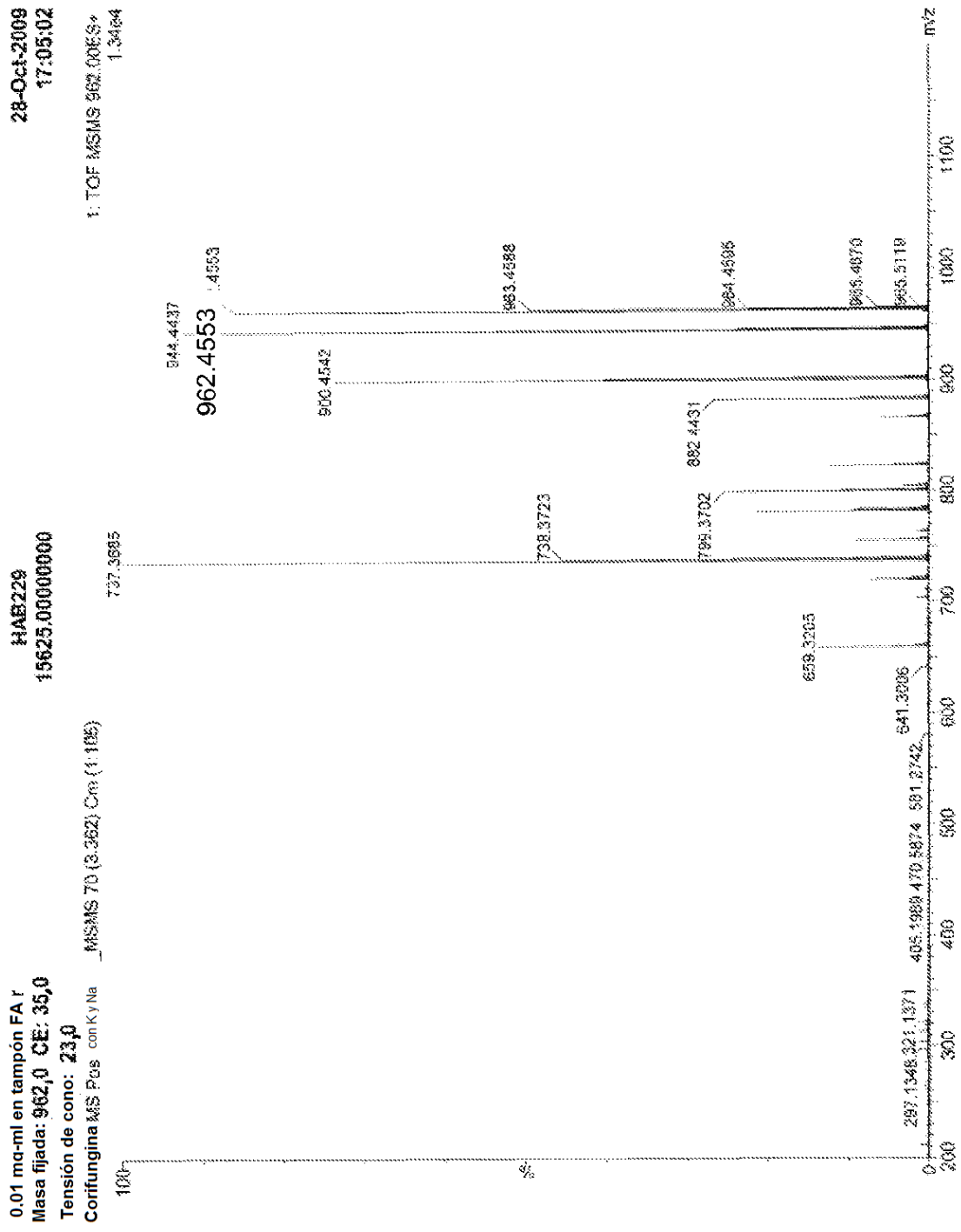

0.01 mg-ml en tampón FA r
Masa fijada: 962,0 CE: 35,0
Tensión de cono: 23,0
Corifungina MS Pos con K y Na
_MSMS 70 (3.362) Cm (1:105)
HAB229
15625.00000000
28-Oct-2009
17:05:02
1: TOF MSMS 962.00ES+
1.34e4
962.4553
944.4437
963.4588
964.4595
965.4870
965.5119
900.4542
882.4431
738.3723
799.3702
737.3685
659.3205
641.3006
581.3742
405.1989
470.5874
297.1348
321.1371
m/z
100
0
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100

Figura 11

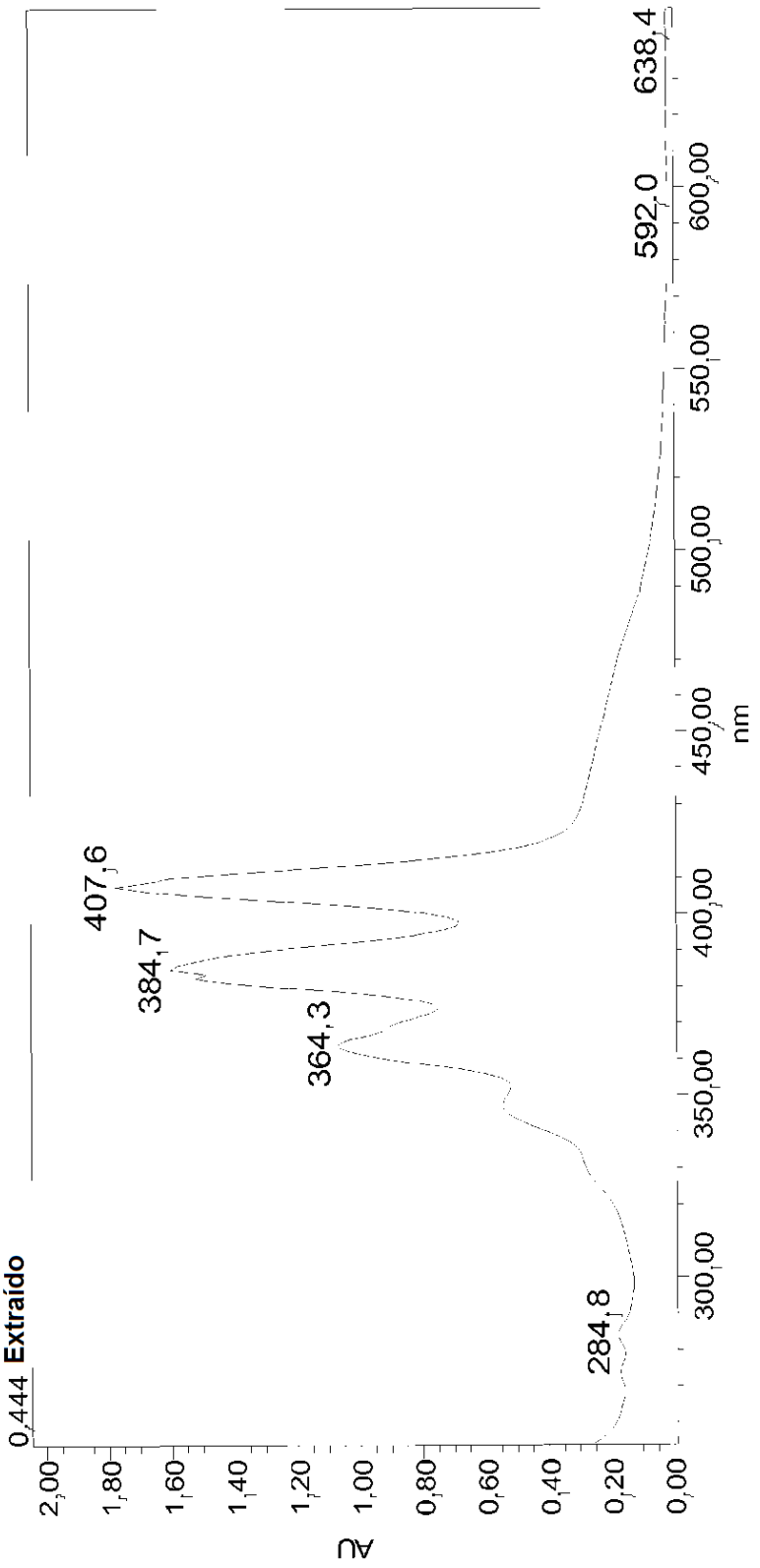
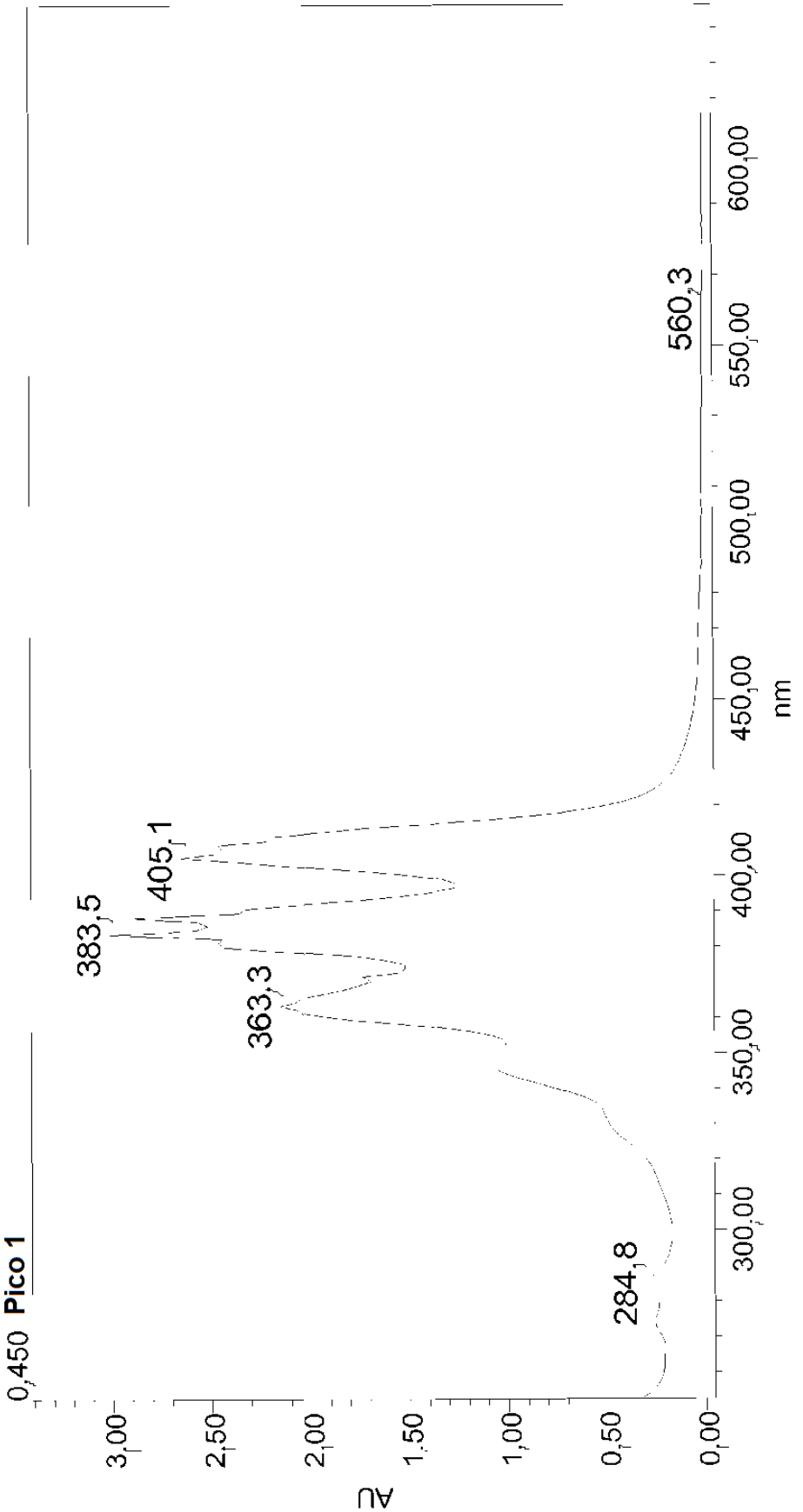

0,444 Extraído
AU
2,00
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
284,8
364,3
384,7
407,6
592,0
638,4
300,00
350,00
400,00
450,00
500,00
550,00
600,00
nm

Figura 12


0,450 Pico 1
284,8
363,3
383,5
405,1
560,3
AU
nm
0,00
0,50
1,00
1,50
2,00
2,50
3,00
300,00
350,00
400,00
450,00
500,00
550,00
600,00

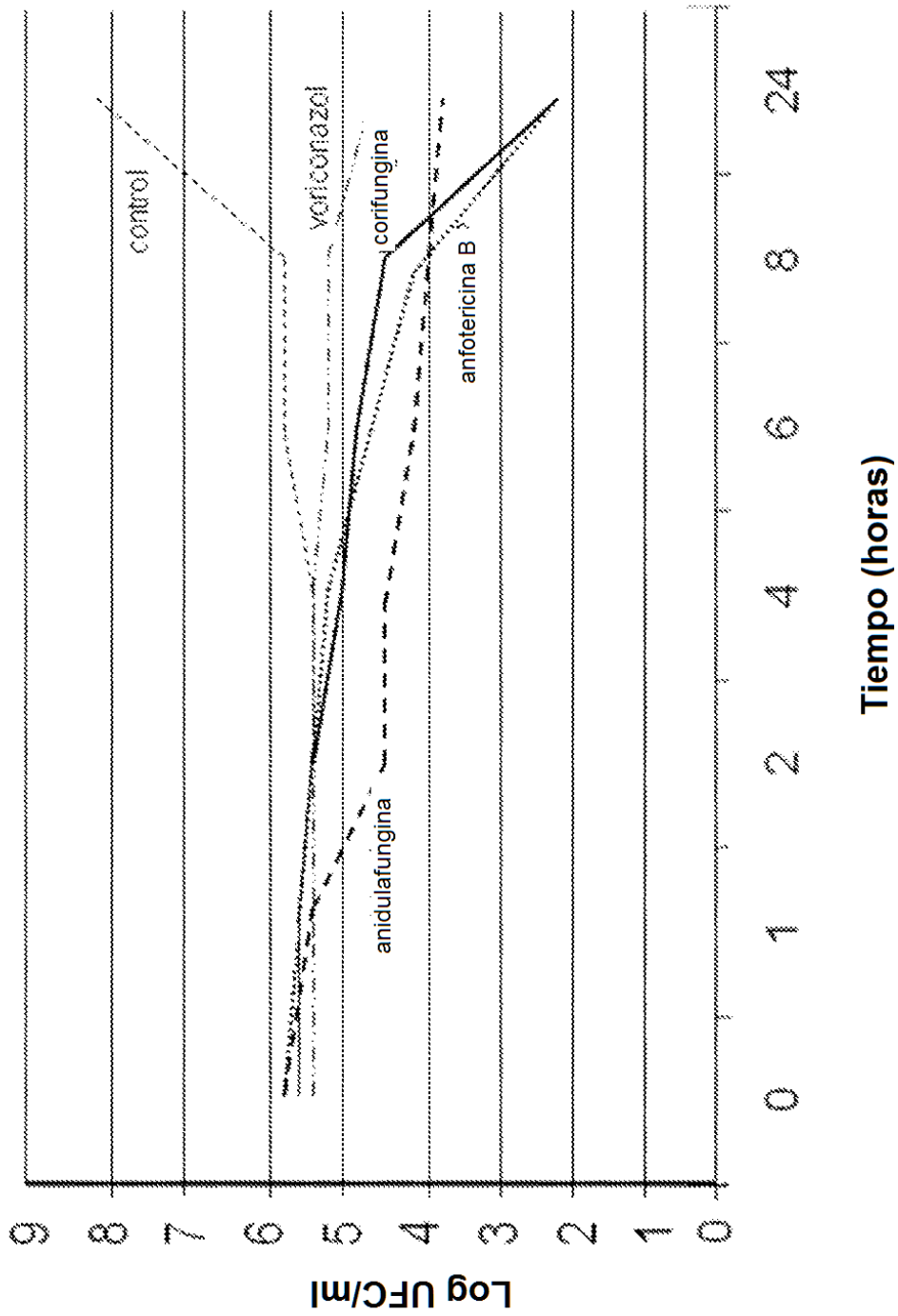
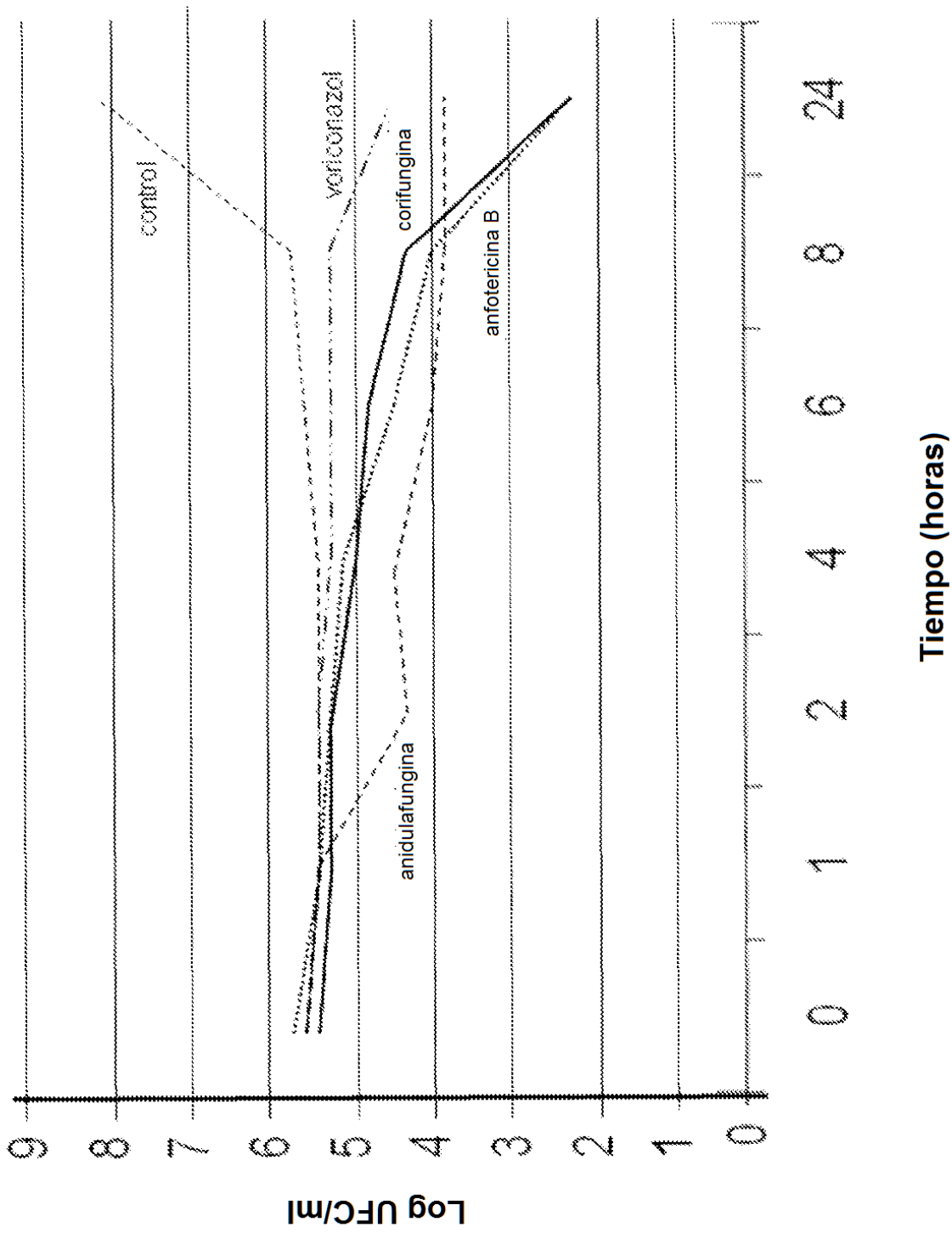

Log UFC/ml
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
1
2
4
6
8
24
Tiempo (horas)
control
voriconazol
corifungina
anfotericina B
anidulafungina

Figura 13

Figura 14


Log UFC/ml
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
1
2
4
6
8
24
Tiempo (horas)
control
voriconazol
corifungina
anfotericina B
anidulafungina

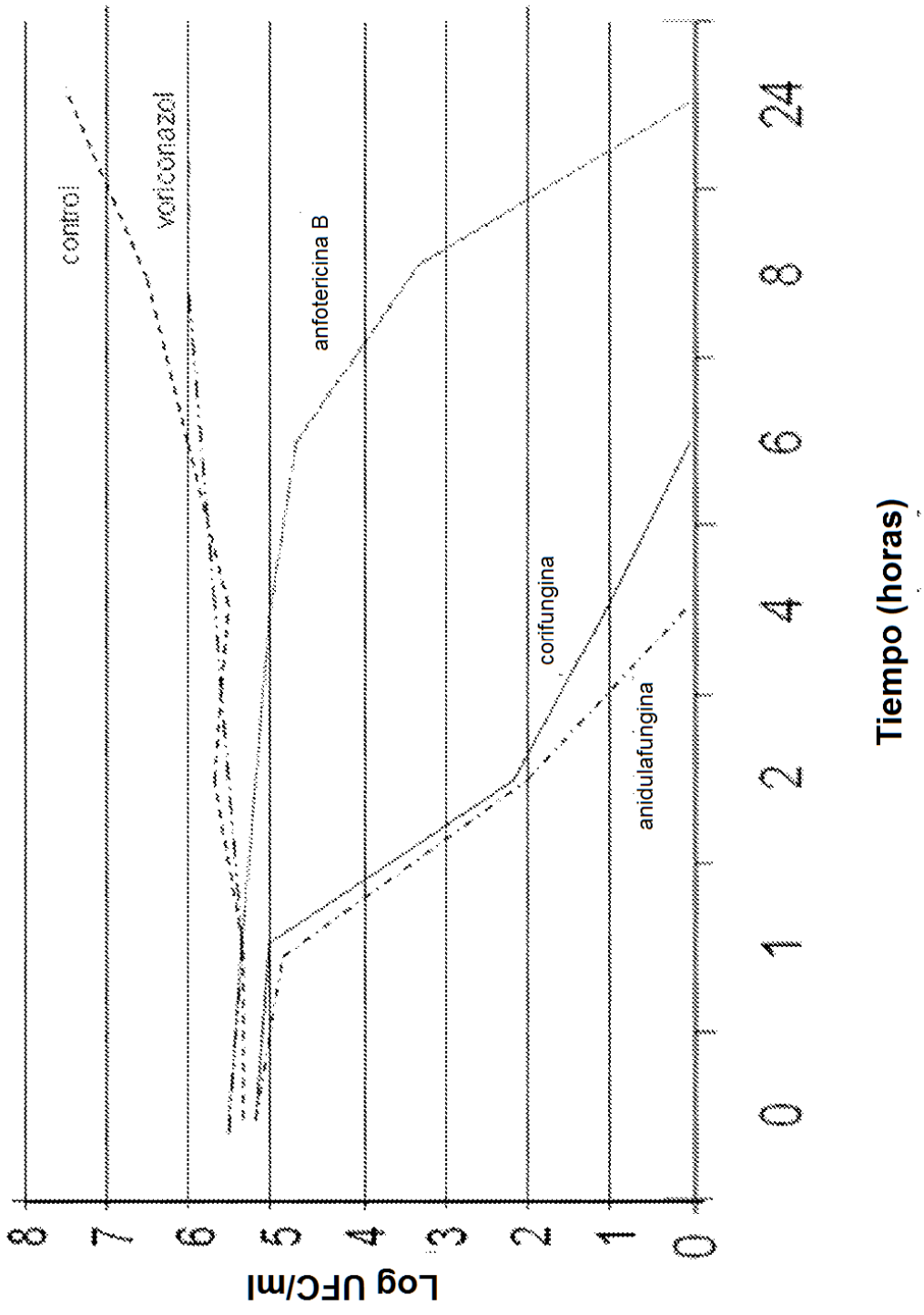

Log UFC/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
1
2
4
6
8
24
Tiempo (horas)
control
voriconazol
anfotericina B
corifungina
anidulafungina

Figura 15

Figura 16

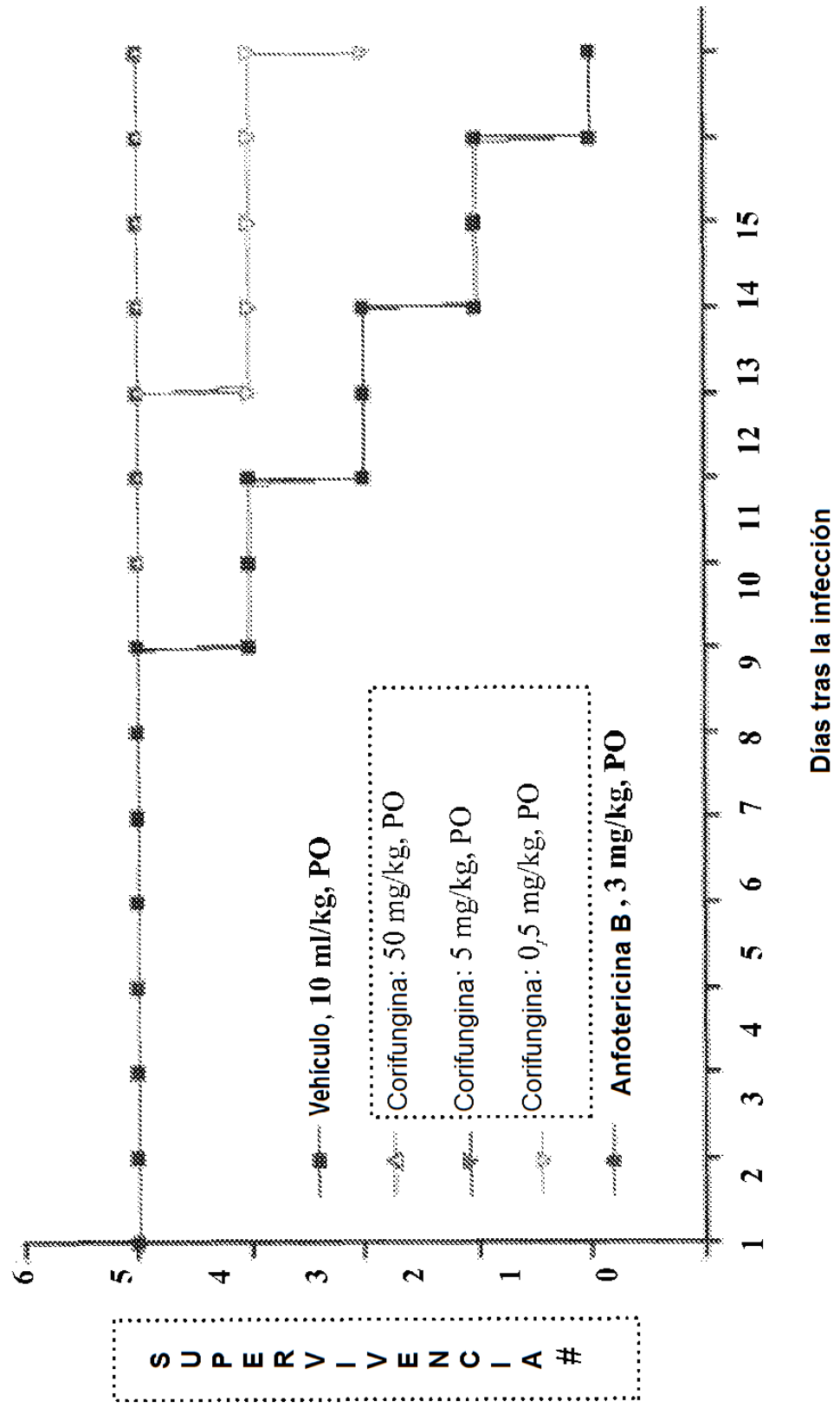

SUPERVIVENCIA #
0
1
2
3
4
5
6
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Días tras la infección
Vehículo, 10 ml/kg, PO
Corifungina: 50 mg/kg, PO
Corifungina: 5 mg/kg, PO
Corifungina: 0,5 mg/kg, PO
Anfotericina B , 3 mg/kg, PO

Figura 17

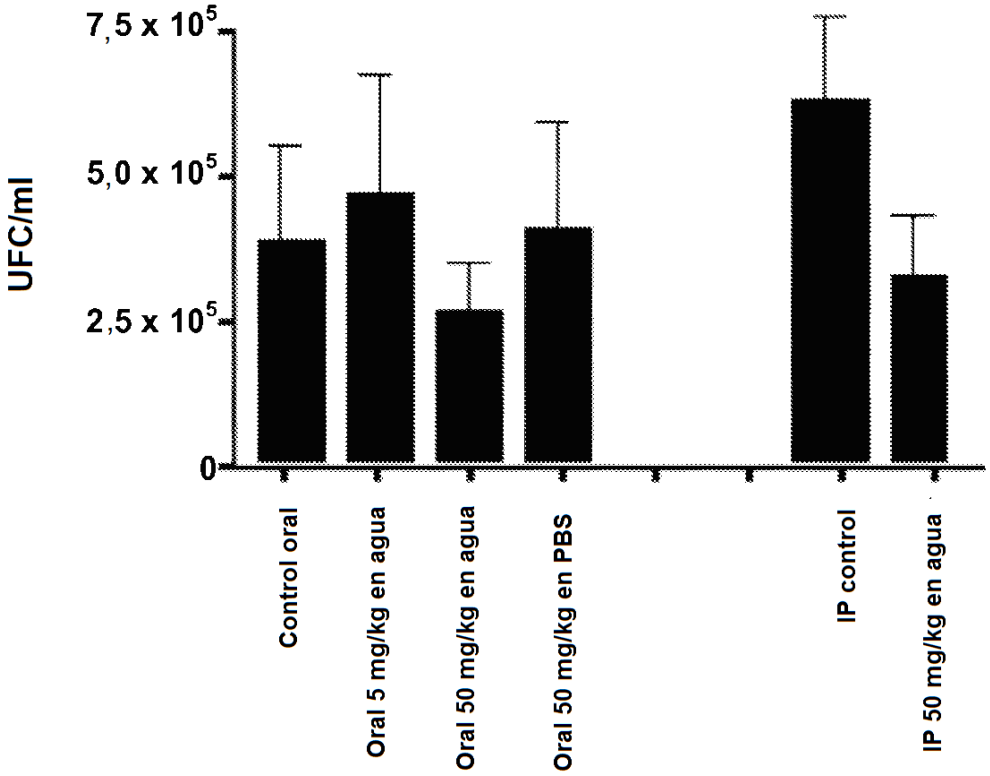

7,5 x 10^5
5,0 x 10^5
2,5 x 10^5
0
UFC/ml
Control oral
Oral 5 mg/kg en agua
Oral 50 mg/kg en agua
Oral 50 mg/kg en PBS
IP control
IP 50 mg/kg en agua

Figura 18

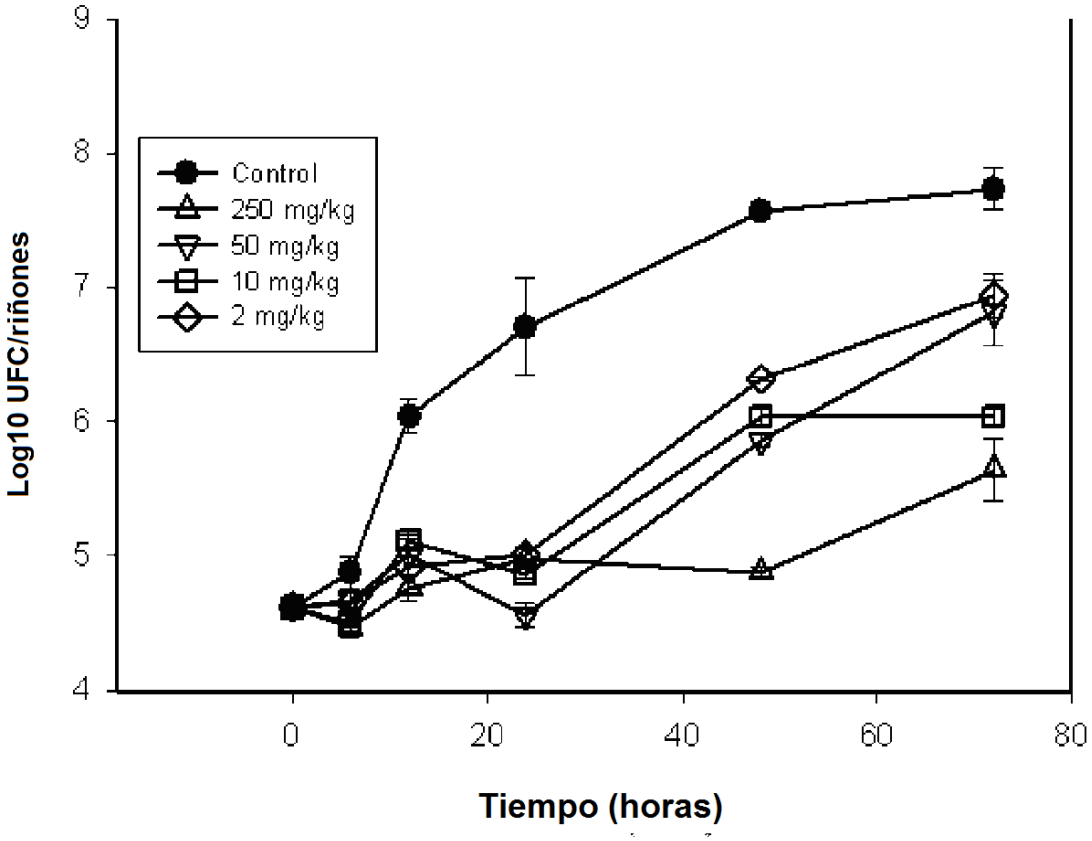

9
8
7
6
5
4
Log10 UFC/riñones
Control
250 mg/kg
50 mg/kg
10 mg/kg
2 mg/kg
0
20
40
60
80
Tiempo (horas)

Figura 19

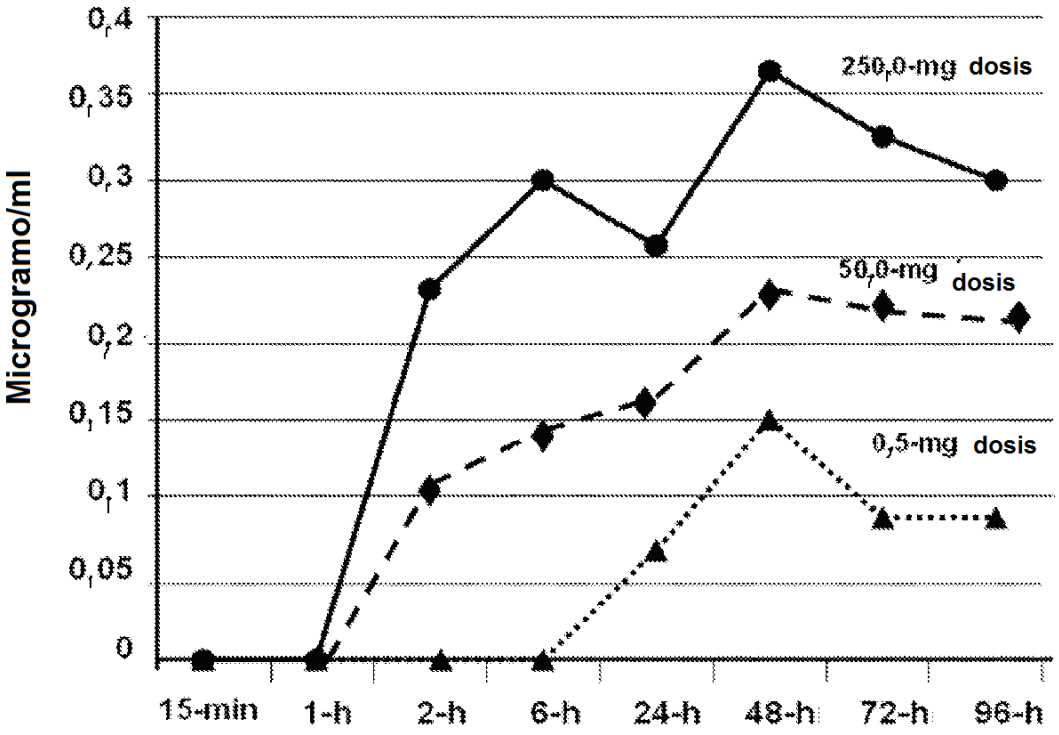

Microgramo/ml
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
250,0-mg dosis
50,0-mg dosis
0,5-mg dosis
15-min
1-h
2-h
6-h
24-h
48-h
72-h
96-h

Figura 20

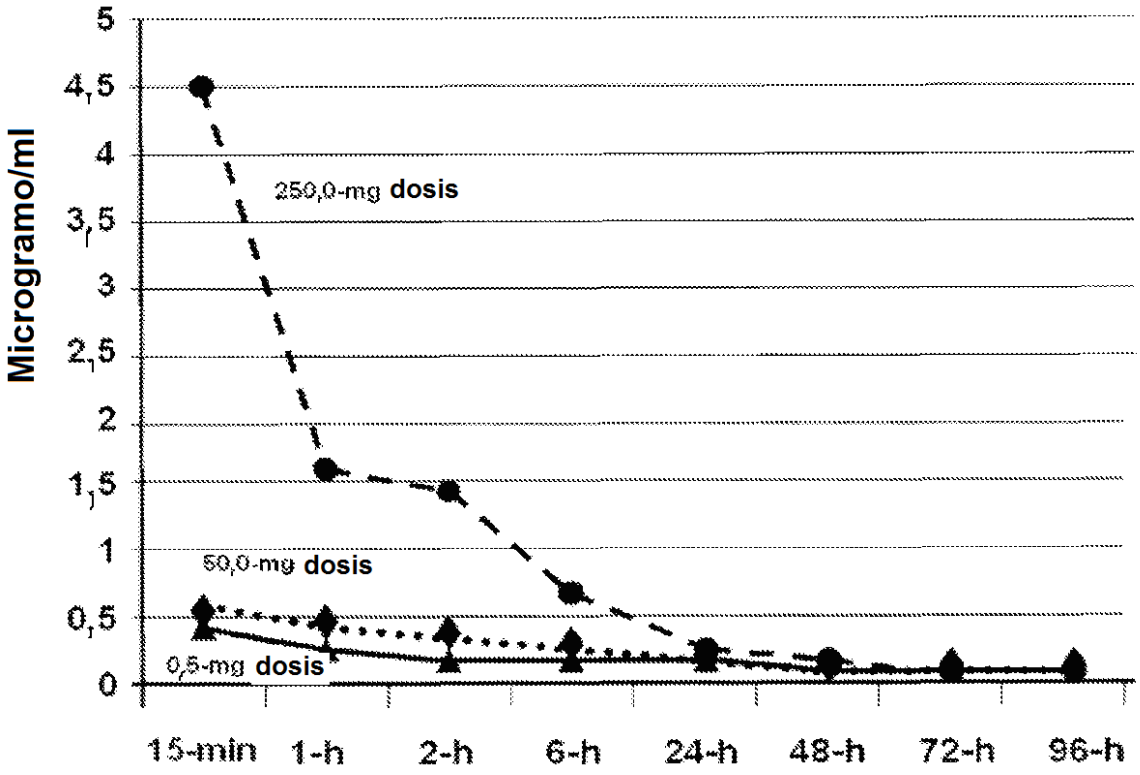

Microgramo/ml
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
250,0-mg dosis
50,0-mg dosis
0,5-mg dosis
15-min
1-h
2-h
6-h
24-h
48-h
72-h
96-h

Figura 21

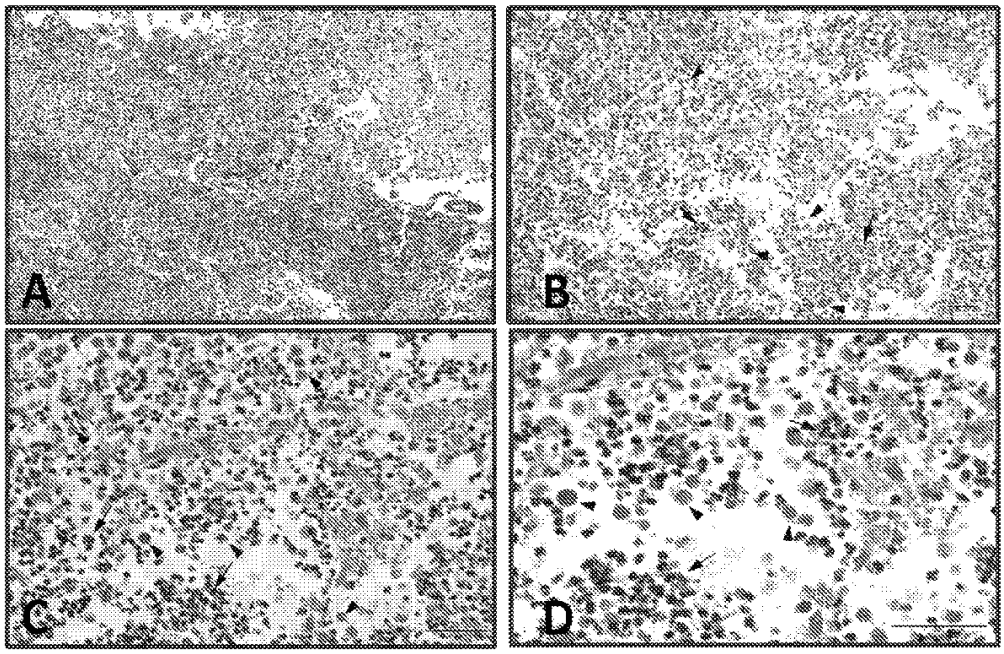


Figura 22

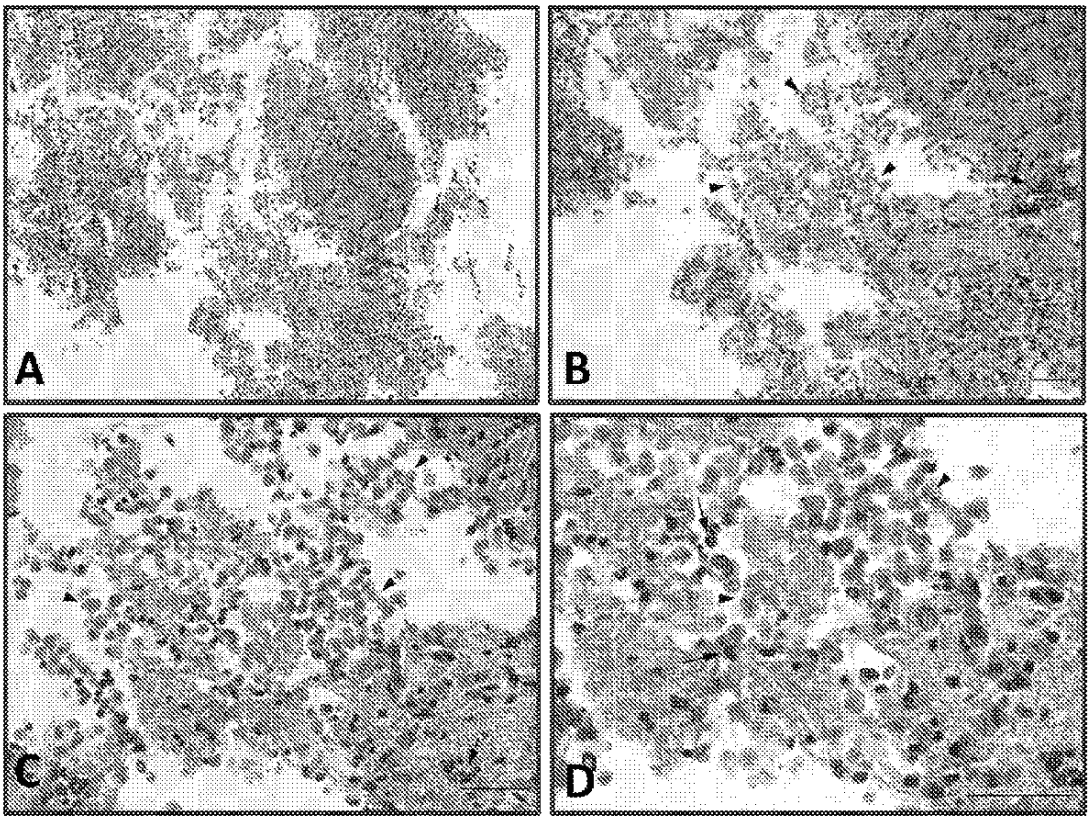


Figura 23

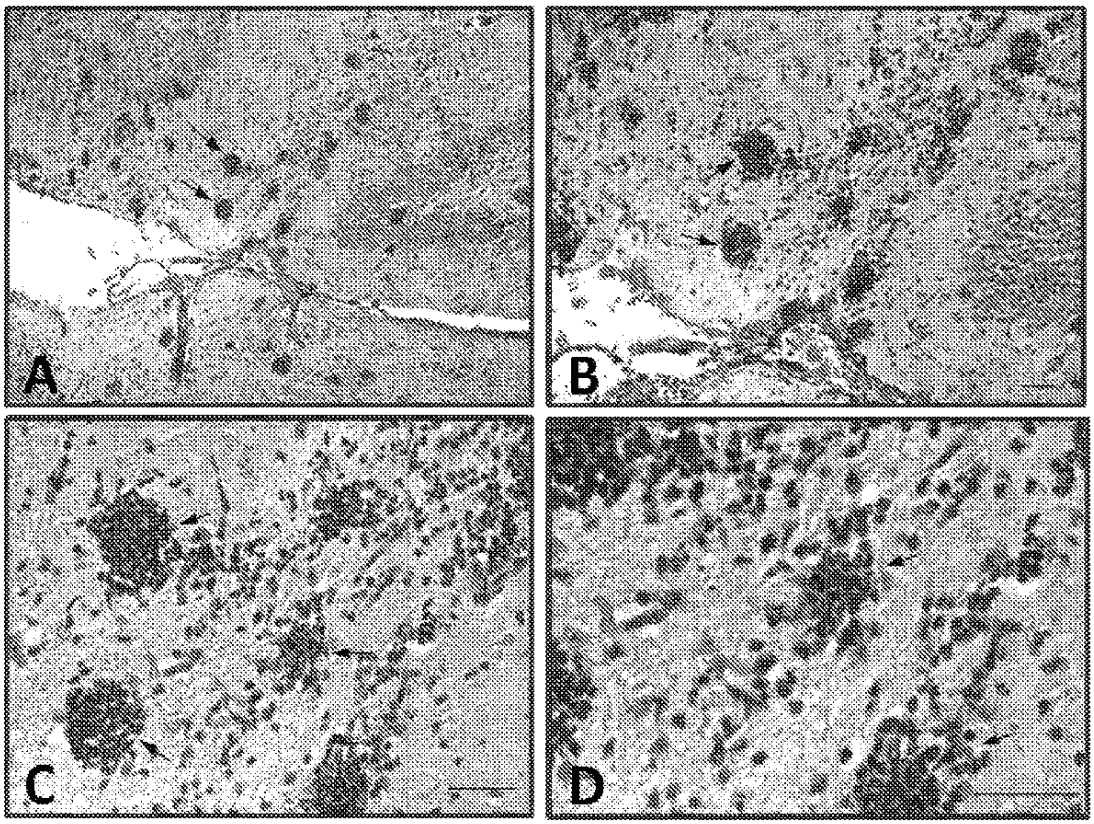


Figura 24

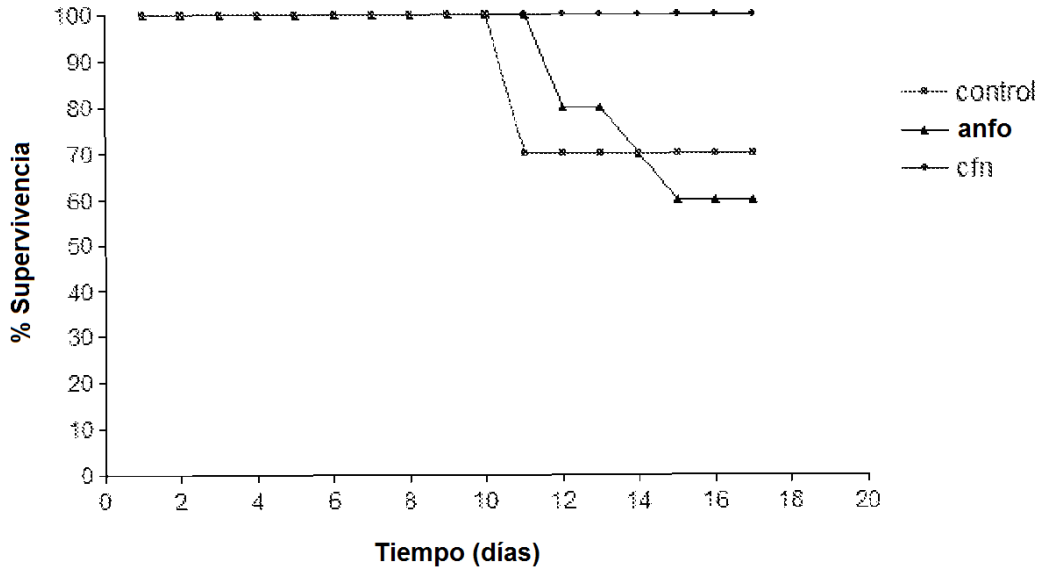
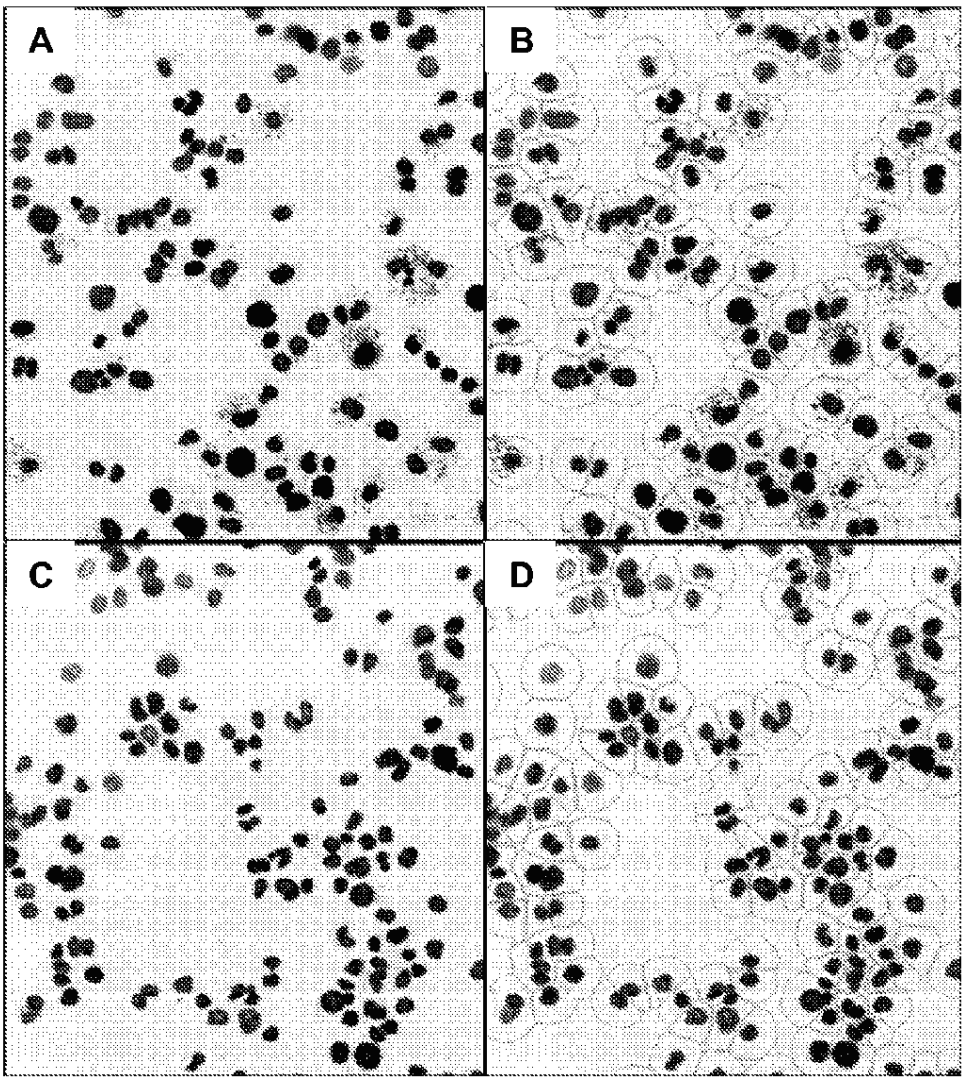

% Supervivencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Tiempo (días)
control
anfo
cfn

Figura 25


A
B
C
D

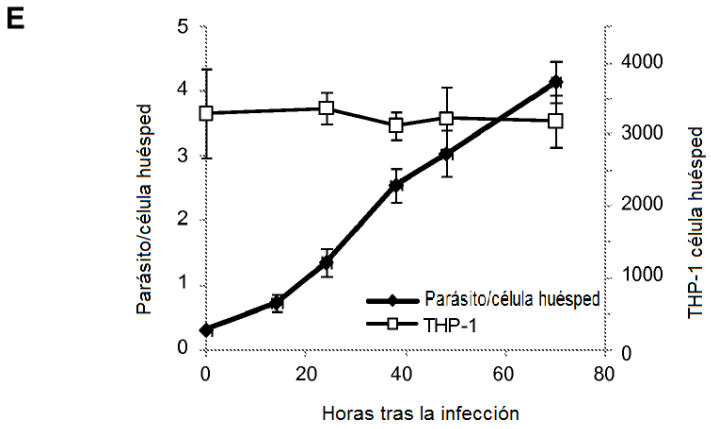

E
Parásito/célula huésped
THP-1 célula huésped
Horas tras la infección
Parásito/célula huésped
THP-1
0
1
2
3
4
5
0
1000
2000
3000
4000
0
20
40
60
80

Figura 26

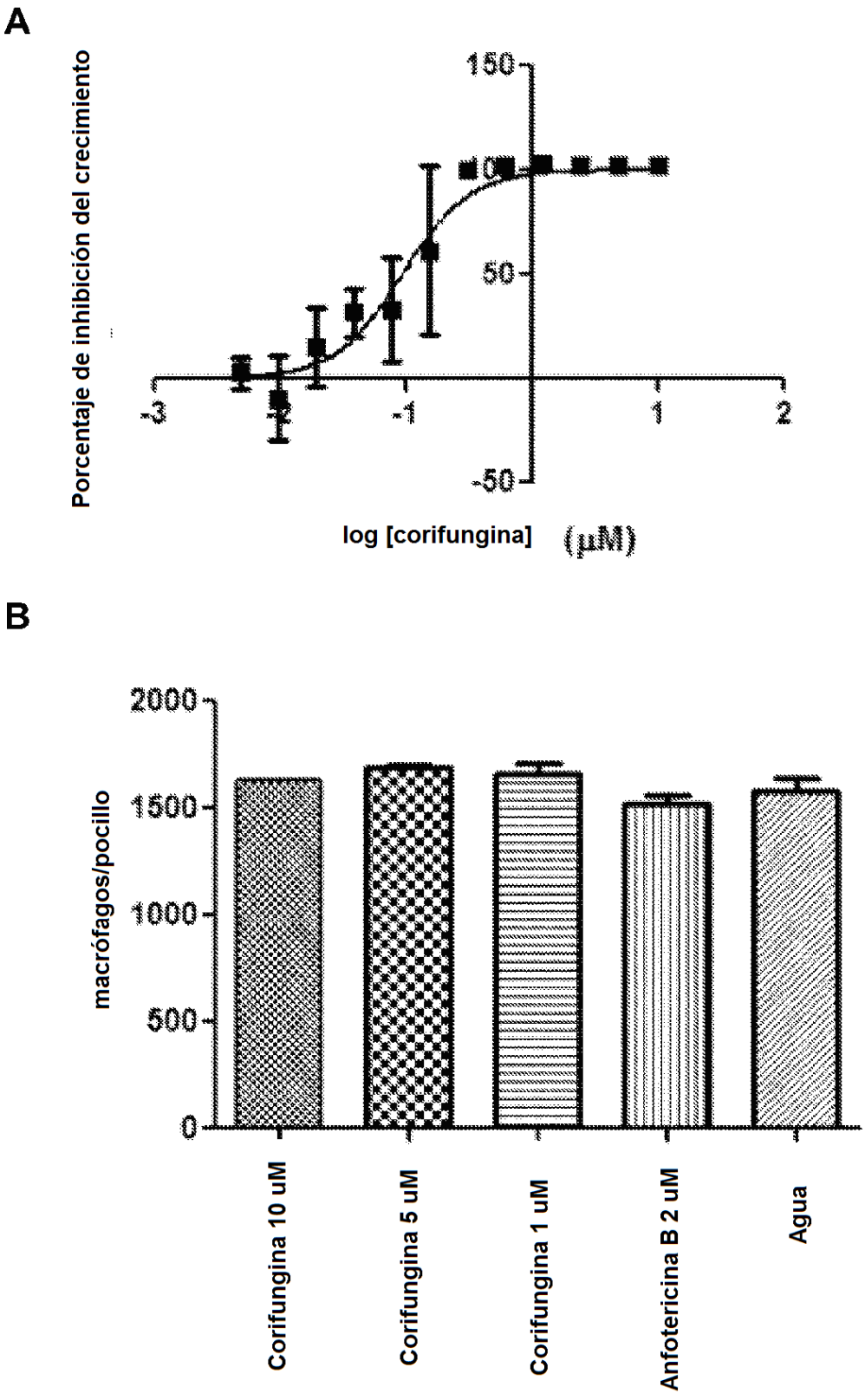

A
Porcentaje de inhibición del crecimiento
150
100
50
-50
-3
-1
1
2
log [corifungina] (µM)
B
macrófagos/pocillo
2000
1500
1000
500
0
Corifungina 10 uM
Corifungina 5 uM
Corifungina 1 uM
Anfotericina B 2 uM
Agua

Figura 27

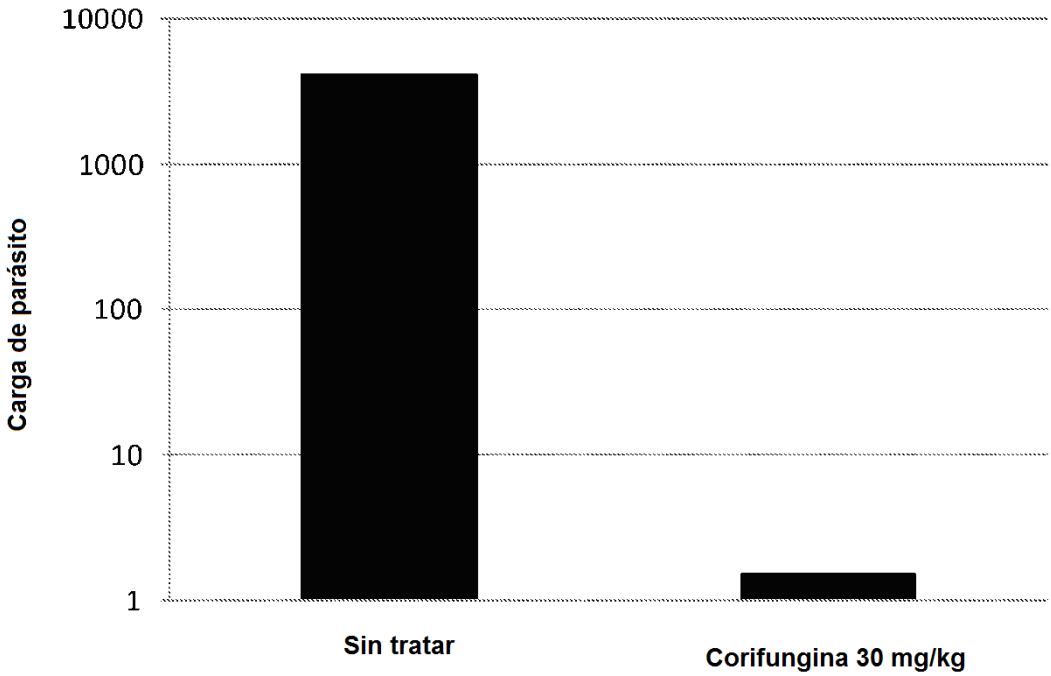
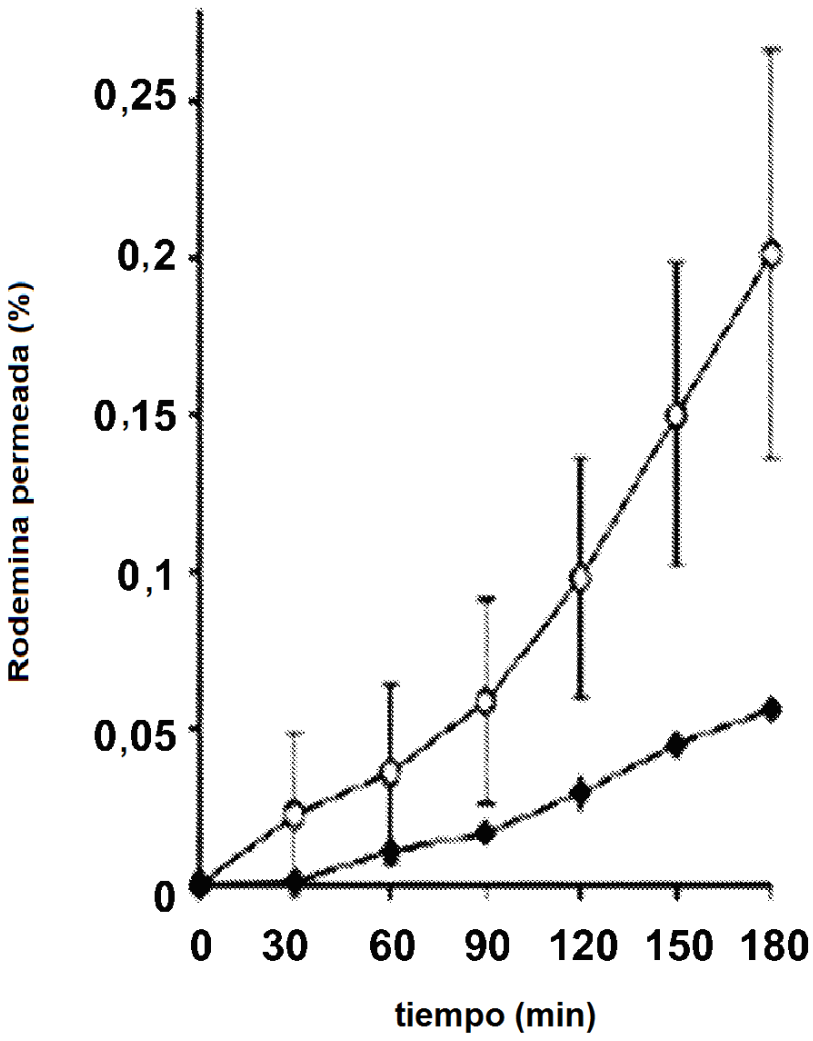

10000
1000
100
10
1
Carga de parásito
Sin tratar
Corifungina 30 mg/kg

Figura 28


Rodemina permeada (%)
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
30
60
90
120
150
180
tiempo (min)