

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 074**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012** **PCT/US2012/027451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012** **WO12119065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012** **E 12751994 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017** **EP 2680873**

54 Título: **Agentes antifúngicos y sus usos**

30 Prioridad:

03.03.2011 US 201161448807 P

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

04.12.2017

73 Titular/es:

CIDARA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
6310 Nancy Ridge Drive Suite 101
San Diego CA 92121, US

72 Inventor/es:

JAMES, KENNETH DUKE, JR.;
LAUDEMAN, CHRISTOPHER PATRICK;
MALKAR, NAVDEEP BALKRISHNA y
RADHAKRISHNAN, BALASINGHAM

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 645 074 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

Agentes antifúngicos y sus usos

Descripción

5 Antecedentes de la Invención

Esta invención se refiere al campo del tratamiento de infecciones fúngicas.

La necesidad de nuevos tratamientos antifúngicos es significativa, y es especialmente crítica en el campo médico. Los pacientes inmunocomprometidos constituyen quizás el mayor reto para la atención médica moderna. Durante las últimas tres décadas ha habido un aumento dramático en la frecuencia de infecciones fúngicas en estos pacientes (Herbrecht, Eur. J. Haematol., 56: 12, 1996, Cox et al., Curr. Opin. Infect. Dis. 6: 422, 1993, Fox, ASM News, 59: 515, 1993). Las micosis profundas se observan cada vez más en pacientes sometidos a trasplantes de órganos y en pacientes que reciben quimioterapia agresiva contra el cáncer (Alexander et al., Drugs, 54: 657, 1997). Los patógenos más comunes asociados con las infecciones fúngicas invasivas son la levadura oportunista, *Candida albicans* y el hongo filamentoso, *Aspergillus fumigatus* (Bow, Br. J. Haematol., 101: 1.1998, Wamock, J. Antimicrob. Chemother., 41 : 95, 1998). Hay unos 200.000 pacientes por año que adquieren infecciones fúngicas nosocomiales (Beck-Sague et al., J. Infect. Dis., 167: 1247, 1993). También se suma al aumento en el número de infecciones fúngicas la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), donde virtualmente todos los pacientes se ven afectados con alguna forma de micosis durante el curso de la enfermedad (Alexander et al., Drugs, 54: 657, 1997, Hood et al., J. Antimicrob. Chemother., 37:71, 1996). Los organismos más comunes encontrados en estos pacientes son *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii* y *C. albicans* (HIV/AIDS Surveillance Report, 1996, 7(2), Edición Fin de Año, Polis, MA et al., SIDA: Biología, Diagnóstico, Tratamiento y Prevención, cuarta edición, 1997). Nuevos patógenos fúngicos oportunistas como *Penicillium marneffeii*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis* se están reportando con regularidad en pacientes inmunocomprometidos en todo el mundo.

El desarrollo de regímenes de tratamiento antimicótico ha sido un desafío continuo. Los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de infecciones fúngicas incluyen anfotericina B, un macrólido polieno que interactúa con esteroides de membrana fúngica, flucitosina, fluoropirimidina que interfiere con la proteína fúngica y la biosíntesis de ADN y una variedad de azoles (por ejemplo, cetoconazol, itraconazol y fluconazol) que inhiben la biosíntesis fúngica de membrana-esterol (Alexander et al., Drugs, 54: 657, 1997). Aunque la anfotericina B tiene una amplia gama de actividad y se considera como el "patrón oro" de la terapia antifúngica, su uso es limitado debido a reacciones relacionadas con la infusión y nefrotoxicidad (Wamock, J. Antimicrob. Chemother., 41:95, 1998). También el documento WO9608507 describe compuestos aza ciclohexapeptídicos que tienen estructuras químicas relacionadas. Dichos compuestos tienen actividad antifúngica. El uso de flucitosina también es limitado debido al desarrollo de microbios resistentes y su estrecho espectro de actividad. El uso generalizado de azoles está causando la aparición de cepas clínicamente resistentes de *Candida* spp. Debido a los problemas asociados con los tratamientos actuales, existe una continua búsqueda de nuevos tratamientos.

Cuando la caspofungina echinocandina fue aprobada para la venta en 2001, representó la primera nueva clase de agentes antifúngicos que se aprobó en más de una década. Desde entonces, otros dos antifúngicos de la equinocandina, la anidulafungina y la micafungina, han sido aprobados en varios mercados. Cada agente en esta clase de compuesto actúa por inhibición de β -1, 3-glucano sintasa, que es una enzima clave en la síntesis de glucano en la pared celular de muchos hongos. Los tres de estos fármacos se hacen semisintéticamente, comenzando con productos naturales obtenidos por fermentación.

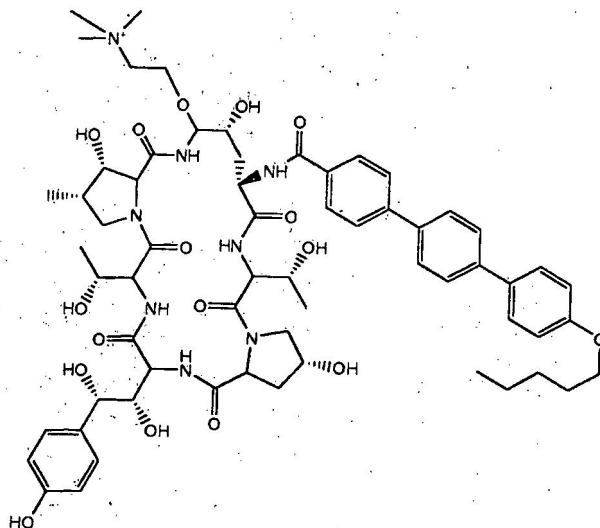
Las equinocandinas son un amplio grupo de agentes antifúngicos que típicamente están compuestos por un hexapéptido cíclico y una cola lipófila, la última de las cuales está unida al núcleo hexapéptido a través de un enlace amida. Aunque muchas equinocandinas son productos naturales, los miembros clínicamente relevantes de esta clase han sido todos derivados semisintéticos. Aunque las equinocandinas de origen natural poseen cierto grado de actividad antifúngica, no han sido adecuadas como agentes terapéuticos, principalmente debido a su baja solubilidad acuosa, potencia insuficiente y/o acción hemolítica. Las equinocandinas aprobadas son los productos de intensos esfuerzos para generar derivados que mantienen o mejoran la inhibición de la glucano sintasa, pero no causan los efectos hemolíticos. Como agentes terapéuticos, son compuestos atractivos en términos de sus semividas sistémicas, grandes ventanas terapéuticas, perfiles de seguridad y relativa falta de interacciones con otros fármacos. Desafortunadamente, la pobre solubilidad acuosa y la mala absorción intestinal de estos compuestos los han relegado a la administración por infusión intravenosa. Aunque los pacientes que reciben estos fármacos a menudo son hospitalizados con infecciones graves, la posibilidad de transición de los pacientes de la administración intravenosa en un entorno hospitalario a la administración oral en un hogar sería muy conveniente, especialmente teniendo en cuenta el curso del régimen suele exceder de 14 días. Además, una equinocandina oral puede expandir el uso de esta clase de fármacos para incluir pacientes que presentan infecciones fúngicas leves.

Resumen de la Invención

La presente invención presenta derivados de antifúngicos de equinocandina que pueden tener una

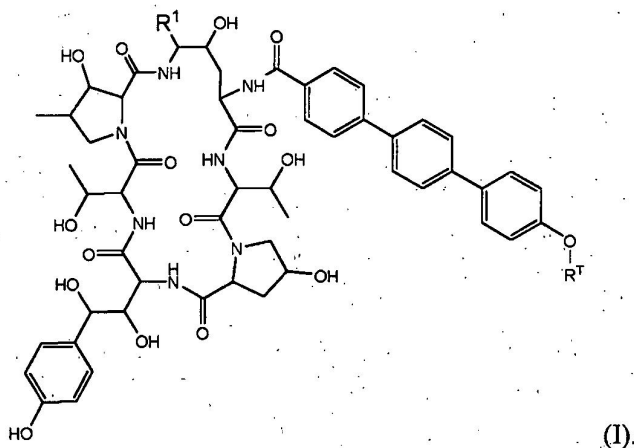
solubilidad acuosa incrementada. Más específicamente, la invención presenta compuestos de clase de equinocandina que han sido modificados de tal manera que pueden exhibir (i) actividad contra una o más especies o géneros fúngicos; (ii) mayor solubilidad y/o anfifilicidad acuosa; (iii) tener un índice terapéutico aumentado; (iv) idoneidad para la administración tópica; (v) idoneidad para la administración intravenosa; (vi) tener un mayor volumen de distribución; y/o (vii) tienen una semivida de eliminación aumentada.

La invención se refiere a compuestos de fórmula:



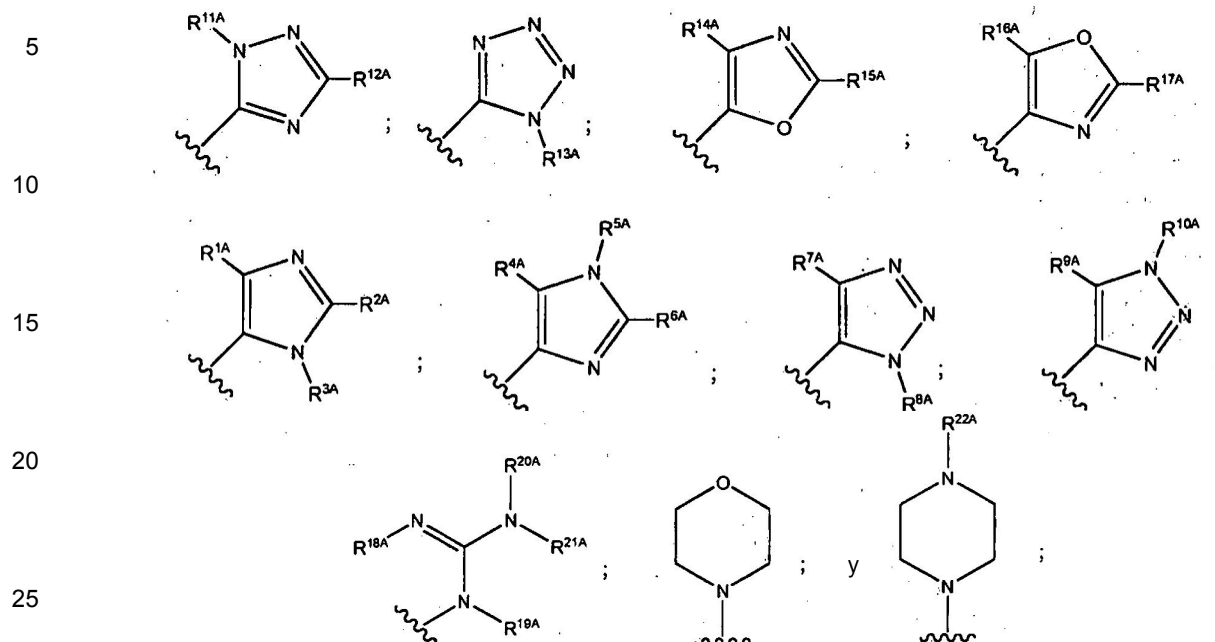
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente descripción también incluye compuestos de fórmula (I):



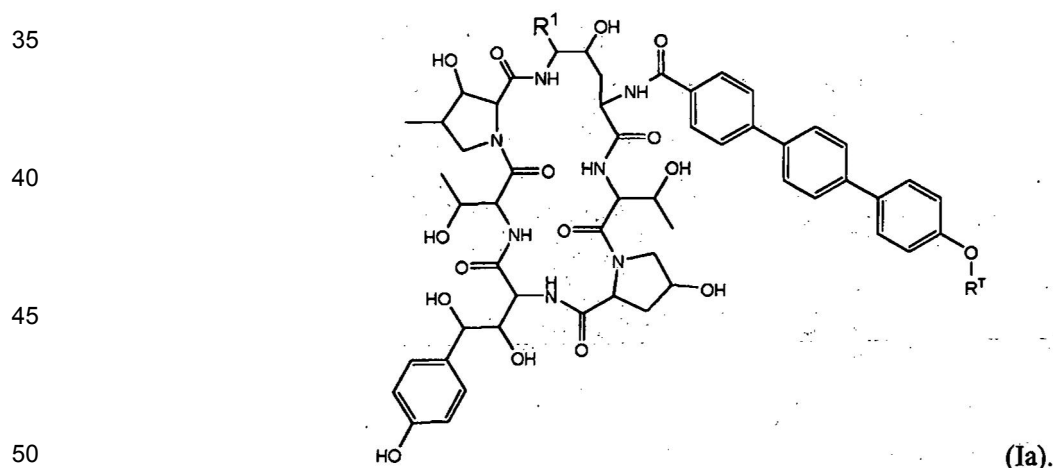
En la fórmula (I), R^1 es $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2X_1$, $O(CH_2CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2X_1$, $NHCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2X_3$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2X_3$, $NHCH_2CH_2X_4$, $NH[CH_2(CH_2)_aO]_bCH\{CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_5\}_2$, $O[CH_2(CH_2)_aO]_bCH\{CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_5\}_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_qCH_2CH_2X_5$, $NHCH_2(CH_2)_qX_6$, ó $OCH_2(CH_2)_qX_6$; R^T es n-pentilo, sec-pentilo ó iso-penty; X_1 is NH_2 , NHR^{A1} , $NR^{A1}R^{A2}$, $NR^{A1}R^{A2}R^{A3}$, ó $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_2 es OH, OR^{B1} , ó $OCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_3 es NH_2 , NHR^{C1} , $NR^{C1}R^{C2}$, ó $NR^{C1}R^{C2}R^{C3}$, ó $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_4 es $NR^{D1}R^{D2}R^{D3}$ ó $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; cada X_5 se selecciona independientemente entre OH, OR^{E1} , NH_2 , NHR^{E1} , $NR^{E1}R^{E2}$, $NR^{E1}R^{E2}R^{E3}$, $OCH_2(CH_2)_vZ_1$, y $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_6 se selecciona entre $NR^{F1}R^{F2}R^{F3}$ ó Z_1 ; a es un número entero de 1 a 2; b es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); c es un número entero de 1 a 2; d es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2, o 3); n es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); m es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); p es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); r es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); q es un número entero

de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3); v es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3); cada uno de R^{A1} , R^{A2} , R^{A3} , R^{B1} , R^{C1} , R^{C2} , R^{C3} , R^{D1} , R^{D2} , R^{D3} , R^{E1} , R^{E2} , R^{E3} , R^{F1} , R^{F2} , y R^{F3} se selecciona independientemente entre CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, and $CH(CH_3)_2$; Z_1 se selecciona entre:



y cada uno de R_{1A} , R_{2A} , R_{3A} , R_{4A} , R_{5A} , R_{6A} , R_{7A} , R_{8A} , R_{9A} , R_{10A} , R_{11A} , R_{12A} , R_{13A} , R_{14A} , R_{15A} , R_{16A} , R_{17A} , R_{18A} , R_{19A} , R_{20A} , R_{21A} y R_{22A} se selecciona independientemente entre H, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, and $CH(CH_3)_2$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

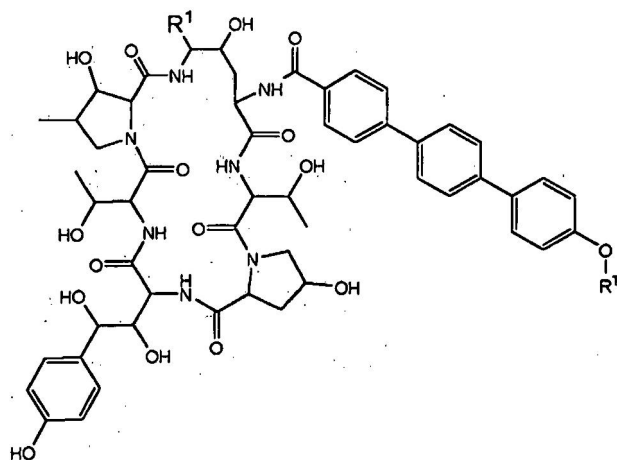
En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) se describe adicionalmente mediante la fórmula (Ia):



En formula (Ia), R^1 es $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2X_1$, $O(CH_2CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2X_1$, $NHCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2X_3$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2X_3$, $NHCH_2CH_2X_4$, $NH[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_5]_2$, $O[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_5]_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_rCH_2CH_2X_5$, $NHCH_2(CH_2)_qX_6$, ó $OCH_2(CH_2)_qX_6$; R^T es n-pentilo, sec-pentilo o iso-pentilo; X_1 es NH_2 , NHR^{A1} , $NR^{A1}R^{A2}$, ó $NR^{A1}R^{A2}R^{A3}$; X_2 es OH ó OR^{B1} ; X_3 es NH_2 , NHR^{C1} , $NR^{C1}R^{C2}$, ó $NR^{C1}R^{C2}R^{C3}$; X_4 is $NR^{D1}R^{D2}R^{D3}$; cada X_5 es independientemente seleccionada entre OH, OR^{E1} , NH_2 , NHR^{E1} , $NR^{E1}R^{E2}$, and $NR^{E1}R^{E2}R^{E3}$; X_6 es seleccionada entre $NR^{F1}R^{F2}R^{F3}$; a es un número entero de 1 a 2; b es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); c es un número entero de 1 a 2; d es un número entero de 0 a 3

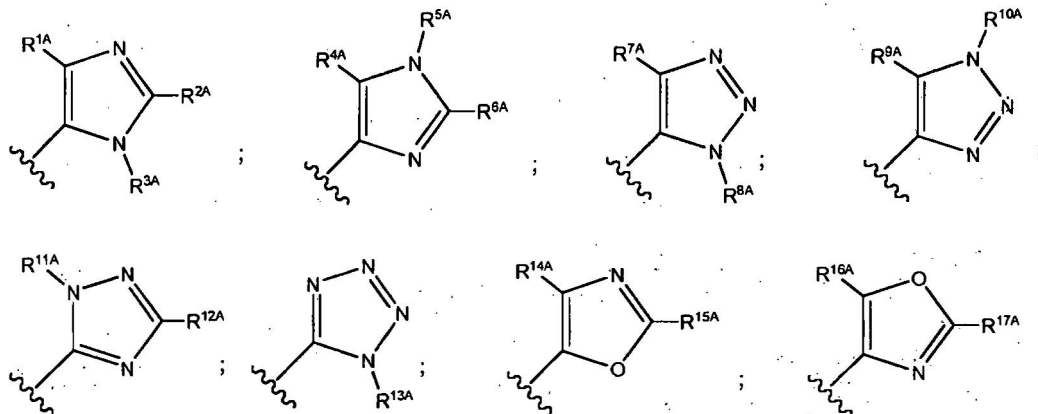
(por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); n es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5); m es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); p es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); r es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); q es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3); y cada de R^{A1} , R^{A2} , R^{A3} , R^{B1} , R^{C1} , R^{C2} , R^{C3} , R^{D1} , R^{D2} , R^{D3} , R^{E1} , R^{E2} , R^{E3} , R^{F1} , R^{F2} , y R^{F3} es, independientemente, seleccionado entre CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, y $CH(CH_3)_2$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones particulares de los compuestos de fórmula (I) y (Ia), uno de X_1 , X_3 , X_4 , and X_5 es seleccionado entre $N(CH_3)_3^+$ y $N(CH_2CH_3)_3^+$. En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) y (Ia), R^1 es $NHCH[CH_2CH_2N(CH_3)_3^+]_2$, $NHCH_2CH_2OCH[CH_2CH_2N(CH_3)_3^+]_2$, ó $NHCH_2CH_2OCH[CH_2CH_2N(CH_3)_3^+][CH_2CH_2OCH_2CH_2OH]$.

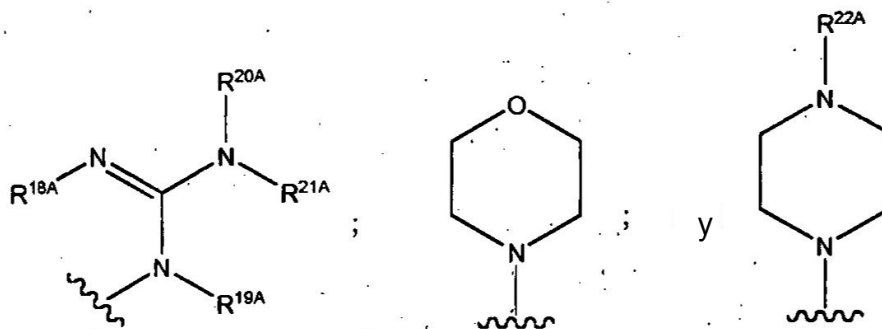
En aún otras realizaciones, el compuesto de fórmula (I) se describe adicionalmente mediante la fórmula (Ib):



En la formula (Ib), R^1 es $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2X_1O(CH_2CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2X_1$, $NHCH_2CH_2X_2$,

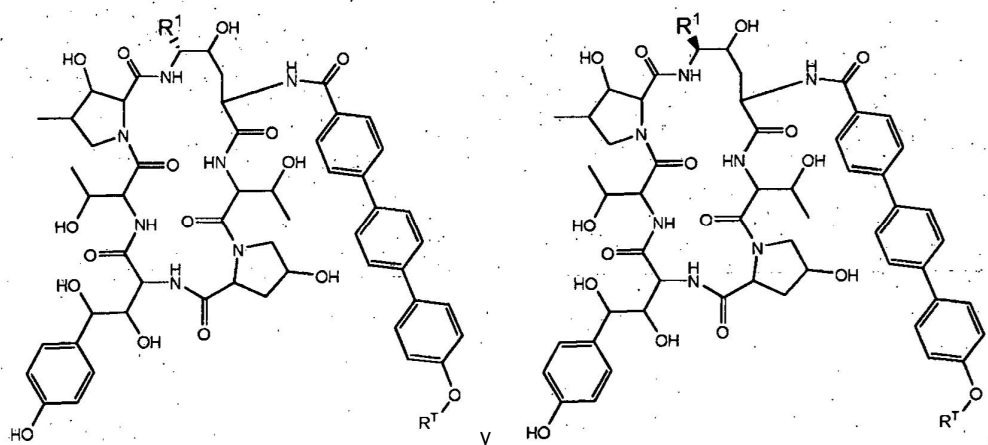
$NH(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2X_3$, $NHCH_2CH_2X_4$, $NH[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_5]_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_2CH_2CH_2X_5$, $NHCH_2(CH_2)_qX_6$, ó $OCH_2(CH_2)_qX_6$; R^T es n-pentilo, sec-pentilo o iso-pentilo; X_1 es $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_2 es $OCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_3 es $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_4 es $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; cada X_5 es independientemente seleccionado entre $OCH_2(CH_2)_vZ_1$ y $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_6 es Z_1 ; a es un número entero de 1 a 2; b es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); c es un número entero de 1 a 2; d es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); n es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5); m es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); p es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); q es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3); v es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3); Z_1 se selecciona de:





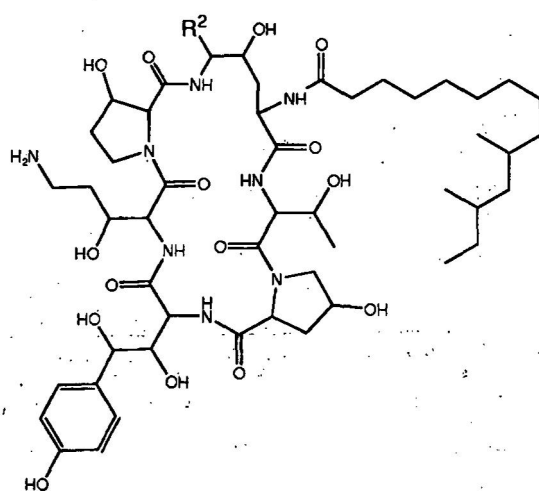
y cada una de R_{1A} , R_{2A} , R_{3A} , R_{4A} , R_{5A} , R_{6A} , R_{7A} , R_{8A} , R_{9A} , R_{10A} , R_{11A} , R_{12A} , R_{13A} , R_{14A} , R_{15A} , R_{16A} , R_{17A} , R_{18A} , R_{19A} , R_{20A} , R_{21A} y R_{22A} es seleccionada independientemente entre H, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, y $CH(CH_3)_2$ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular de los compuestos de fórmula (I), (Ia) y (Ib), el compuesto se describe adicionalmente mediante una de las fórmulas:



en donde R^1 y R^T son como se describieron anteriormente.

La descripción presenta además compuestos de fórmula (II):



(II).

En la fórmula (II), R^2 es $NH(CH_2CH_2O)_sCH_2CH_2X_8$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_sCH_2CH_2X_8$, $NH(CH_2CH_2NH)_tCH_2CH_2X_9$, $NH[CH_2(CH_2)_aO]_bCH(CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_9)_2$, $O[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_9]_2$, $NHCH_2(CH_2)_uX_{10}$, ó $OCH_2(CH_2)_uX_{10}$; X_8 es OH, OR^{G1} , NHR^{G1} , $NR^{G1}R^{G2}$, $NR^{G1}R^{G2}R^{G3}$, $OCH_2(CH_2)_wZ_2$, ó $NHCH_2(CH_2)_vZ_2$; cada X_9 es independientemente seleccionada entre OH, OR^{H1} , NHR^{H1} , $NR^{H1}R^{H2}$, $NR^{H1}R^{H2}R^{H3}$, $OCH_2(CH_2)_wZ_2$, y $NHCH_2(CH_2)_vZ_2$; X_{10} es seleccionado entre $NR^{I1}R^{I2}R^{I3}$ ó Z_2 ; a es un número entero de 1 a 2; b es

5 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; w es un numero entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1,2, o 3); Z_2 es seleccionado entre



35 y cada una R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{4A}, R^{5A}, R^{6A}, R^{7A}, R^{8A}, R^{9A}, R^{10A}, R^{11A}, R^{12A}, R^{13A}, R^{14A}, R^{15A}, R^{16A}, R^{17A}, R^{18A}, R^{19A}, R^{20A}, R^{21A}, y R^{22A} es independientemente seleccionado entre H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, y CH(CH₃)₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula (II) se describe adicionalmente mediante la fórmula (IIa):

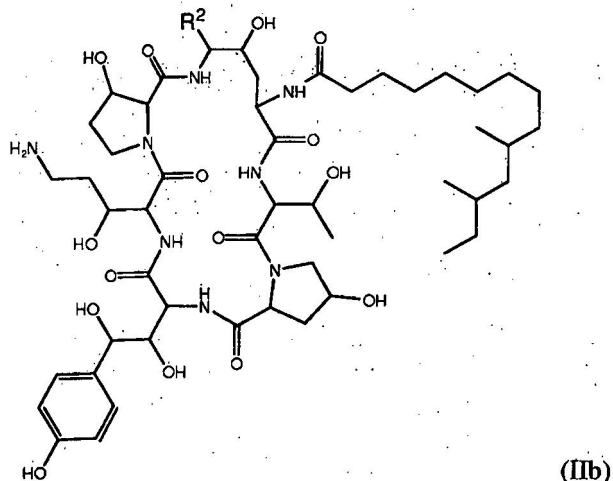


(IIa).

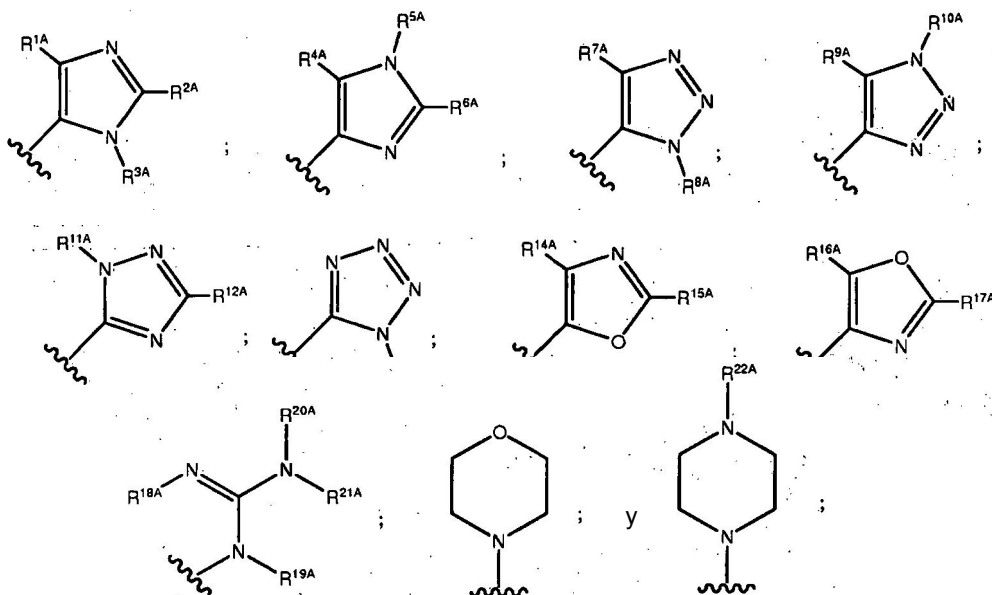
60 $2X_9$, $NH[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_9]_2$, $O[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_9]_2$, $NHCH_2(CH_2)_uX_{10}$, δ
 $OCH_2(CH_2)_uX_{10}$; X_8 is OH, OR^{G1} , NH_2 , NHR^{G1} , $NR^{G1}R^{G2}$, or $NR^{G1}R^{G2}R^{G3}$; cada X_9 es independientemente
seleccionado entre OH, OR^{H1} , NHR^{H1} , $NR^{H1}R^{H2}$, and $NR^{H1}R^{H2}R^{H3}$; X_{10} es seleccionado entre $NR^{I1}R^{I2}R^{I3}$; a es un

número entero de 1 a 2; b es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); c es un número entero de 1 a 2; d es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2, o 3); s es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5); t es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); u es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, ó 3); y cada una de R^{G1} , R^{G2} , R^{G3} , R^{H1} , R^{H2} , R^{H3} , R^{I1} , R^{I2} , and R^{I3} es independientemente seleccionado entre CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, y $CH(CH_3)_2$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones particulares de los compuestos de fórmula (II) y (IIa), uno de X_8 y X_9 se selecciona entre $N(CH_3)_3^+$ and $N(CH_2CH_3)_3^+$. En ciertas realizaciones del compuesto de fórmula (II) y (IIa), R^2 es $NHCH[CH_2CH_2N(CH_3)_3^+]_2$, $NHCH_2CH_2OCH[CH_2CH_2N(CH_3)_3^+]_2$, or $NHCH_2CH_2OCH[CH_2CH_2N(CH_3)_3^+][CH_2CH_2OCH_2CH_2OH]$.

En aún otras realizaciones, el compuesto de fórmula (I) se describe adicionalmente mediante la fórmula (IIb):

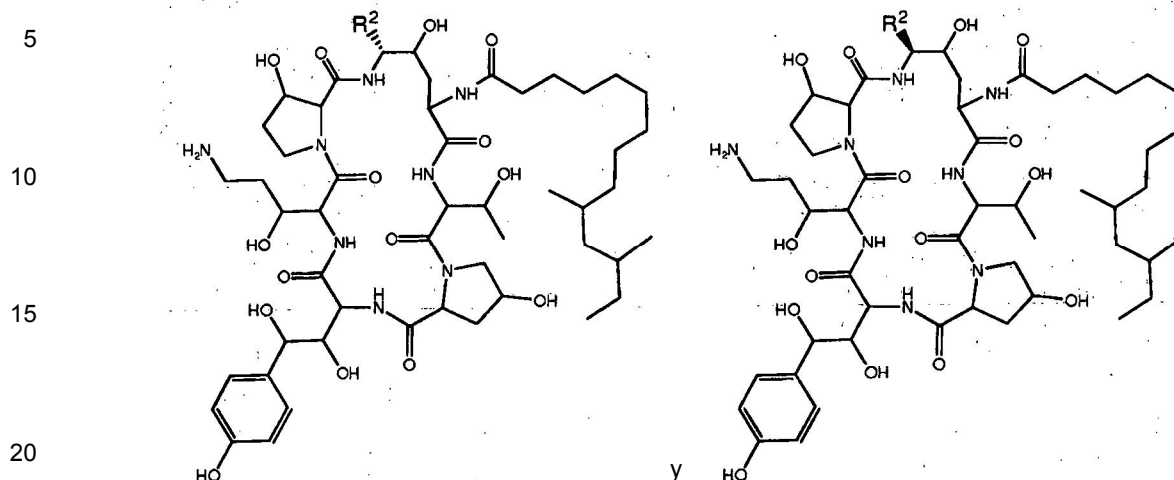


En la formula (IIb), R^2 es $NH(CH_2CH_2O)_sCH_2CH_2X_8$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_sCH_2CH_2X_8$, $NH(CH_2CH_2NH)_tCH_2CH_2X_9$, $NH[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_9]_2$, $O[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_9]_2$, $NHCH_2(CH_2)_uX_{10}$, ó $OCH_2(CH_2)_uX_{10}$; X_8 es $OCH_2(CH_2)_wZ_2$ ó $NHCH_2(CH_2)_vZ_2$; cada X_5 es independientemente seleccionado entre $OCH_2(CH_2)_wZ_2$ y $NHCH_2(CH_2)_vZ_2$; X_{10} es Z_2 ; es un número entero de 1 a 2; b es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); c es un número entero de 1 a 2; d es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); s es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5); t es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); u es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3); w es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, ó 3); Z_2 se selecciona de



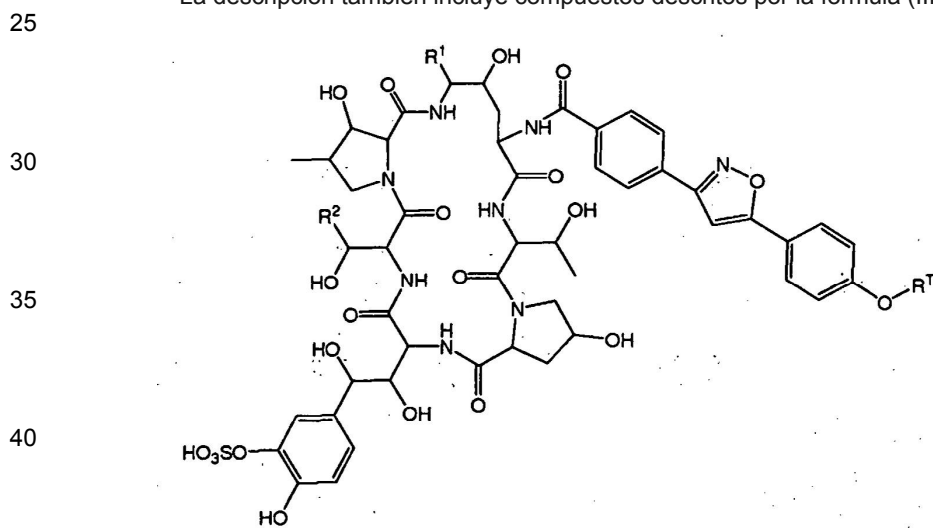
y cada R^{1A} , R^{2A} , R^{3A} , R^{4A} , R^{5A} , R^{6A} , R^{7A} , R^{8A} , R^{9A} , R^{10A} , R^{11A} , R^{12A} , R^{13A} , R^{14A} , R^{15A} , R^{16A} , R^{17A} , R^{18A} , R^{19A} , R^{20A} , R^{21A} , and R^{22A} es independientemente seleccionado entre H, CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, and $CH(CH_3)_2$ ó una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular de los compuestos de fórmula (II), (IIa) y (IIb), el compuesto se describe adicionalmente mediante una de las fórmulas:



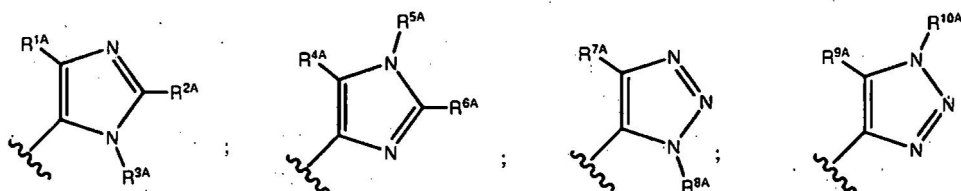
en la que R^2 es como se ha descrito anteriormente.

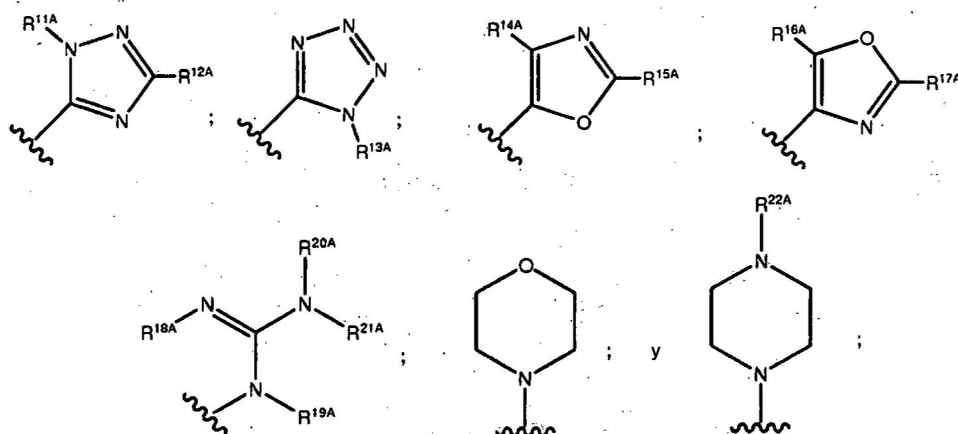
La descripción también incluye compuestos descritos por la fórmula (III):



(III).

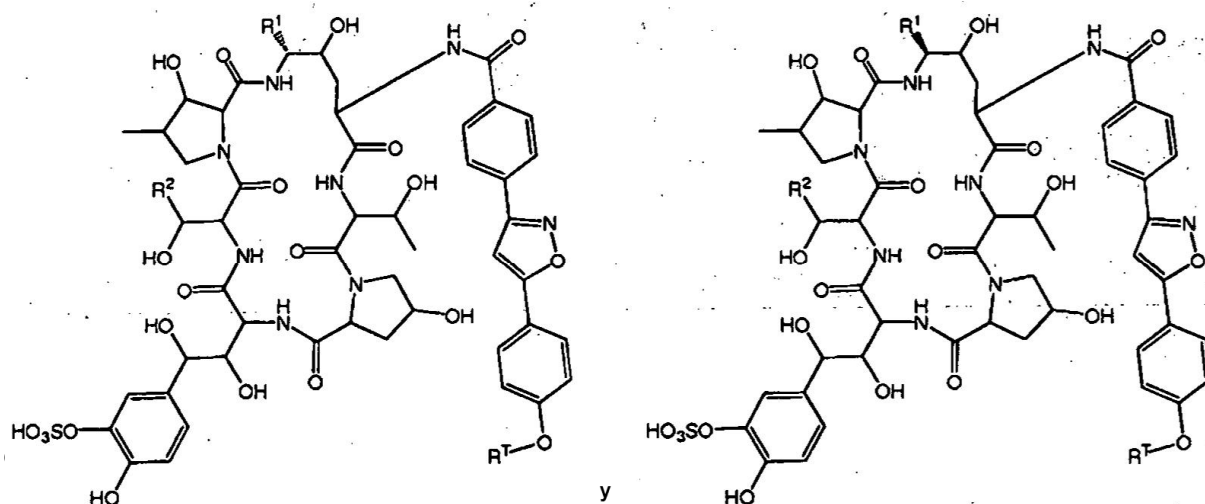
En la fórmula (III), R^1 es $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2X_1$, $O(CH_2CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2X_1$, $NHCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2X_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2X_3$, $NH(CH_2CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2X_3$, $NHCH_2CH_2X_4$, $NH[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_5]_2$, $O[CH_2(CH_2)_aO]_bCH[CH_2[OCH_2(CH_2)_c]_dX_5]_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_rCH_2CH_2X_5$, $NHCH_2(CH_2)_qX_6$, ó $OCH_2(CH_2)_qX_6$; R^2 es H , CH_3 , $CH_2CH_2NH_2$, ó $CH_2C(O)NH_2$; R^T es n -pentilo, sec -pentilo ó iso -pentilo; X_1 es NH_2 , NHR^{A1} , $NR^{A1}R^{A2}$, $NR^{A1}R^{A2}R^{A3}$, ó $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_2 es OH , OR^{B1} , ó $OCH_2(CH_2)_wZ_1$; X_3 is NH_2 , NHR^{C1} , $NR^{C1}R^{C2}$, ó $NR^{C1}R^{C2}R^{C3}$, ó $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_4 es $NR^{D1}R^{D2}R^{D3}$ ó $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; cada X_5 es independientemente seleccionado entre OH , OR^{E1} , NH_2 , NHR^{E1} , $NR^{E1}R^{E2}$, $NR^{E1}R^{E2}R^{E3}$, $OCH_2(CH_2)_wZ_1$, y $NHCH_2(CH_2)_vZ_1$; X_6 es seleccionado entre $NR^{F1}R^{F2}R^{F3}$ ó Z_1 ; a es un número entero de 1 a 2; b es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2, ó 3); c es un número entero de 1 a 2; d es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 ó 3); n es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, ó 5); m es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); p es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); r es un número entero de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5); q es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, ó 3); v es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, ó 3); cada R^{A1} , R^{A2} , R^{A3} , R^{B1} , R^{C1} , R^{C2} , R^{C3} , R^{D1} , R^{D2} , R^{D3} , R^{E1} , R^{E2} , R^{E3} , R^{F1} , R^{F2} , y R^{F3} es independientemente seleccionado entre CH_3 , CH_2CH_3 , $CH_2CH_2CH_3$, y $CH(CH_3)_2$; Z_1 es seleccionado entre:





y cada R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{4A}, R^{5A}, R^{6A}, R^{7A}, R^{8A}, R^{9A}, R^{10A}, R^{11A}, R^{12A}, R^{13A}, R^{14A}, R^{15A}, R^{16A}, R^{17A}, R^{18A}, R^{19A}, R^{20A}, R^{21A}, and R^{22A} es independientemente seleccionado entre H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, and CH(CH₃)₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular de los compuestos de fórmula (III), el compuesto se describe adicionalmente mediante una de las fórmulas:



compuesto 4, el compuesto 5, el compuesto 6, el compuesto 7, el compuesto 8, el compuesto 9, el compuesto 10, el compuesto 11, el compuesto 12, el compuesto 13, el compuesto 14, compuesto 16, compuesto 17, compuesto 18, compuesto 19, compuesto 20, compuesto 21, compuesto 22, y sales de los mismos.

El compuesto de la invención puede aumentar la anfifilicidad; aumento de la solubilidad acuosa (por ejemplo, en tampón de acetato 0,1 M a pH 5,6); un índice terapéutico aumentado; una vida media de eliminación aumentada; y/o un mayor volumen de distribución.

La invención también incluye una composición farmacéutica que incluye un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica incluye una sal de acetato o una sal de cloruro de un compuesto de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración intravenosa, tópica u oral en forma de dosificación unitaria, o cualquier otra forma de dosificación descrita en el presente documento.

La invención presenta además un método para tratar una infección fúngica en un sujeto mediante la administración al sujeto de una composición farmacéutica de la invención en una cantidad suficiente para tratar la infección. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa o tópica. La composición farmacéutica puede administrarse para tratar una infección de flujo sanguíneo, infección de tejido (por ejemplo, infección de pulmón, riñón o hígado) en el sujeto, o cualquier otro tipo de infección descrito en el presente documento. La infección micótica que se está tratando puede ser una infección seleccionada de tinea capitis, tiña corporis, tinea pedis, onicomicosis, perionicomicosis, pityriasis versicolor, candidosis vaginal, candidiasis vaginal,

candidosis biliar, candidosis esofágica, candidosis del tracto urinario, candidosis sistémica, candidosis mucocutánea, aspergilosis, mucormicosis, paracoccidioidomicosis, blastomicosis Norteamericana, histoplasmosis, coccidioidomicosis, esporotricosis, sinusitis fúngica o sinusitis crónica. En ciertas realizaciones, la infección que se está tratando es una infección por *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. clavatus* o *A. Ochraceus*.

La invención presenta un método para prevenir una infección fúngica en un sujeto mediante la administración al sujeto de una composición farmacéutica de la invención en una cantidad suficiente para prevenir la infección. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica se administra intravenosamente al menos una vez durante un periodo de 1 a 30 días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 veces durante un periodo de 1 a 30 días). Por ejemplo, los métodos de la invención pueden usarse para el tratamiento profiláctico en sujetos que se preparan para un procedimiento médico invasivo (por ejemplo, preparación para cirugía, tal como recibir un trasplante, terapia de células madre, un injerto, una prótesis, recibir tratamiento a largo plazo o cateterización intravenosa frecuente, o recibir tratamiento en una unidad de cuidados intensivos), en sujetos inmunocomprometidos (por ejemplo, sujetos con cáncer, con VIH/SIDA, o con agentes inmunosupresores) o en sujetos sometidos a terapia antibiótica a largo plazo.

En una realización particular de cualquiera de los métodos de la invención, la composición farmacéutica incluye el compuesto 1, o cualquier otro compuesto descrito en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también incluye un método para prevenir, estabilizar o inhibir el crecimiento de hongos o matar hongos poniendo en contacto los hongos o un sitio susceptible de crecimiento fúngico con un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como se usa en este documento, los términos "una cantidad suficiente" y "cantidad suficiente" se refieren a la cantidad de un fármaco requerido para tratar o prevenir una infección. La cantidad suficiente utilizada para practicar la invención para el tratamiento terapéutico o profiláctico de afecciones causadas o contribuidas por una infección varía dependiendo de la forma de administración, el tipo de infección, la edad, el peso corporal y la salud general del sujeto. En última instancia, el médico tratante o veterinario decidirá la cantidad apropiada y el régimen de dosificación. Dicha cantidad se denomina cantidad "suficiente".

Por "infección fúngica" se entiende la invasión de un huésped por hongos patógenos. Por ejemplo, la infección puede incluir el crecimiento excesivo de hongos que están normalmente presentes en o sobre el cuerpo de un sujeto o crecimiento de hongos que normalmente no están presentes en o sobre un sujeto. Más en general, una infección por hongos puede ser cualquier situación en la que la presencia de una población de hongos es perjudicial para un cuerpo huésped. Por lo tanto, un sujeto sufre de una infección por hongos cuando está presente una cantidad excesiva de una población de hongos en o sobre el cuerpo del sujeto o cuando la presencia de una población de hongos está dañando las células u otro tejido del sujeto.

Por "anfifilicidad aumentada" se entiende un aumento en la solubilidad de un compuesto de la invención tanto en agua (tampón de acetato 0,1 M a pH 5,6) como en glicerol en comparación con el compuesto de equinocandina parental (es decir, compuestos de fórmula (I), (por ejemplo, los compuestos de fórmula (II), (IIa) y (IIb) pueden tener una anfifilicidad aumentada en comparación con la caspofungina, y los compuestos de fórmula (III) pueden tener una mayor anfifilicidad en comparación con la anidulafungina tienen una anfifilicidad aumentada en comparación con la micafungina).

Por "semivida de eliminación aumentada" se entiende un aumento en la semivida de eliminación (por ejemplo, como se observó en un estudio de PK como se describe en el Ejemplo 24) para un compuesto de la invención en comparación con el compuesto de equinocandina parental (es decir, de fórmula (I), (Ia) y (Ib) pueden tener una semivida de eliminación aumentada en comparación con la anidulafungina; los compuestos de fórmula (II), (IIa) y (IIb) pueden tener una semivida de eliminación aumentada en comparación con la caspofungina; y los compuestos de fórmula (III) pueden tener una semivida de eliminación aumentada en comparación con la micafungina) administrada en las mismas condiciones (por ejemplo, con los mismos vehículos y otros excipientes inactivos y por la misma ruta). Los compuestos de la invención pueden presentar una semivida de eliminación de al menos 25%, 50%, 100%, 200% o 300% más larga que el compuesto de la clase de equinocandina madre correspondiente.

Por "mayor volumen de distribución" se entiende un aumento en el volumen de distribución (por ejemplo, como se observó en un estudio de PK como se describe en el Ejemplo 24) para un compuesto de la invención en comparación con el compuesto de equinocandina parental (es decir, (I), (Ia) y (Ib) pueden tener un volumen de distribución aumentado en comparación con la anidulafungina; los compuestos de fórmula (II), (IIa) y (IIb) pueden tener un volumen de distribución aumentado en comparación con la caspofungina; y los compuestos de fórmula (III) pueden tener un volumen de distribución aumentado en comparación con la micafungina) administrada en las mismas condiciones (por ejemplo, con los mismos vehículos y otros excipientes inactivos y por la misma ruta). Los compuestos de la invención pueden presentar al menos un 25%, un 50%, un 100%, un 200% o un 300% más de

volumen de distribución que el correspondiente compuesto de clase de equinocandina madre.

Por "aumento del índice terapéutico" se entiende un aumento en la relación de la dosis letal media (DL50) a la dosis efectiva media (ED50) (por ejemplo, observada usando un modelo de infección por ratón) para un compuesto de la invención en comparación con el compuesto de equinocandina de origen (es decir, los compuestos de fórmula (I), (Ia) y (Ib) pueden tener un índice terapéutico aumentado en comparación con la anidulafungina; los compuestos de fórmula (II), (IIa) y (IIb) pueden tener un índice terapéutico aumentado en comparación con la caspofungina; y los compuestos de fórmula (III) pueden tener un índice terapéutico aumentado en comparación con la micafungina) administrada en las mismas condiciones (por ejemplo, con los mismos vehículos y otros excipientes inactivos y por la misma ruta). Los compuestos de la invención pueden presentar al menos 25%, 50%, 100%, 200% o 300% más de índice terapéutico que el compuesto de la clase de equinocandina madre correspondiente. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden exhibir semividas circulantes extendidas in vivo, permitiendo que se logre una eficacia similar a dosis menores para el compuesto de la invención en comparación con el compuesto de equinocandina madre.

Como se usa en la presente memoria, el término "tratar" se refiere a la administración de una composición farmacéutica con fines profilácticos y/o terapéuticos. "Prevenir la enfermedad" se refiere al tratamiento profiláctico de un sujeto que aún no está enfermo, pero que es susceptible o está en riesgo de padecer una enfermedad en particular. "Tratar la enfermedad" o usar para "tratamiento terapéutico" se refiere a administrar el tratamiento a un sujeto que ya padece una enfermedad para mejorar o estabilizar la condición del sujeto. Por lo tanto, en las reivindicaciones y realizaciones, el tratamiento es la administración a un sujeto ya sea con fines terapéuticos o profilácticos.

El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, tales como una píldora, tableta, comprimido, cápsula dura o cápsula blanda, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un fármaco. Por "cápsula dura" se entiende una cápsula que incluye una membrana que forma un recipiente de dos partes en forma de cápsula capaz de transportar una carga útil sólida o líquida de fármaco y excipientes. Por "cápsula blanda" se entiende una cápsula moldeada en un solo recipiente que lleva una carga útil líquida o semisólida de fármaco y excipientes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

Dibujos

La Figura 1 es una tabla de valores de MEC y MIC frente a *Aspergillus* spp. obtenido usando los métodos descritos en el Ejemplo 25. La Figura 2 es una tabla de valores de MIC frente a *Candida* spp. a las 24 y 48 horas obtenidas usando los métodos descritos en el Ejemplo 26.

Las Figuras 3A y 3B son cromatogramas de HPLC de fase inversa de una mezcla de anidulafungina y isómeros del compuesto 1 (Figura 3A) y una muestra purificada del compuesto 1 (Figura 3B). Los cromatogramas se obtuvieron utilizando el método descrito en el Ejemplo 30.

Descripción Detallada

La invención presenta compuestos de clase de equinocandina que han sido modificados de tal manera que pueden exhibir (i) actividad contra una o más especies o géneros fúngicos; (ii) mayor solubilidad y/o anfifilicidad acuosa; (iii) tener un índice terapéutico aumentado; (iv) idoneidad para la administración tópica; (v) idoneidad para la administración intravenosa; (vi) tener un mayor volumen de distribución; y/o (vii) tienen una semivida de eliminación aumentada.

Síntesis

Los compuestos de la invención se pueden sintetizar, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos, acoplando compuestos de clase equinocandina funcionalizados o no funcionalizados con los grupos acilo, alquilo, hidroxilo y/o amino apropiados bajo condiciones de reacción estándar.

Típicamente, los compuestos de la clase de equinocandina semisintéticos de la invención se pueden hacer modificando el andamio de equinocandina que se produce de forma natural. Por ejemplo, la neumocandina B₀ se prepara mediante reacciones de fermentación; donde la fermentación y los caldos mixtos producen una mezcla de productos que luego se separan para producir la neumocandina B₀, que se utiliza en la síntesis de caspofungina (véase la patente de los Estados Unidos número 6.610.822, que describe la extracción de los compuestos de clase echinocandina, tales como la neumocandina B₀, WF 11899 y equinocandina B mediante la realización de varios procedimientos de extracción, y véase la Patente de Estados Unidos N° 6.610.822, que describe métodos para purificar los extractos brutos).

Para aproximaciones semisintéticas a los compuestos de la invención, la estereoquímica del compuesto será dictada por el material de partida. Por lo tanto, la estereoquímica de los derivados de equinocandina no naturales tendrá típicamente la misma estereoquímica que la troquelación de equinocandina natural (la estereoquímica representativa se representa en los ejemplos) de la que se derivan. Por consiguiente, cualquiera de los compuestos mostrados a continuación anidulafungina, caspo-fungin o micafungina se puede usar como material de partida en la síntesis de los compuestos de la invención que comparten la misma configuración estereoquímica en cada uno de los residuos de aminoácidos encontrados en el compuesto natural.

Por consiguiente, los compuestos de clase echinocandina de la invención pueden derivarse de los antifúngicos de péptidos cíclicos que se producen cultivando diversos microorganismos.

Los compuestos de la invención se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en los ejemplos.

Los compuestos de la descripción pueden utilizarse también como materiales de partida en la síntesis de los compuestos de fórmula (Ib) y (IIb). Por ejemplo, se pueden usar compuestos de terminación de amina para preparar derivados de guanidina. La conversión de grupos amino en grupos guanidina puede llevarse a cabo utilizando protocolos sintéticos estándar. Por ejemplo, Mosher ha descrito un método general para preparar guanidinas monosustituidas por reacción de ácido aminoiminometil-anesulfónico con aminas (Kim, K., Lin, Y.-T. Mosher, HS Tetrahedron Lett. 29: 3183, 1988). Un método más conveniente para la guanilación de aminas primarias y secundarias fue desarrollado por Bernatowicz empleando hidrócloruro de 1H-pirazol-1-carboxamida; 1-H-pirazol-1-(N, N'-bis(terc-butoxicarbonil) carboxamida, o 1-H-pirazol-1-(N, N'-bis(benciloxicarbonil) carboxamida. Estos reactivos reaccionan con aminas para dar guanidinas monosustituidas (véase Bernatowicz et al., J. Org. Chem. 57: 2497, 1992 y Bernatowicz et al., Tetrahedron Lett., 34: 3389, 1993). Además, se ha demostrado que las tioureas y las S-alkil-isotioureas son intermediarios útiles en las síntesis de guanidinas sustituidas (Poss et al., Tetrahedron Lett., 33: 5933, 1992). Los compuestos de fórmula (Ib) y (IIb) que incluyen un anillo heterocíclico pueden sintetizarse, por ejemplo, acoplando un heterociclo sustituido con hidroxialquilo o aminoalquilo con un compuesto de equinocandina de origen utilizando los métodos de acoplamiento descritos en los ejemplos.

Terapia y Formulación

La invención presenta composiciones y métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con una infección fúngica (por ejemplo, una infección por levaduras) administrando un compuesto de la invención. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía apropiada para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con una infección por hongos. Estos pueden administrarse a seres humanos, animales de compañía domésticos, ganado u otros animales con un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando se administran por vía oral, éstas pueden estar en forma de dosificación unitaria, o en forma de dosificación oral líquida. La administración puede ser tópica, parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbitaria, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracistémica, intraperitoneal, intranasal, aerosol, por supositorios o administración oral.

Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para formulaciones de administración oral en forma de tabletas o cápsulas, jarabes o formas de dosificación líquidas orales; formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales; formulado como gotas para los oídos; formulados como aerosoles, o formulados para administración tópica, tales como una crema o una pomada.

Métodos bien conocidos en la técnica para preparar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20ª ed., A. A. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, éter de polioxietilén-9-laurilo, glicolato y desoxicolato, o pueden ser soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales o gel. La concentración del compuesto en la formulación variará dependiendo de un número de factores, incluyendo la dosificación del fármaco a administrar, y la vía de administración.

El compuesto o combinación se puede administrar opcionalmente como una sal farmacéuticamente aceptable, tal como sales de adición de ácido; sales metálicas formadas por la sustitución de un protón ácido con un metal, tal como sales alcalinas o alcalinotérreas (por ejemplo, sales de sodio, litio, potasio, magnesio o calcio); o complejos metálicos que se usan comúnmente en la industria farmacéutica. Ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen ácidos orgánicos tales como ácidos acético, láctico, pamoico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzoico, palmítico, subérico, salicílico, tartárico, metanosulfónico, toluenosulfónico o trifluoroacético; ácidos poliméricos tales como ácido tánico y carboximetilcelulosa; y ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico. Los complejos metálicos incluyen zinc, hierro, entre otros.

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el ingrediente(s) activo(s) en una

mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (por ejemplo sacarosa y sorbitol), agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco). Las formulaciones para uso oral también pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria como tabletas masticables, tabletas, comprimidos o cápsulas (es decir, como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio de aceite).

Los compuestos de la invención se pueden formular con excipientes que mejoran la biodisponibilidad oral del compuesto. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden formularse para administración oral con ácidos grasos de cadena media (C8 a C12) (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo), tales como ácido cáprico, ácido caprílico, ácido láurico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una mezcla de los mismos. La formulación puede incluir opcionalmente un alcohol de alquilo de cadena media (C8 a C12), entre otros excipientes. Alternativamente, los compuestos de la invención se pueden formular para la administración oral con uno o más sacáridos de alquilo de cadena media (por ejemplo, beta-D-maltosidos de alquilo (C8 a C14), beta-D-gulósidos de alquilo (C8 a C14), octil beta-D-maltosido, beta-D-maltosirósido de octilo, beta-D-maltosido de decil, beta-D-maltosido de tetradecilo, beta-D-glucósido de octilo, beta-D-glucopiranosido de octilo, beta-D-glucósido de decil, dodecil beta-D-glucósido) y/o ésteres de azúcares de cadena media (por ejemplo, monocaprato de sacarosa, mono-caprilato de sacarosa, monolaurato de sacarosa y monotetradecanoato de sacarosa).

Las formulaciones se pueden administrar a sujetos humanos en cantidades terapéuticamente eficaces. Las gamas de dosis típicas son de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 800 mg/kg, o aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, del peso corporal por día. La dosificación preferida del fármaco a administrar dependerá probablemente de variables tales como el tipo y extensión del trastorno, el estado general de salud del sujeto particular, el compuesto específico que se administra, los excipientes utilizados para formular el compuesto y su ruta de administración.

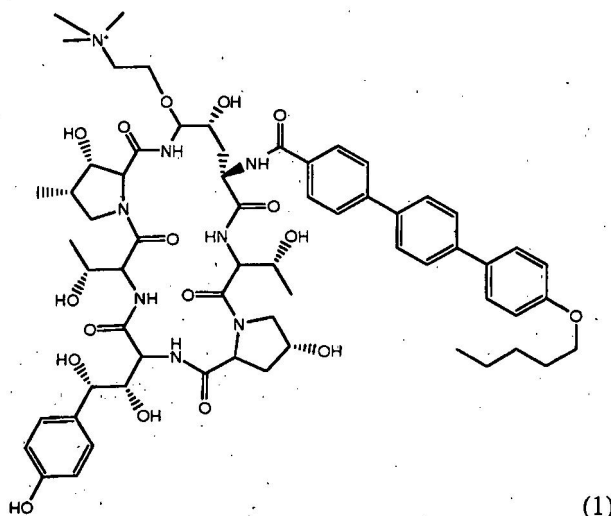
Los compuestos de la invención pueden usarse para tratar, por ejemplo, tinea capitis, tinea corporis, tinea pedis, onicomicosis, perionicomicosis, pitiriasis versicolor, candidiasis oral, candidosis vaginal, candidosis de las vías respiratorias, candidosis biliar, candidosis esofágica, candidosis sistémica, candidosis mucocutánea, aspergilosis, mucormicosis, paracoccidioidomicosis, blastomicosis norteamericana, histoplasmosis, coccidioidomycosis, esporotricosis, sinusitis fúngica y sinusitis crónica.

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción y descripción completa de cómo se realizan, fabrican y evalúan los métodos y compuestos reivindicados en la presente memoria y se pretende que sean puramente ejemplares de la invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

La analítica HPLC se realizó usando las siguientes columnas y condiciones: Phenomenex Luna C18 (2), 5 mm, 100 Å, 2,03-150 mm, CH₃CN 1-99% (TFA al 0,1%) en H₂O (TFA al 0,1% /15 minutos. Se realizó una HPLC preparativa de 19 3 300 mm, CH₃CN/H₂O varios gradientes lineales usando la siguiente columna: WatersNova - PakHRC18,6mm, 60Å, 50 y modificadores según sea necesario a 10 mL/min.

Las siguientes abreviaturas se usan en los ejemplos a continuación: min (minutos), h (horas), mmol (milimoles), ml (mililitro), mm (micrómetro), Å (angstrom), THF (tetrahydrofurano), DMF (dimetilformamida), TLC (cromatografía de capa fina), TFA (ácido trifluoroacético), HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), RP (fase inversa), DIEA (diisopropetiletilamina), LC/MS (cromatografía líquida/espectrometría de masas) tiempo de retención en HPLC), C (Celsius), y FMOc (fluorenilmetiloxycarbonilo).

Ejemplo 1. Síntesis del compuesto 1.



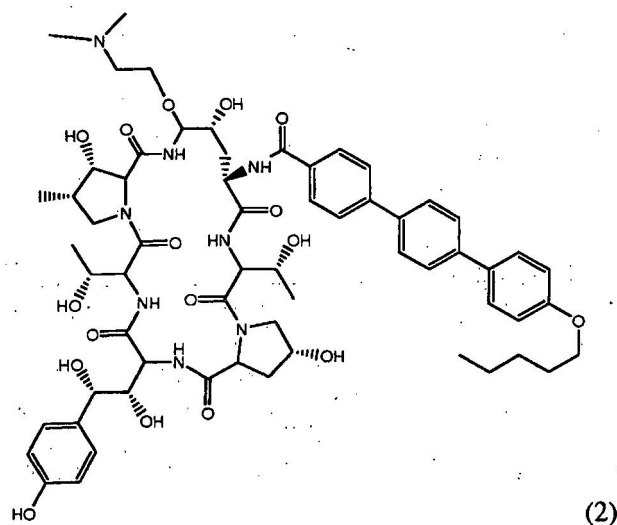
Anidulafungina (5 mg, 0,004 mmol) disuelta en DMSO anhidro (0,2 ml) fue tratada con clorhidrato de colina (13 mg, 0,093 mmol) y HCl (4 M en 1,4 - dioxano, 1,0 ml, 0,004 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y se calentó a 40°C durante ~8 h, luego se diluyó con agua y acetonitrilo y se purificó por HPLC RP preparativa eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 2,0 mg de compuesto 1 como un sólido blanco. HPLC TR 10,84 min (90%). LC/MS, ESI + m/z 1225,60 [M]⁺.

Dos protocolos sintéticos alternativos se proporcionan a continuación.

Se suspendió anidulafungina (3,00 g, 2,63 mmol) en THF seco (5 ml) y se trató con ácido fenilborónico (386 mg, 3,17 mol). La mezcla se agitó hasta que todo el sólido se disolvió (~30 min) luego durante 30 min adicionales. El THF se eliminó a vacío a temperatura ambiente. El residuo se disolvió nuevamente en THF y se concentró a sequedad y después se suspendió en CH₃CN acuoso y se concentró a sequedad para eliminar el agua. El sólido resultante y el clorhidrato de N, N-dimetiletanolamina (9,25 g, 73,6 mmol) se mezclaron en DMSO seco (10 ml) hasta que se disolvió. La solución viscosa transparente resultante se trató con HCl 4M en dioxano (0,33 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La reacción se diluyó con agua (10 ml), y la solución resultante se añadió luego lentamente a una solución de bicarbonato sódico (12,4 g, 2 eq frente a clorhidrato de amina) en 300 ml de agua con agitación vigorosa. El precipitado floculante resultante se aisló por centrifugación. El sólido se trituroó entonces con 200 ml de agua para dar una suspensión translúcida homogénea que se separó por centrifugación. Los sólidos se disolvieron en DMSO (15,0 ml) y se trató con DIEA (0,460 ml, 2,64 mmol) seguido de CH₃I (0,250 ml, 4,02 mmol), y la solución se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió agua (7 ml) seguido de metanol (7 ml) y ácido acético (0,300 ml). La disolución resultante se diluyó adicionalmente con agua (7 ml) y se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con CH₃CN/acetato de amonio acuoso 0,05 M pH 5,0. Se combinaron las fracciones de interés y se concentraron al vacío a 25°C, luego se liofilizaron para dar 2,33 g del compuesto 1 en forma de un sólido blanco. HPLC TR 10,84 min (& gt; 98%). LC /MS, ESI +/- m/z 1225,60 [M]⁺.

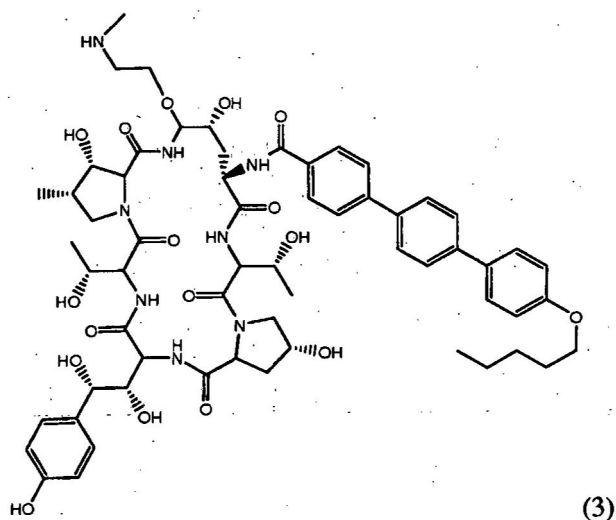
Se suspendió anidulafungina (0,052 g, 0,046 mmol) en THF seco (~2 ml) y se trató con ácido fenilborónico (7 mg, 0,057 mol). La mezcla se agitó hasta que todo el sólido se disolvió (~30 min) y después durante 30 min adicionales. El THF se eliminó a vacío a temperatura ambiente. El residuo se disolvió nuevamente en THF y se concentró a sequedad y después se suspendió en CH₃CN acuoso y se concentró a sequedad para eliminar el agua. El sólido resultante a 0°C se suspendió en TFA/CH₃CN al 20% (2,5 ml) y cloruro de colina tratado (0,406 g, 2,9 mmol) y se dejó calentar a temperatura ambiente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y luego durante una noche a 5°C. La reacción se concentró a vacío a temperatura ambiente y después se diluyó con metanol y agua y se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con CH₃CN/acetato de amonio acuoso 0,05 M pH 5,0. Las fracciones de interés se combinaron y se concentraron a vacío a 25°C, luego se liofilizaron para dar 37 mg del compuesto 1 en forma de un sólido blanco. HPLC TR 10,84 min (98%). LC/MS, ESI +/- m/z 1225,60 [M]⁺.

Ejemplo 2. Síntesis del compuesto comparativo 2.



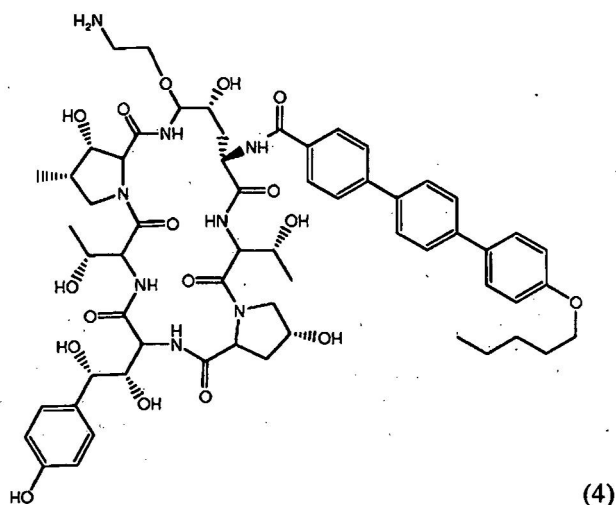
Se trató N, N-dimetiletanolamina (9,9 ml, 0,100 mmol) en DMF anhidro con HCl (4M en 1,4-dioxano, 26,0 ml, 0,104 mmol). Se añadió anidulafungina (5 mg, 0,004 mmol), y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 día y se calentó a 40°C durante 3 días. Después, la reacción se diluyó con agua y acetonitrilo y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/ CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 2,1 mg del compuesto 2 en forma de un sólido blanco. HPLC T_R 10,94 min (86%). LC/MS, ESI+ m/z 1211.58 [M+H]⁺.

Ejemplo 3. Síntesis del compuesto comparativo 3.



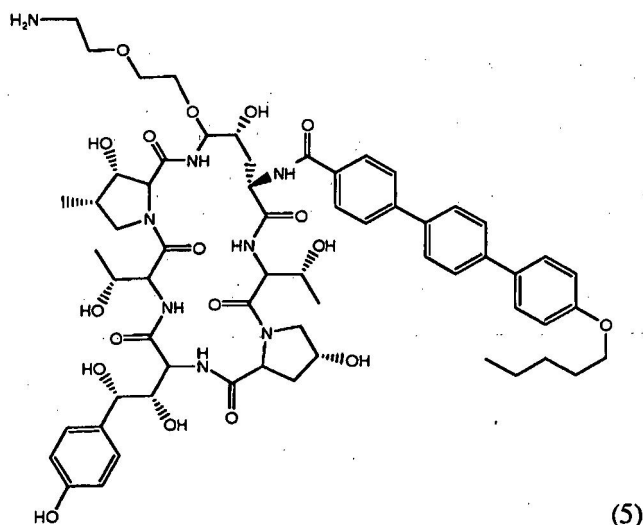
Se mezcló anidulafungina (5 mg; 0,004 mmol) con hidrocloreto de N-metil-2-aminoetanol (0,1 g; 0,9 mmol). Se añadió DMSO anhidro (0,1 ml) y la solución resultante se trató con HCl (4 M en 1,4-dioxano, 1,0 mL; 0,004 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. La reacción se diluyó después con agua y se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 3,1 mg del compuesto 3 en forma de un sólido blanco. HPLC T_R 10.98 min (98 %). LC/MS, ESI+ m/z 1197.57 [M+H]⁺.

Ejemplo 4. Síntesis del compuesto comparativo 4.



Se trató etanolamina (6,0 mL; 0,10 mmol) en DMF anhidra con HCl (4 M en 1,4-dioxano; 26,0 mL; 0,104 mmol). Se añadió anidulafungina (6,4 mg; 0,0056 mmol) para dar una solución clara que se agitó a temperatura ambiente durante 16 días. Después, la reacción se diluyó con agua y acetonitrilo y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 2,8 mg del compuesto 4 como un sólido blanco. HPLC TR 10,90 min (95%). LC/MS, ESI+ m/z 1183.55 [M+H]⁺.

Ejemplo 5. Síntesis del compuesto comparativo 5.



Se disolvió anidulafungina (20 mg; 0,018 mmol) y hidrocloreto de 2-(2-aminoetoxi) etanol (51 mg; 0,36 mmol) en DMSO anhidro (0,7 mL) y se trató con HCl (4 M en 1,4-dioxano; 4,0 mL; 0,016 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 días, después se diluyó con agua y se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con agua (0,1% TFA)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 13 mg del compuesto 5 en forma de un sólido blanco. HPLC TR 10,82 min (>99%). LC/MS, ESI+/- m/z 1227.6 [M+H]⁺, 1225.6 [M-H]⁻.

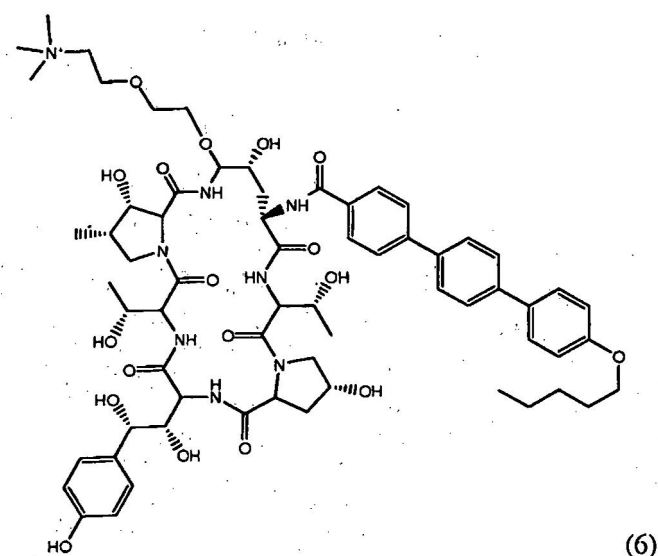
Ejemplo 6. Síntesis del compuesto comparativo 6.

5

10

15

20



25

30

Se disolvió 2-(2-amino-etoxi)-etil-hemiaminal de trifluoroacetato de anidulafungina (18 mg; 0,013 mmol) en THF seco y se concentró a sequedad a <30°C. El residuo sólido se recogió en DMSO y se trató con DIEA (9 ml, 0,052 mmol) seguido de CH₃I (2,5 mL; 0,040 mmol). La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente y después se trató con CH₃I adicional (1 mL; 0,016 mmol) y se agitó durante 2 horas más. La solución se diluyó después con agua y metanol y se purificó por HPLC RP preparativa eluyendo con agua (0,1% de TFA)/CH₃CN(TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 9 mg de compuesto 6 como un sólido blanco. HPLC T_R 10.92 min (>99%). LC/MS, ESI+/- m/z 1269.6 [M]⁺, 1267.6 [M-2H]⁻.

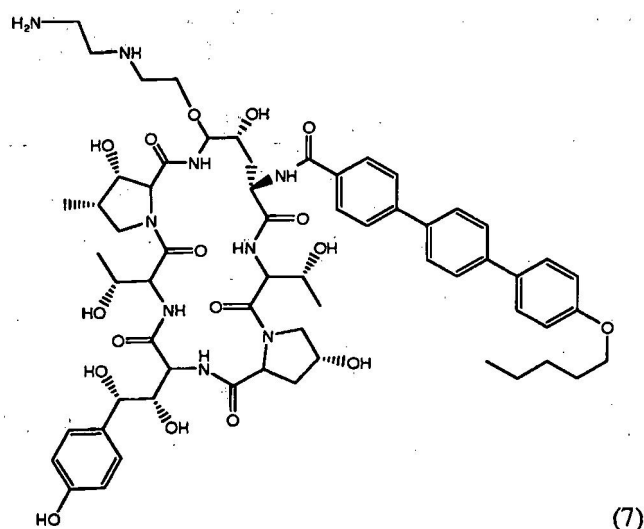
Ejemplo 7. Síntesis del compuesto comparativo 7.

35

40

45

50



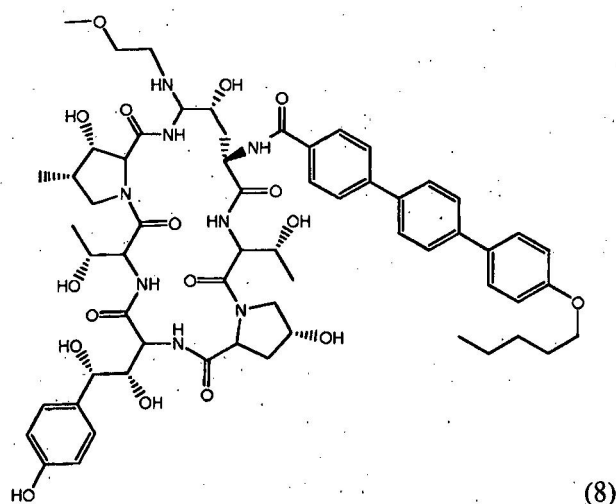
55

Se trató el 2-(2-aminoetil)-aminoetanol (139 mg; 1,33 mmol) en 0,5 ml de DMSO con HCl (4M en dioxano; 0,670 ml; 2,68 mmol) para dar una mezcla bi-fásica. Se añadió anidulafungina (35 mg; 0,031 mmol) seguido de 0,5 ml adicionales de DMSO. La mezcla se calentó a 40°C para dar una solución transparente que se calentó a 35°C durante la noche. La solución se diluyó después con agua y metanol y se purificó por HPLC RP preparativa eluyendo con agua (0,1% de TFA)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 11 mg de compuesto 7 como un sólido blanco. HPLC T_R 10.28 min (>95%). LC/MS, ESI+/- m/z 1226.6 [M]⁺, 1224.6 [M-2H]⁻.

60

Ejemplo 8. Síntesis del compuesto comparativo 8.

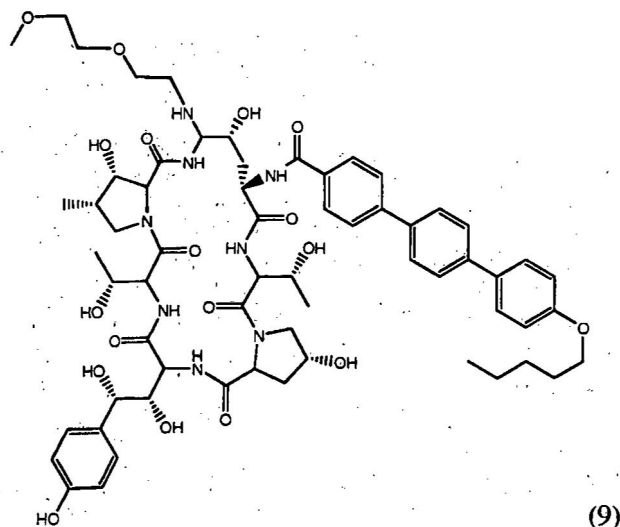
65



La anidulafungina (450 mg; 0,395 mmol) se suspendió dos veces en acetonitrilo (20 ml) y se concentró a sequedad. La muestra se recogió entonces en 20 mL de THF anhidro y se concentró hasta ~10 mL. La solución bajo atmósfera de argón se trató con ácido fenilborónico (58 mg; 0,48 mmol) seguido de tamices moleculares de 3Å activados. La mezcla se agitó lentamente durante una noche y después el sobrenadante se transfirió a un matraz seco con 2 x 5 mL de enjuagues con THF. La solución de THF se concentró hasta sequedad, el residuo sólido se suspendió en 40 mL de CH₃CN seco. La suspensión se concentró a 20 mL y bajo atmósfera de argón se enfrió a -10°C y se trató con 4 metoxitiofenol (75 mL; 0,47 mmol) seguido por TFA (2,4 ml). La mezcla resultante se agitó a -15°C durante una noche, a continuación, a -10°C, se inactivó por adición lenta de agua hasta que se desarrolló un precipitado floculante. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min y después se separó. La adición de agua al sobrenadante proporcionó un precipitado adicional. Los precipitados se secaron a vacío, luego se combinaron y se trituraron con Et₂O. Los sólidos se separaron y trituraron una segunda vez con Et₂O. Los sólidos aislados se secaron entonces a vacío durante la noche para dar 393 mg de anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi) feniltioéter en forma de un polvo blanco. HPLC TR 13,3 min (88%). LC/MS, ESI+/- m/z 1187.60 [M+H]⁺, 1185.58 [M-H]⁻.

Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi) feniltioéter (21 mg; 0,017 mmol) en 0,1 mL de 1-metil-2-aminoetanol para dar una solución transparente que se tapó bajo argón y se calentó a 60°C durante 3 horas y después se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con metanol, se acidificó mediante adición de TFA, se diluyó adicionalmente con agua y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 22 mg del compuesto 8 en forma de un sólido blanco. HPLC TR 11,15 min (84%). LC/MS, ESI+/- m/z 1197.57 [M+H]⁺, 1219.55 [M+Na]⁺, 1195.56 [M-H]⁻.

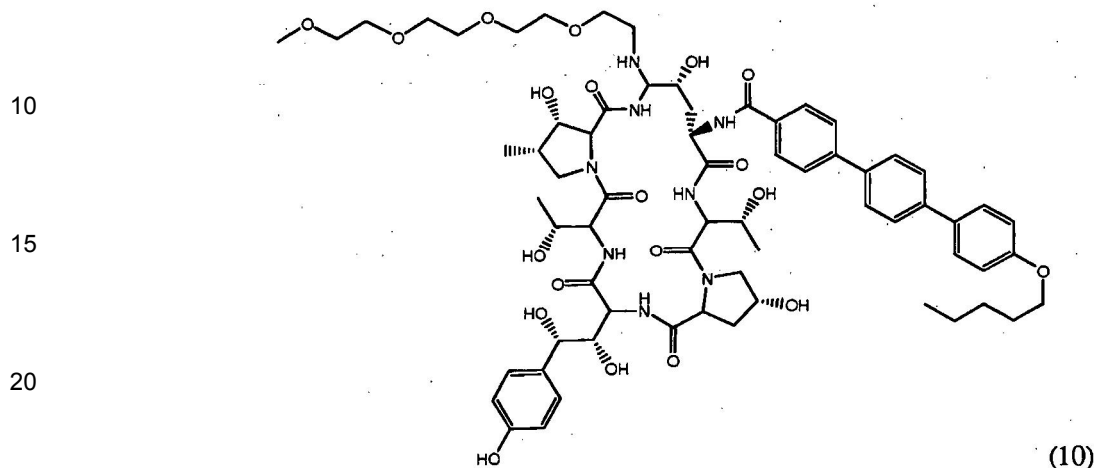
Ejemplo 9. Síntesis del compuesto comparativo 9.



Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter (20 mg; 0,016 mmol) en 0,1 ml de 1-metil-2-(2-aminoetoxi) etanol para dar una solución transparente que se tapó bajo argón y se calentó a 60°C durante 8 horas y luego se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se diluyó con metanol y agua, se

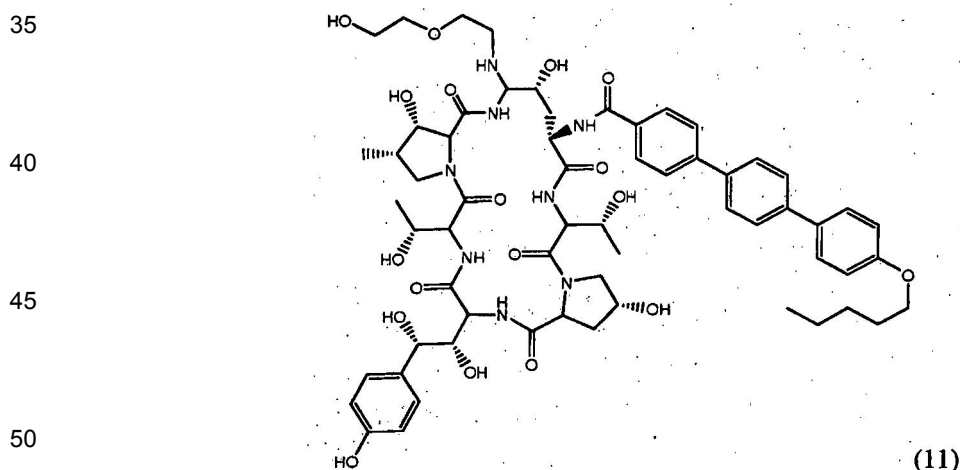
acidificó mediante adición de TFA, se diluyó adicionalmente con agua y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 15 mg del compuesto 9 en forma de un sólido blanco. HPLC T_R 11,18 min (86%). LC/MS, ESI+/- m/z 1241.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1239.59 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

5 Ejemplo 10. Síntesis del compuesto comparativo 10.



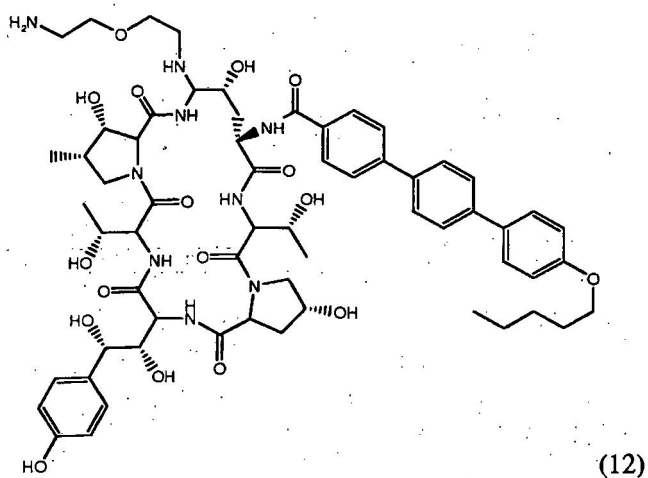
Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi) feniltioéter (21 mg; 0,017 mmol) en 0,1 ml de mPEG4-NH₂ para dar una solución transparente que se tapó bajo argón y se calentó a 50°C durante la noche y a continuación a 65°C durante 2 h. La reacción se diluyó con metanol y agua, se acidificó mediante adición de TFA, se diluyó adicionalmente con agua y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 13 mg del compuesto 10 en forma de un sólido blanco. HPLC T_R 11.26 min (88%). LC/MS, ESI+/- m/z 1329.65 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1351.63 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1327.64 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Ejemplo 11. Síntesis del compuesto comparativo 11.



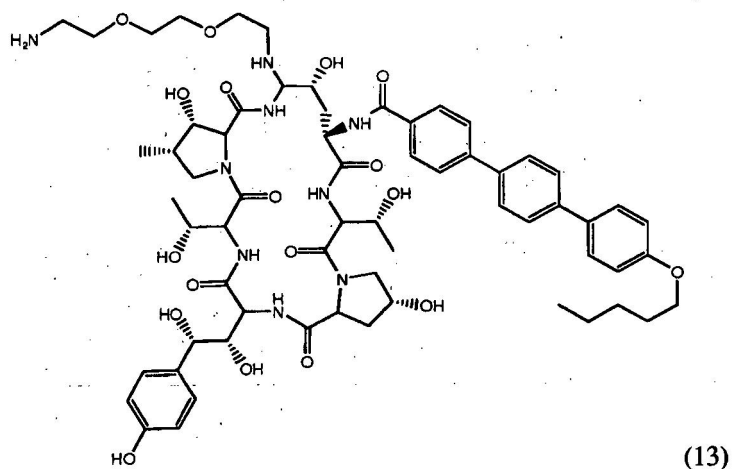
Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter (20 mg; 0,016 mmol) en 0,3 ml de 2-(2-aminoetoxi) etanol para dar una solución transparente que se tapó bajo argón y se agitó a temperatura ambiente durante una noche y luego se calentó a 60°C durante 1 h. La reacción se diluyó con metanol y agua, se acidificó mediante adición de TFA, se diluyó adicionalmente con agua y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 15 mg del compuesto 11 en forma de un sólido blanco. HPLC T_R 10.83 min (94%). LC/MS, ESI+/- m/z 1227.58 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1225.57 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Ejemplo 12. Síntesis del compuesto comparativo 12.



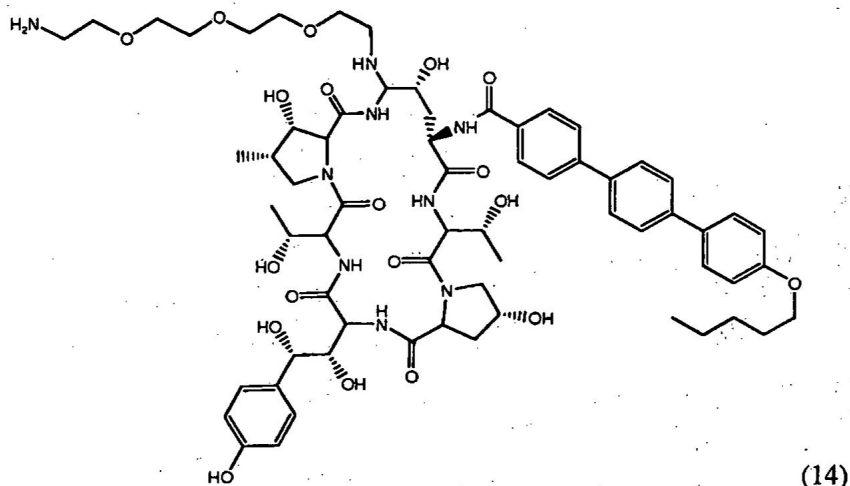
Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi) feniltioéter (19 mg, 0,015 mmol) en 0,1 mL de 2-(2-aminoetoxi)-etilamina para dar una solución transparente que se tapó bajo argón y se calentó a 60°C durante 1,5 h. La reacción se diluyó con metanol y agua, se acidificó mediante adición de TFA, se diluyó adicionalmente con agua y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 11 mg de compuesto 12 en forma de un sólido blanco. HPLC T_R 10.06 min (94%). LC/MS, ESI+/- m/z 1226.60 [M+H]⁺, 1225.59 [M-H]⁻.

Ejemplo 13. Síntesis del compuesto comparativo 13.



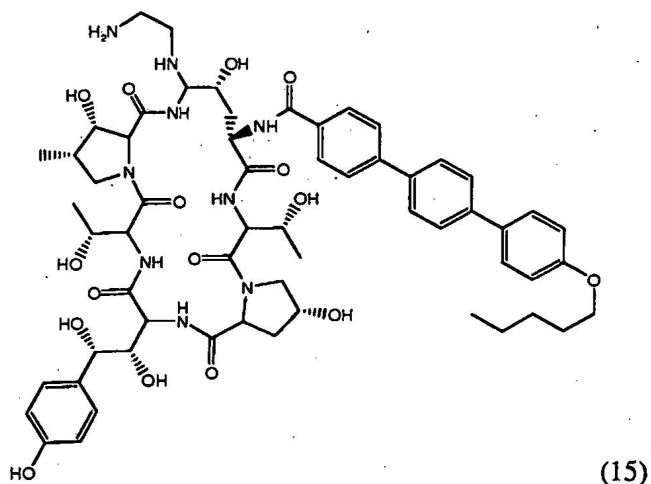
Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter (20 mg; 0,016 mmol) en 0,1 ml de diamina para dar una solución transparente, que se tapó bajo argón y se calentó a 60°C durante 1,5 horas y después se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con metanol y agua, se acidificó mediante adición de TFA, se diluyó adicionalmente con agua y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 11 mg del compuesto 13 como un sólido blanco. HPLC, T_R 10.06 min (92%). LC/MS, ESI+/- m/z 1270.62 [M+H]⁺, 1268.61 [M-H]⁻.

Ejemplo 14. Síntesis del compuesto comparativo 14.



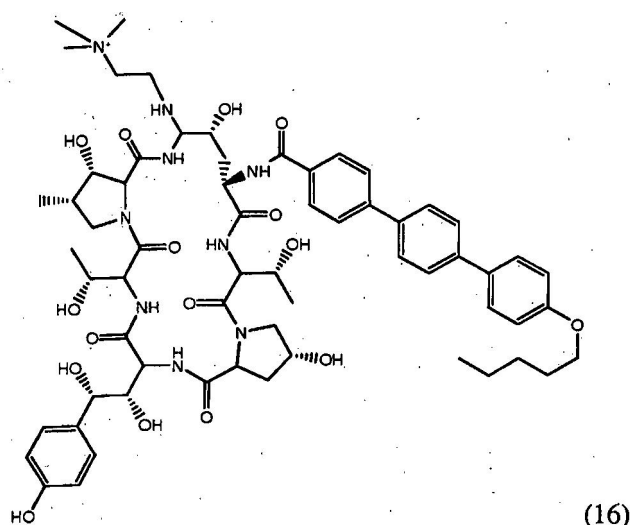
Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter (21 mg; 0,017 mmol) en 0,1 ml de mono-BOC-NH-PEG₄-NH₂ para dar una solución transparente que se tapó bajo argón y se calentó a 50°C hasta que el producto: la proporción de material de partida era ~1:1. La reacción se trató con TFA (4 ml), se agitó a temperatura ambiente durante ~30 min, se concentró a vacío, luego se diluyó con agua y se purificó por HPLC RP preparativa eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 5 mg del compuesto 14 como un sólido blanco. HPLC T_R 10.13 min (76%). LC/MS, ESI⁺ m/z 1314.65 [M+H]⁺, 1312.64 [M-H]⁻.

Ejemplo 15. Síntesis del compuesto comparativo 15.



Se trató anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter (49 mg, 0,039 mmol) en 0,5 ml de CH₃CN a 0°C con 0,3 ml de etilendiamina para dar una solución clara que se dejó llegar a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h. La solución se diluyó con 0,5 ml de metanol y 2 ml de agua y se acidificó con TFA. La disolución se diluyó adicionalmente con 2 ml de metanol y agua cada vez, se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 30 mg del compuesto 15 en forma de un sólido blanco. HPLC T_R 10,13 min (88%). CL / EM, ESI⁺ m/z 1182,57 [M + H]⁺, 1180,56 [M - H]⁻.

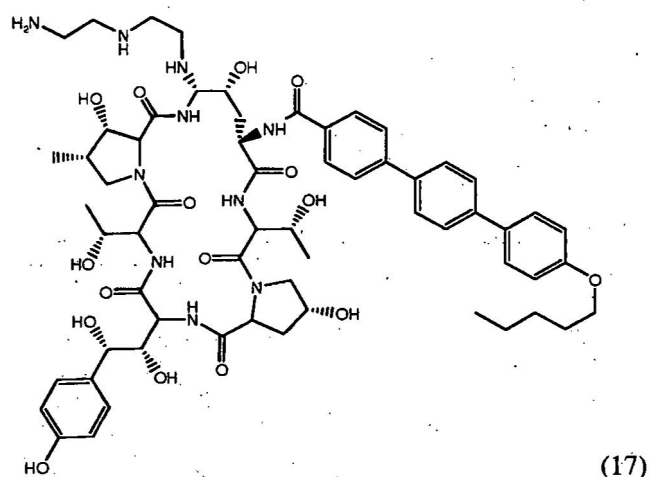
Ejemplo 16. Síntesis del compuesto comparativo 16.



N, N-dimetilaminoetil anidulafungina amina: se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter (150 mg; 0,119 mmol) en 0,5 ml de N, N-dimetiletilendiamina para dar una solución de color amarillo claro que se calentó a 45°C durante 18 horas. La reacción se diluyó con 80 ml de Et₂O para precipitar el producto. Los sólidos recogidos se trituraron con Et₂O, luego se separaron y se secaron al vacío durante la noche para dar 153 mg de N, N-dimetilaminoetil anidulafungina amina como un sólido blanquecino. HPLC T_R 10.37 min (76%). LC/MS, ESI⁺/m/z 1210.60 [M+H]⁺, 1208.60 [M-H]⁻.

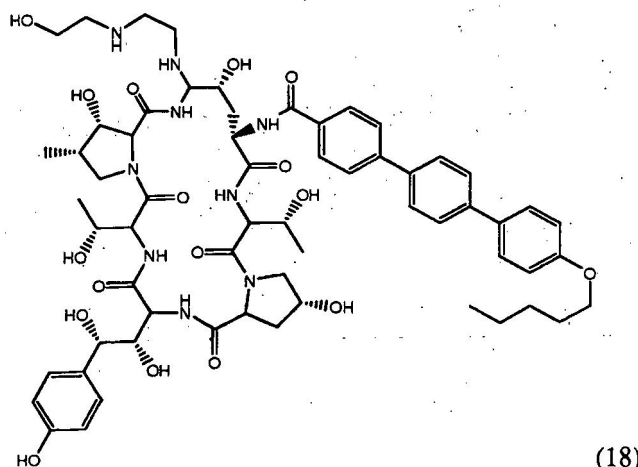
N, N-dimetilaminoetil anidulafungina amina (153 mg, ≤ 0,119 mmol) en DMSO anhidro se trató con CH₃I (8 ml, 0,129 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se trató con CH₃I adicional (3 ml, 0,048 mmol) y DIEA (7 ml, 0,040 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas más. La reacción se acidificó con ~5 ml de TFA, se diluyó con agua y metanol, y se purificó por HPLC RP preparativa eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 64 mg del compuesto 16 como un sólido blanco. HPLC T_R 10.36 min (92%). LC/MS, ESI⁺/m/z 1224.61 [M]⁺, 1222.61 [M-2H]⁻, 1268.61 [M+formate]⁻.

Ejemplo 17. Síntesis del compuesto comparativo 17.



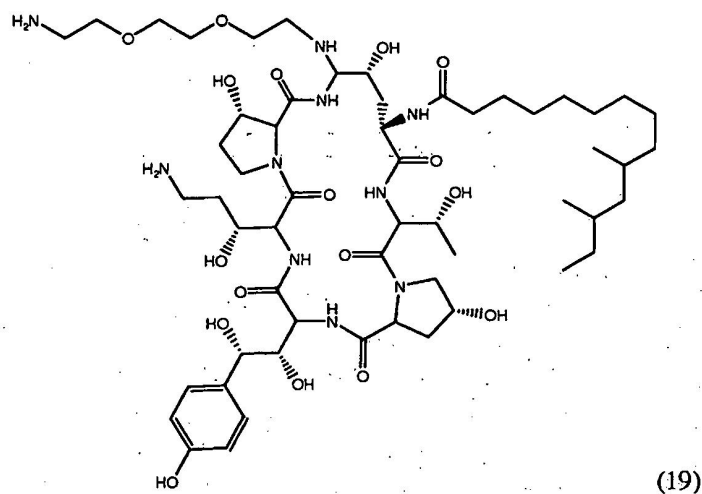
Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter (0,82 mg, 0,065 mmol) en 0,3 ml de dietilenriamina para dar una solución transparente que se tapó bajo argón y se calentó a 60°C durante 45 min. La solución enfriada se diluyó con éter dietílico para precipitar los productos y se eliminó el sobrenadante. Los sólidos se concentraron a vacío y luego se recogieron en 1 ml de metanol y 1 ml de agua y se acidificaron con TFA. La solución resultante se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 44 mg del compuesto 17 como un sólido blanco. HPLC T_R 9.77 min (84%). LC/MS, ESI⁺/m/z 1225.61 [M+H]⁺, 1223.61 [M-H]⁻.

Ejemplo 18. Síntesis del compuesto comparativo 18.



Se disolvió anidulafungina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter (19 mg; 0,015 mmol) en 0,3 ml de N- (2-aminoetil)-2-aminoetanol para dar una solución transparente que se tapó bajo argón y se agitó a temperatura ambiente durante la noche se calentó a 60° C durante 1,5 h. La reacción se diluyó con metanol y agua, se acidificó mediante adición de TFA, se diluyó adicionalmente con agua y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 10 mg del compuesto 18 como un sólido blanco. HPLC T_R 10.09 min (90%). LC/MS, ESI+/-m/z 1226.60 [M+H]⁺, 1225.59 [M-H]⁻.

Ejemplo 19. Síntesis del compuesto comparativo 19.



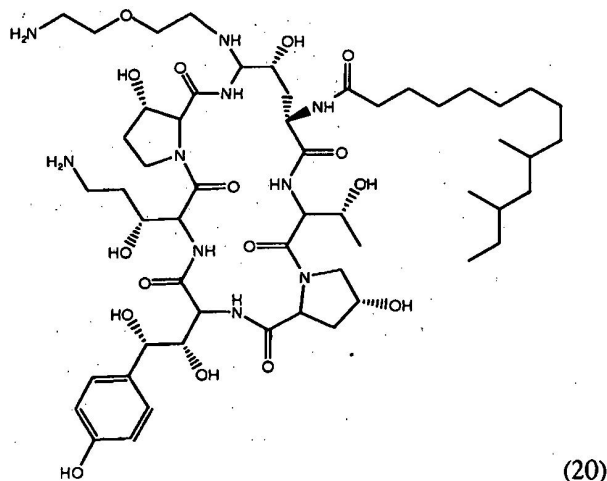
Pneumocandina B₀ hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter: Se suspendió dos veces la neumocandina B₀ (509 mg, 0,48 mmol) en CH₃CN (25 ml) y se concentró a vacío a temperatura ambiente para eliminar el agua. La muestra se suspendió entonces en THF anhidro (25 mL) y se concentró hasta sequedad. El residuo se recogió en THF anhidro (25 mL) y se concentró a temperatura ambiente hasta 10 mL. La suspensión resultante se trató con ácido fenilborónico (69 mg, 0,57 mmol) y se agitó a temperatura ambiente hasta que todo el sólido se disolvió para dar una solución ligeramente turbia. La solución se concentró a sequedad y el sólido restante se suspendió en CH₃CN (25 mL). La suspensión resultante se concentró hasta ~10 ml, se enfrió a -10°C bajo argón seco y se trató con 4-metoxitiofenol (72 mL) seguido de ácido trifluoroacético (1,4 mL) añadido gota a gota. La mezcla se agitó bajo atmósfera de argón a -15°C hasta -20°C durante 2 días, luego se llevó a 0°C y se trató con 25 mL de agua añadida gota a gota para dar una suspensión blanca que se agitó a 0°C durante 20 minutos y después se separó. Los sólidos se trituraron y resuspendieron en 20 mL de CH₃CN/H₂O al 25%, luego se separaron y se secaron al vacío. El sólido resultante se trituró con éter dietílico. El sobrenadante se retiró y los sólidos se secaron a vacío para dar 430 mg del compuesto del título en forma de un polvo blanco denso. 89% de pureza por HPLC, UV det. at 216-224 nm; LC/MS ESI +/- m/z 1187.59 [M+H]⁺ (calculado 1187.59), 1185.58 [M-H]⁻ (calculado 1185.58), 1045.55 [M-MeOPhSH]⁻ (calculado 1045.55).

Pneumocandina B₀ hemiaminal- (4-metoxi) feniltioéter amina: Se suspendieron 53 mg (0,45 mmol) de hemolinina B₀ hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter en suspensión en THF anhidro (15 mL) con ácido fenilborónico (67 mg, 0,55 mmol) seguido de tamices moleculares de 3 Å (~15 gotas). La mezcla bajo argón se agitó a temperatura

ambiente durante la noche para dar una solución clara que se concentró a ~7 ml bajo corriente de argón seco ventilado en un matraz. La solución se transfirió entonces a una matraz seca seguido de enjuagues con 2 THF de los tamices moleculares para dar un volumen de reacción de ~10 mL. La solución bajo argón se enfrió a 0°C, se trató con BH₃-DMS (2,0 M en THF, 1,4 ml, 2,8 mmol) y se agitó a 0°C. Después de 2 h, se añadió THF anhidro (2 mL) para disolver el gel que se había formado. Esto fue seguido por BH₃-DMS adicional (0,5 ml, 1,0 mmol). La mezcla se mantuvo a 0°C durante 1 hora más, a continuación se agitó a temperatura ambiente durante ~3 h, luego se enfrió a 0°C y se inactivó por adición lenta de HCl 1M (1,3 ml). La reacción apagada se almacenó a -20°C durante la noche y después se concentró hasta ~3 ml. La mezcla resultante se diluyó con metanol y agua (~ 1: 1) a 20 ml y luego se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con CH₃CN/H₂O al 10% al 70% (TFA al 0,1%). Se combinaron las fracciones de interés y se liofilizaron para dar 245 mg (42% de TY) del compuesto del título en forma de un sólido blanco brillante. 94% de pureza por HPLC, UV det. a 216 - 224 nm; HPLC, UV det. at 216-224 nm; LC/MS ESI +/- m/z 1173.61 [M+H]⁺ (calculado 1173,61), 1031,57 [M-MeOPhSH] - (calculado 1031,57).

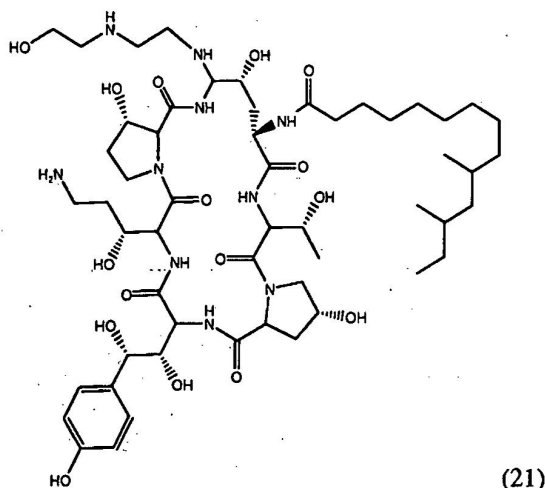
Se disolvió Pneumocandina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter amina (20 mg, 0,016 mmol) en 2,2'-(etilendioxi) bis(etilamina) (0,1 ml). La solución se calentó a 40°C durante la noche y luego a 60°C durante 1,5 horas y después se diluyó con metanol (0,5 ml) y agua (2 ml) y se acidificó con TFA. La mezcla acidificada se diluyó adicionalmente con agua y metanol y luego se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 15 mg del compuesto 19 como un sólido blanco. HPLC T_R 9.22 min (99%). LC/MS, ESI+/-m/z 1181.70 [M+H]⁺, 1179.70 [M-H]⁻.

Ejemplo 20. Síntesis del compuesto comparativo 20.



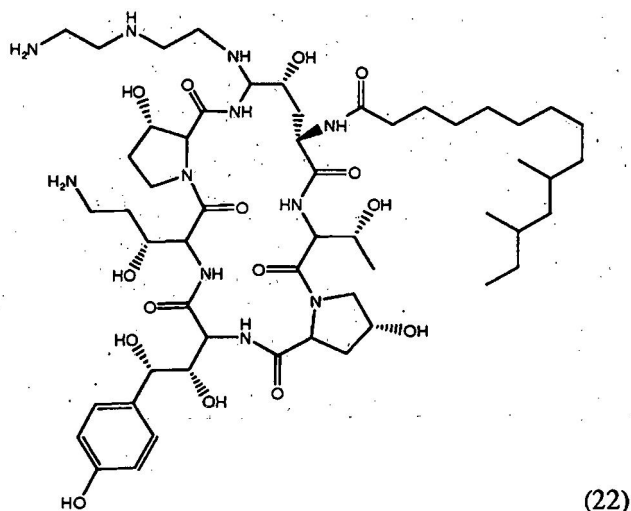
Se disolvió Pneumocandina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter amina (17 mg, 0,013 mmol) en 2,2'-oxobis(etilamina) (0,1 ml). La solución se calentó a 40°C durante la noche y después se diluyó con metanol (0,5 mL) y agua (2 mL) y se acidificó con TFA. La mezcla acidificada se diluyó adicionalmente con agua y metanol y después se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 12 mg del compuesto 20 como un sólido blanco. HPLC T_R 9.22 min (96.0%). LC/MS, ESI+/- m/z 1137.68 [M+H]⁺, 1135.67 [M-H]⁻.

Ejemplo 21. Síntesis del compuesto comparativo 21.



Se disolvió Pneumocandina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter amina (19 mg, 0,015 mmol) en 2- (aminoetilamino) etanol (0,1 ml). La solución se calentó a 60°C durante 2 horas y después se diluyó con metanol (0,5 ml) y agua (2 ml) y se acidificó con TFA. La mezcla acidificada se diluyó adicionalmente con agua y metanol y después se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 11 mg del compuesto 21 como un sólido blanco. HPLC T_R 9.34 min (97.7%). LC/MS, ESI+/- m/z 1137.68 [M+H]⁺, 1135.67 [M-H]⁻.

Ejemplo 22. Síntesis del compuesto comparativo 22.



Se disolvió Pneumocandina hemiaminal-(4-metoxi)feniltioéter amina (19 mg, 0,015 mmol) en 2-(aminoetilamino) etanol (0,1 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se calentó a 60°C durante 15 min, se diluyó con metanol (0,5 mL) y agua (2 mL), y se acidificó con TFA. La mezcla acidificada se diluyó adicionalmente con agua y metanol y luego se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 13 mg del compuesto 22 como un sólido blanco.

Ejemplo 23. Actividad in vivo después de la administración de IP.

El objetivo de estos estudios fue evaluar la eficacia de los compuestos de ensayo en el modelo de infección por candidiasis murina. Las cantidades de artículos de ensayo no están corregidas.

Preparación del Inóculo

La cepa, *C. albicans* R303 se transfirió de almacenamiento congelado sobre placas de agar de dextrosa Sabauroud (SDA) y se cultivó durante ~24hr a 35°C. El inóculo se preparó transfiriendo colonias de la placa a solución salina tamponada con fosfato (PBS) y la concentración se ajustó a aproximadamente 10⁶ CFU/mL con la ayuda de un espectrofotómetro. El stock se diluyó 1:9 para preparar el inóculo. Antes de cada ensayo, se verificó la concentración utilizando el método de recuento de placas de dilución.

Se utilizaron ratones CD-1 femeninos en este estudio. Los animales tenían aproximadamente siete semanas de edad al comienzo del estudio y pesaban aproximadamente 15-30 g.

Los ratones se hicieron neutropénicos con inyecciones de IP de ciclofosfamida (150 mg/kg en 10 mL/kg) a los 4 y 1 día antes de la inoculación. Cada animal se inoculó con la concentración apropiada inyectando 0,1 mL de inóculo en una vena de la cola. Los compuestos de ensayo se administraron IP a las 2 h después de la infección.

En un procedimiento típico, se recogieron los riñones de cuatro ratones en el grupo de control 1 (sin tratar) a las 2 horas después de la infección, y de otros cuatro ratones en el grupo de control 2 (sin tratar) a las 24 horas después de la infección. Los riñones se retiraron asépticamente de cada ratón y se combinaron en un tubo estéril. Se añadió una alícuota (2 mL) de PBS estéril a cada tubo y se homogeneizó el contenido con un homogeneizador de tejidos (Polytron 3100). Se llevaron a cabo diluciones en serie de los homogeneizados de tejido y se distribuyeron alícuotas de 0,1 mL en placas SDA y las placas se incubaron a 35°C durante la noche. Los UFC/riñones se determinaron a partir de los recuentos de colonias. Los datos se analizaron usando ANOVA unidireccional con la Prueba de Comparaciones Múltiples Tukey-Kramer o Prueba Dunnett (GraphPad InStat versión 3.06, Software GraphPad, San Diego, CA).

Los datos que se indican a continuación son el promedio de cuatro ratones. Cada ejecución incluyó un

control separado y cada uno se tabula por separado.

Primer intento

5

Tabla 1

Tratamiento (administración IP, mg/kg)	Promedio log ₁₀ CFU/kidneys (6SD)	Diferencia del control de 24 horas
Control Infectado - 2 h	3.27 6 0.12	
Control Infectado - 24 h	5.20 6 0.22	
anidulafungina - 1 mg/kg	3.37 6 0.72	-1.83 ***
compuesto 1 - 5 mg/kg	0.40 6 0.80	-4.80 ***
compuesto 2 - 5 mg/kg	1.60 6 0.35	-3.60 ***
compuesto 3 - 5 mg/kg	1.57 6 0.20	-3.63 ***
compuesto 4 - 5 mg/kg	0.73 6 0.85	-4.47 ***
ns, diferencia no significativa; ***, significativo a P <0,001.		

25

Segundo Intento

Tabla 2

Tratamiento (administración IP, mg/kg)	Promedio log ₁₀ CFU/kidneys (6SD)	Diferencia del control de 24 horas
Control Infectado - 2 h	2.92 6 0.07	
Control Infectado - 24 h	4.87 6 0.10	
anidulafungina – 0.5 mg/kg	4.41 6 0.12	-0.47 ns
anidulafungina – 1.5 mg/kg	2.77 6 0.20	-2.11 ***
anidulafungina – 4.5 mg/kg	1.10 6 0.38	-3.78 ***
compuesto 1 - 0.5 mg/kg	2.80 6 0.11	-2.08 ***
compuesto 1 - 1.5 mg/kg	1.83 6 0.14	-3.05 ***
compuesto 1 - 4.5 mg/kg	0.98 6 0.33	-3.90 ***
compuesto 4 - 0.5 mg/kg	3.38 6 0.10	-1.50 ***
Compuesto 4 - 1.5 mg/kg	0.65 6 0.38	-4.22 ***
Compuesto 4 - 4.5 mg/kg	0.65 6 0.38	-4.22 ***
Compuesto 5 - 0.5 mg/kg	3.65 6 0.10	-1.22 ns
compuesto 5 - 1.5 mg/kg	0.73 6 0.42	-4.15 ***
Compuesto 5 - 4.5 mg/kg	0.00 6 0.00	-4.87 ***
Compuesto 15 - 0.5 mg/kg	1.25 6 0.45	-3.63 ***
Compuesto 15 - 1.5 mg/kg	0.96 6 0.57	-3.91 ***
Compuesto 15 - 4.5 mg/kg	0.73 6 0.42	-4.15 ***
Compuesto 6 - 0.5 mg/kg	4.75 6 0.19	-0.13 ns

65

(continuación)

Tratamiento (administración IP, mg/kg)	Promedio log ₁₀ CFU/riñones (6SEM)	Diferencia del control de 24 horas
Compuesto 6 - 1.5 mg/kg	1.60 6 0.17	-3.27 ***
Compuesto 6 - 4.5 mg/kg	0.00 6 0.00	-4.87 ***
ns, diferencia no significativa; **, significativo a P <0,01. ***, significativo a P <0,001.		

Tercer Intento

Tabla 3

Tratamiento (administración IP, mg/kg)	Promedio log ₁₀ CFU/riñones (6SEM)	Diferencia del control de 24 horas
Control Infectado - 2 h	2.89 6 0.07	
Control Infectado - 24 h	5.20 6 0.07	
Caspofungina - 0.5 mg/kg	0.33 6 0.33	-4.88 ***
Caspofungina - 1.5 mg/kg	0.73 6 0.42	-4.48 ***
Caspofungina - 4.5 mg/kg	0.00 6 0.00	-5.20 ***
compuesto 19 - 0.5 mg/kg	3.01 6 0.07	-2.19 ***
compuesto 19 - 1.5 mg/kg	1.74 6 0.18	-3.47 ***
compuesto 19 - 4.5 mg/kg	1.17 6 0.40	-4.03 ***
compuesto 20 - 0.5 mg/kg	1.96 6 0.18	-3.25 ***
compuesto 20 - 1.5 mg/kg	0.73 6 0.42	-4.48 ***
compuesto 20 - 4.5 mg/kg	1.45 6 0.09	-3.75 ***
compuesto 21 - 0.5 mg/kg	1.57 6 0.16	-3.63 ***
compuesto 21 - 1.5 mg/kg	0.73 6 0.42	-4.48 ***
compuesto 21 - 4.5 mg/kg	1.17 6 0.40	-4.03 ***
compuesto 22 - 0.5 mg/kg	1.65 6 0.16	-3.56 ***
compuesto 22 - 1.5 mg/kg	0.00 6 0.00	-5.20 ***
compuesto 22 - 4.5 mg/kg	0.65 6 0.38	-4.55 ***
ns, diferencia no significativa; ***, significativo a P <0,001.		

Cuarto Intento

Tabla 4

Tratamiento (administración IP, mg/kg)	Dosis (mg/kg)	Promedio log ₁₀ CFU/riñones (6SEM)	Diferencia del control de 24 horas
Control Infectado - 2 h		2.95 6 0.07	
Control Infectado - 24 h	-	5.10 6 0.17	
anidulafungina	0.5	3.81 6 0.19	-1.29 **
anidulafungina	1.5	1.08 6 0.08	-4.03 **
Compuesto 15	0.5	2.09 6 0.16	-3.01 **
Compuesto 15	1.5	1.29 6 0.18	-3.81 **
Compuesto 7	0.5	4.33 6 0.17	-0.78 *
Compuesto 7	1.5	1.55 6 0.19	-3.55 **
Compuesto 17	0.5	3.46 6 0.06	-1.64 **
Compuesto 17	1.5	1.19 6 0.12	-3.91 **
Compuesto 8	0.5	4.78 6 0.15	-0.32 ns
Compuesto 8	1.5	3.45 6 0.37	-1.66 **
Compuesto 9	0.5	5.04 6 0.13	-0.07 ns
Compuesto 9	1.5	4.09 6 0.23	-1.02 **
Compuesto 10	0.5	4.89 6 0.06	-0.21 ns
Compuesto 10	1.5	5.09 6 0.11	-0.01 ns
Compuesto 11	0.5	4.82 6 0.20	-0.29 ns
Compuesto 11	1.5	2.98 6 0.03	-2.13 **
Compuesto 18	0.5	2.54 6 0.17	-2.56 **
Compuesto 18	1.5	1.15 6 0.09	-3.95 **
Compuesto 12	0.5	3.20 6 0.11	-1.90 **
Compuesto 12	1.5	1.60 6 0.09	-3.50 **
Compuesto 13	0.5	2.81 6 0.23	-2.29 **
Compuesto 13	1.5	2.31 6 0.19	-2.80 **
Compuesto 14	0.5	4.74 6 0.17	-0.37 ns
Compuesto 14	1.5	4.80 6 0.34	-0.31 ns
ns, diferencia no significativa; *, significativo a P <0,05. **, significativo a P <0,01.			

Quinto Intento

Tabla 5

Tratamiento (administración IP, mg/kg)	Dosis (mg/kg)	Promedio log ₁₀ CFU/riñones (6SEM)	Diferencia del control de 24 horas
Control Infectado - 2 h		2.98 6 0.06	
Control Infectado - 24 h	-	5.13 6 0.15	
anidulafungina	1	3.06 6 0.18	-2.07**
Compuesto 1	0.5	3.67 6 0.07	-1.47**
Compuesto 1	1.5	1.56 6 0.15	-3.58**
Compuesto 1	4.5	0.33 6 0.33	-4.81**
Compuesto 16	0.5	1.91 6 0.34	-3.22**
Compuesto 16	1.5	1.39 6 0.16	-3.74**
Compuesto 16	4.5	1.05 6 0.36	-4.08**
*, significativo a P <0,05. **, significativo a P <0,01.			

Conclusiones

Este modelo de ratón se usó como una herramienta de selección primaria para probar la eficacia de los compuestos de la invención. Los ratones se hicieron neutropénicos para asegurar que los resultados observados son atribuibles al artículo de ensayo y no al sistema inmune de los ratones inoculados con albicans C., un organismo conocido por acumularse e infectar los riñones.

Los riñones se cosecharon a partir de ratones de control infectados pero no tratados a las 2 horas y 24 horas después de la infección. A continuación se evaluaron los riñones en cuanto a la carga fúngica, medida en el número de unidades formadoras de colonias (UFC, registradas en una escala logarítmica). Como era de esperar, los ratones no tratados mostraron un aumento en la carga fúngica de 2 horas a 24 horas después de la inoculación con albicans C..

Los ratones infectados que recibieron uno de los artículos sometidos a ensayo tuvieron sus riñones eliminados y evaluados después de 24 horas, revelando niveles variables de carga fúngica que variaban con el artículo de ensayo. Cuanto menor es la CFU, más eficaz es el compuesto para tratar la infección fúngica en los riñones.

Los compuestos que mejor se comportan son los que tienen la mejor combinación de las siguientes propiedades: (i) la actividad (es decir, un compuesto inactivo no puede reducir la carga fúngica), (ii) la penetración del tejido (es decir, un compuesto que no entra en los riñones no curaría la infección allí), y (iii) la vida media (por ejemplo, un compuesto con una vida media corta podría no mostrar la eficacia a las 24 horas).

Basándose en estos estudios, se concluye que (a) los compuestos 8, 9, 10 y 14 se comportaron deficientemente (es decir, no tenían la combinación correcta de propiedades útiles para tratar infecciones de albicans C. en este ensayo); (b) los compuestos 2, 3, 11 y 13 se realizaron moderadamente, demostrando cierta capacidad para controlar la infección por albicans C.; y c) los compuestos 1, 4, 5, 6, 7, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22 se realizaron fuertemente, reduciendo drásticamente el nivel de CFB de albicans C. encontrado en los riñones de los ratones.

Ejemplo 24. Farmacocinética en perros beagle.

Los artículos de ensayo se administraron a perros beagle que pesaban aproximadamente 6-10 kg. Cada artículo de ensayo se dosificó a 1,4 mg/kg en solución salina acuosa (con o sin Tween al 0,5%) durante un periodo de 1-10 minutos. La difenhidramina se mantuvo a mano en caso de que los perros demostraran una respuesta de histamina. Los perros fueron ayunados al menos 12 horas antes de cada dosificación y se les ofreció comida después de que se tomó la muestra de sangre de 4 horas; se les retuvo el agua durante 1 hora antes y 4 horas después de cada evento de dosificación. La dosis para cada animal se basó en su peso corporal más reciente. El

artículo de ensayo se inyectó intravenosamente a través de un catéter colocado en la vena cefálica como un bolo lento.

Se recogió sangre a través de la vena yugular. Todas las muestras de sangre (~1 mL cada una) se recogieron en tubos K3EDTA. Después de la recogida de sangre, las muestras se invirtieron inmediatamente varias veces y se mantuvieron en hielo húmedo hasta que se centrifugaron. Las muestras fueron centrifugadas dentro de ~30 minutos de la recolección bajo refrigeración (~5°C durante ~10 minutos a ~2000 g) para obtener plasma. El plasma se congeló inmediatamente sobre hielo seco después de la separación. Las muestras de plasma se almacenaron a aproximadamente -70°C hasta su análisis.

Se precipitó plasma (100 mL) con 400 mL de ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo que contenía el patrón interno (100 ng/mL de neumocandina). Las muestras se taparon y agitaron con vórtex durante aproximadamente 30 segundos, seguido por centrifugación a 14.000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de la centrifugación, se transfirieron 200 mL de sobrenadante a viales de inyección automática de plástico que contenían 200 mL de ácido fórmico al 0,1% en agua y se sometieron a vórtice. Las muestras se analizaron entonces mediante LCMSMS.

Todos los cálculos farmacocinéticos se realizaron utilizando WinNonlin versión 4.1 (Pharsight Corp) por análisis no compartimental. Los resultados se proporcionan en la Tabla 6, a continuación.

Tabla 6. Valores¹ PK

Compuesto	T © (hr)	Vz, (mL/Kg)	Cl (mL/hr/kg)
anidulafungina	11.52 6 0.75	779 6 30.4	47.1 6 1.92
Compuesto 18	21.03 6 1.16	687 6 58.4	22.6 6 1.08
Compuesto 16	27.6 6 1.11	874 6 63.9	21.9 6 0.84
Compuesto 5	33.66 6 3.28	627 6 13.9	13.1 6 0.94
Compuesto 1	53.1 6 3.93	1360 6 61.9	18.06 6 1.46
1. Todos los valores son la media 6 SEM; n = 4 perros beagle			

La semivida observada de la anidulafungina fue de aproximadamente 12 horas, lo cual es consistente con los valores previamente informados.

Se encontró que el Compuesto 1 tenía un volumen de distribución sorprendentemente grande y una semivida circulante sorprendentemente larga. Estas propiedades farmacocinéticas pueden proporcionar ventajas tales como una disminución de la cantidad de dosificación, una disminución de la frecuencia de dosificación y/o una eficacia mejorada en el tratamiento/prevenición de algunas infecciones fúngicas.

El gran volumen de distribución observado para el compuesto 1 es consistente con la distribución de este compuesto en ciertos tejidos, tales como riñón, hígado, pulmón y/o bazo. El gran volumen de distribución observado para el compuesto 1 puede tener significado clínico para el uso de este compuesto en el tratamiento de infecciones localizadas en estos tejidos.

Ejemplo 25. Actividad in vitro: valores de MEC y MIC frente a *Aspergillus* spp.

Se obtuvieron los valores MEC y MIC (mg/mL) de anidulafungina, caspofungina, anfotericina B, compuesto 1 y compuesto 16 contra diversas especies de *Aspergillus* en presencia y ausencia de suero humano al 50% como sigue.

Los organismos de ensayo se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Los aislamientos se mantuvieron a -80°C, luego se descongelaron y subcultivaron antes de la prueba.

El método de ensayo de MIC siguió el procedimiento descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (ver Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)). Método de Referencia para la Dilución de Caldo Prueba de Susceptibilidad Antifúngica de Levaduras; Norma aprobada, tercera edición. Documento CLSI M27-A3 [ISBN 1-56238-666-2]. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvania 19087-1898 USA, 2008; y el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Método de Referencia para la Dilución de Caldo Prueba de Susceptibilidad Antifúngica de Hongos Filamentosos; Norma aprobada, segunda edición. Documento CLSI M38-A2 [ISBN 1-56238-668-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvania 19087-1898 USA, 2008) y emplearon

manipuladores de líquidos automatizados para llevar a cabo diluciones en serie y transferencias de líquidos. Los pocillos en las columnas 1-12 en placas de microdilución estándar de 96 pocillos se llenaron con 150 mL de DMSO. Estas se convertirían en las "placas madre" de las que se prepararía la "hija" o las placas de prueba. Los fármacos (150 mL a 80x la concentración superior deseada en las placas de ensayo) se dispensaron en el pocillo apropiado en la columna 1 de las placas madre y se mezclaron. Se hicieron diluciones en serie 1:1 a través de la Columna 11 en la "placa madre". Los pocillos de la columna 12 no contenían fármaco y eran los pocillos de control del crecimiento del organismo. Las placas de la hija se cargaron con 185 mL por pocillo de RPMI o RPMI suplementado con suero humano al 50%. Las placas hija se prepararon transfiriendo 5 mL de solución de fármaco de cada pocillo de una placa madre a cada pocillo correspondiente de cada placa hija.

Se preparó inóculo normalizado de *Aspergillus* según los métodos CLSI. Se dispusieron 2 mL de solución salina al 0,85% sobre una inclinación de agar. Utilizando un hisopo, se hizo una suspensión. Después de un corto tiempo para permitir que las partículas pesadas se asentaran, se dispuso una pequeña cantidad del sobrenadante en RPMI y la suspensión se ajustó a una turbidez igual a 0,5 McFarland. Se realizaron diluciones para cada aislado en RPMI para alcanzar la concentración de células descrita en la metodología CLSI. El inóculo se distribuyó en depósitos estériles divididos por longitud, y se usó para inocular las placas. A las placas hijas se introdujeron 10 mL de inóculo estandarizado en cada pocillo. Por lo tanto, los pocillos de las placas hija contenían finalmente 185 mL de caldo, 5 mL de solución de fármaco y 10 mL de inóculos.

Las placas se cubrieron con una tapa, se pusieron en bolsas de plástico, y se incubaron a 35°C. Las placas de *Aspergillus* se incubaron durante 48h antes de la lectura. Las microplacas se observaron desde el fondo usando un visor de placas. Para cada placa madre, se observó una placa de control de solubilidad no inoculada para evidencia de precipitación de fármaco.

Se registró un valor de MIC y Mínimo de Concentración Efectiva (MEC). El valor de MEC se aplica específicamente a las equinocandinas cuando se ensayan hongos filamentosos. Mientras que el valor de MIC es la cantidad de fármaco que inhibe el crecimiento visible del organismo, el valor de MEC es la concentración más baja de fármaco que conduce al crecimiento de formas de hifas pequeñas, redondeadas y compactas en comparación con el crecimiento de hifas observado en el control del crecimiento bien.

Los valores de MEC, que típicamente difieren espectacularmente de los valores de MIC para esta clase de agentes antifúngicos, son la medida que debe utilizarse para determinar la susceptibilidad de los hongos filamentosos a las equinocandinas. El crecimiento de las cepas de *Aspergillus* en cada pocillo se comparó con el del control del crecimiento a las 48 h.

Los valores MEC y MIC se proporcionan en la Figura 1. Estos datos muestran que, con relación a la anidulafungina, los compuestos 1 y 16 conservan su actividad frente a cepas de *Aspergillus*. Así, se hicieron algunas modificaciones que produjeron profundos efectos farmacocinéticos sin restringir la actividad contra *Aspergillus* spp.

Ejemplo 26. Actividad in vitro: valores de MIC frente a *Candida* spp. a las 24 y 48 horas.

Se obtuvieron los valores MIC (mg/mL) de anidulafungina, caspofungina, anfotericina B, compuesto 1 y compuesto 16 contra diversas especies de *Candida* en presencia y ausencia de suero humano al 50% como sigue.

Los organismos de ensayo se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Los aislamientos se mantuvieron a -80°C, luego se descongelaron y subcultivaron antes de la prueba.

El método de ensayo de MIC siguió el procedimiento descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute y empleó manipuladores de líquidos automatizados para llevar a cabo diluciones en serie y transferencias de líquidos. Los pocillos en las columnas 1-12 en placas de microdilución estándar de 96 pocillos se llenaron con 150 mL de DMSO. Estas se convertirían en las "placas madre" de las que se prepararía la "hija" o las placas de prueba. Los fármacos (150 mL a 80x la concentración superior deseada en las placas de ensayo) se dispensaron en el pocillo apropiado en la columna 1 de las placas madre y se mezclaron. Se hicieron diluciones en serie 1:1 a través de la Columna 11 en la "placa madre". Los pocillos de la columna 12 no contenían fármaco y eran los pocillos de control del crecimiento del organismo. Las placas de la hija se cargaron con 185 mL por pocillo de RPMI o RPMI suplementado con suero humano al 50%. Las placas hija se prepararon transfiriendo 5 mL de solución de fármaco de cada pocillo de una placa madre a cada pocillo correspondiente de cada placa hija.

Se preparó inóculo normalizado de *Candida* según los métodos CLSI. Para los aislados de *Candida*, las colonias se recogieron de la placa de rayas y se preparó una suspensión en RPMI. Se realizaron diluciones para cada aislado en RPMI para alcanzar la concentración de células descrita en la metodología CLSI. El inóculo se distribuyó en depósitos estériles divididos por longitud, y se usó para inocular las placas. A las placas hijas se introdujeron 10 mL de inóculo estandarizado en cada pocillo. Por lo tanto, los pocillos de las placas hija contenían en última instancia 185 mL de caldo, 5 mL de solución de fármaco y 10 mL de inóculos.

Las placas se cubrieron con una tapa, se pusieron en bolsas de plástico, y se incubaron a 35°C. Los

aislados de *Candida* se leyeron después de 24 h de incubación y de nuevo a las 48 h. Las microplacas se observaron desde el fondo usando un visor de placas. Para cada placa madre, se observó una placa de control de solubilidad no inoculada para evidencia de precipitación de fármaco.

Para las especies de *Candida*, la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) fue leída por las directrices del CLSI. La CIM se definió como la concentración más baja de un agente antifúngico que inhibe sustancialmente el crecimiento del organismo según se detecta visualmente (los valores de CMI se proporcionan en la Figura 2).

Estos datos muestran que, con relación a la anidulafungina, los compuestos 1 y 16 conservan su actividad frente a cepas de *Candida*. Así, se realizaron algunas modificaciones que produjeron efectos farmacocinéticos profundos sin restringir la actividad contra *Candida* spp.

Se conoce que el suero altera diferencialmente las propiedades antifúngicas de los fármacos de equinocandina (véase Paderu et al., *Antimicrob Agents Chemother.*, 51: 2253 (2007)). Se encontró que los compuestos 1 y 16 tenían una actividad superior frente a una cepa de *Candida glabrata* en suero humano al 50% en comparación con el comportamiento de la anidulafungina bajo estas mismas condiciones. Esta diferencia de actividad puede ser clínicamente relevante para el uso de estos compuestos para el tratamiento de ciertas infecciones de la corriente sanguínea.

Ejemplo 27. Anfifilicidad del compuesto 1.

La solubilidad del compuesto 1 (sal de acetato) se midió en tampones acuosos de pH variable para evaluar la idoneidad de este compuesto para la formulación en un vehículo acuoso para administración por inyección (por ejemplo, inyección intravenosa o intramuscular).

Los resultados se proporcionan en la Tabla 7 (a continuación) junto con la anidulafungina como comparación. Se encontró que el Compuesto 1 tenía una solubilidad acuosa dramáticamente mayor que la anidulafungina sobre un amplio pH Registro.

Tabla 7

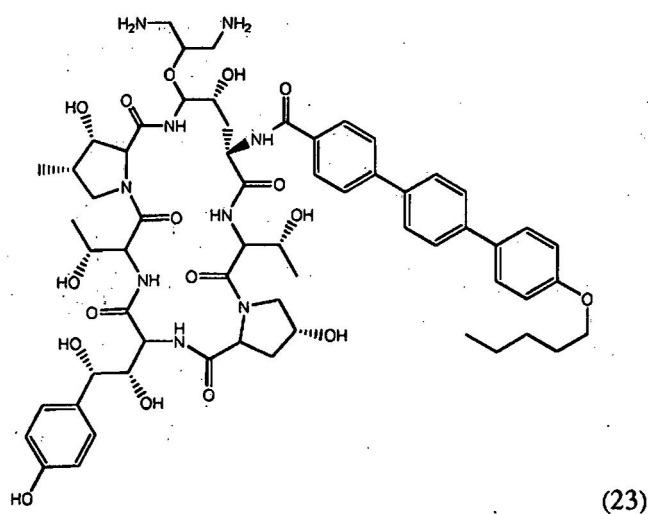
pH	Solubilidad (mg/mL) ¹	
	Anidulafungina	Compuesto 1
1 (0.1M HCl)	<0.01	>15
3 (0.01M tampón de formiato)	<0.01	>15
4.6 (0.1M tampón de acetato)	<0.01	>15
5.6 (0.1M tampón de acetato)	<0.01	>15
7.4 (0.1M tampón de fosfato)	<0.01	0.05
8.5 (0.01M tampón TRIS)	<0.01	>15
0.9% salino	<0.01	4.6
1. Todas las mediciones realizadas a temperatura ambiente		

La solubilidad del compuesto 1 (sal de acetato) también se midió en disolventes no acuosos para evaluar la idoneidad de este compuesto para la formulación en vehículos no acuosos. Los resultados se proporcionan en la Tabla 8 (a continuación).

Tabla 8

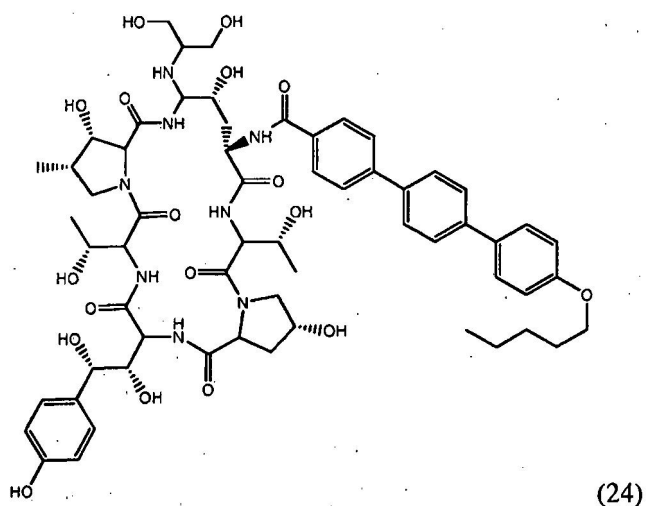
pH	Solubilidad (mg/mL) ¹	
	Anidulafungina	Compuesto 1
Propilenglicol (PG)	>17.2	>18.4
Etanol (EtOH)	>17.6	>13.7
Glicerol	1.5	>19.4
PEG400	>26.8	>34.1

Ejemplo 28. Síntesis del compuesto comparativo 23.



Se trató anidulafungina (20 mg, 0,018 mmol) en CH₃CN (10 mL) con ácido fenilborónico (2,5 mg, 0,021 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. La solución resultante se concentró a vacío hasta sequedad y los sólidos se recogieron en una solución de DMSO (0,3 ml) y cloruro de 1,3-diamino-2-propanol. La mezcla se tituló con HCl (4 M en dioxano) hasta que se acidificó sobre papel de pH húmedo. La solución resultante se calentó a 40-45°C durante 8 días, después se diluyó con agua y se purificó mediante HPLC RP preparativa eluyendo con agua (TFA al 0,1%)/CH₃CN (TFA al 0,1%). El producto se aisló por liofilización para dar 33 mg del compuesto 23 como un sólido blanco. HPLC T_R 11.28 min (93%). LC/MS, ESI+/- m/z 1212.58 [M+H]⁺, 1210.57 [M-H]⁻.

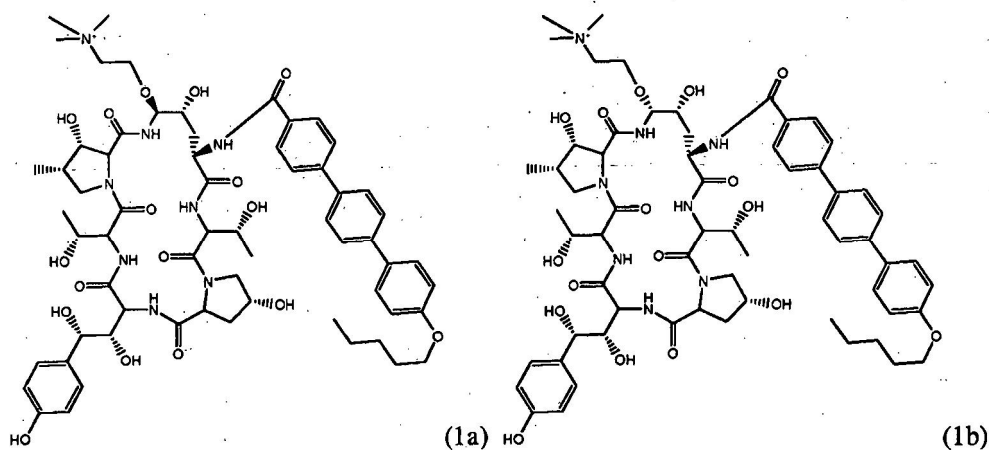
Ejemplo 29. Síntesis del compuesto comparativo 24.



Se mezcló anidulafungina hemiaminal- (4-metoxi) feniltioéter (20 mg, 0,016 mmol) con serinol (114 mg) y DMSO seco (15 mL). La mezcla se tapó bajo argón y se calentó a 70°C durante 2,5 horas. La reacción se diluyó con metanol y agua, se acidificó mediante adición de TFA, se diluyó adicionalmente con agua y se purificó mediante HPLC preparativa de RP eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1%. El producto purificado se aisló por liofilización para dar 13 mg del compuesto 24 como un sólido blanco.

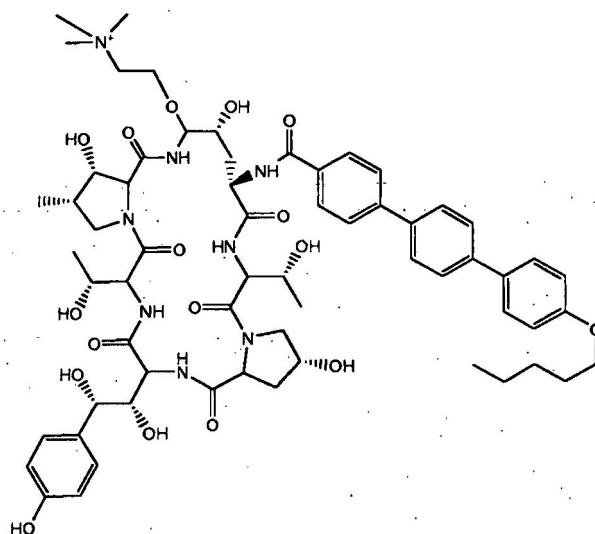
Ejemplo 30. Separación de isómeros.

Se encontró que el Compuesto 1 purificado por RP HPLC preparativa eluyendo con CH₃CN/H₂O y TFA al 0,1% era una mezcla de isómeros (véanse las Figuras 3A y 3B). Se cree que los dos isómeros observados difieren en estereoquímica en donde el sustituyente de colina está unido al material de partida de anidulafungina (véanse los isómeros representados a continuación).



Reivindicaciones

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es una sal de acetato o una sal de cloruro.
3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3 que comprende la sal de acetato o la sal de cloruro de un compuesto de la reivindicación 1.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 3 o 4, en la que dicha composición farmacéutica está formulada para administración tópica, parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intravenosa, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, por supositorios, o administración oral.
6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-5 para su uso en el tratamiento de una infección fúngica en un sujeto.
7. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que dicha composición farmacéutica se formula para la administración oral.
8. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que dicha composición farmacéutica se formula para la administración intravenosa.
9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que dicha composición farmacéutica se formula para la administración tópica.
10. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que dicha composición farmacéutica se formula para la administración subcutánea.
11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que dicha composición farmacéutica se formula para inhalación.
12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en la que dicha composición farmacéutica se administra para tratar una infección de flujo sanguíneo o infección tisular en dicho sujeto.
13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-12, en la que dicha infección fúngica se selecciona de tiña capitis, tiña corporal, tiña pedis, onicomicosis, perionicomosis, pitiriasis versicolor, candidiasis oral, candidiasis vaginal, candidiasis del tracto respiratorio, candidiasis biliar, candidiasis esofágica, candidiasis del tracto urinario, candidiasis sistémica,

candidiasis mucocutánea, aspergilosis, mucormicosis, paracoccidioidomicosis, blastomicosis norteamericana, histoplasmosis, coccidioidomicosis, esporotricosis, sinusitis fúngica o sinusitis crónica.

14. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-13, en la que dicha infección fúngica es una infección de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. Lusitaniae*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. clavatus* o *A. ochraceus*.

15. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención, estabilización o inhibición del crecimiento de hongos o la muerte de hongos.

FIG. 1

Organismo	Anidulafungina		Caspofungin		Compuesto 1		Compuesto 16		Antofotericina B	
Serum Humano% presente	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50
<i>Aspergillus candidus</i> 450 ATCC ³ 13686	MEC ³	≤0.015	NG	NG	≤0.015	NG	≤0.015	NG	MIC	≤0.06
MIC ⁴	≤0.015	≤0.015	≤0.015	≤0.015	≤0.015	≤0.015	≤0.015	≤0.015	MIC	≤0.06
<i>Aspergillus clavatus</i> 638 ATCC 10058 ⁵	MEC	≤0.015	0.125	0.06	0.03	0.125	0.03	0.125	MIC	≤0.06
MIC	4	>16	2	>16	4	>16	4	>16	>16	>16
<i>Aspergillus flavus</i> 122 ATCC 22546	MEC	≤0.015	0.06	0.25	≤0.015	0.125	≤0.015	0.06	MIC	1
MIC	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	MIC	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> 891 ATCC 204305	MEC	≤0.015	0.125	0.125	≤0.015	0.06	≤0.015	0.06	MIC	1
MIC	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	MIC	1
<i>Aspergillus niger</i> 624 ATCC 16888	MEC	≤0.015	0.06	0.06	≤0.015	0.03	≤0.015	≤0.015	MIC	0.125
MIC	≤0.015	0.125	0.25	0.125	≤0.015	0.06	≤0.015	0.06	MIC	0.25
<i>Aspergillus ochraceus</i> 625 ATCC 96919	MEC	0.03	0.06	0.06	0.03	0.06	0.03	0.06	(Ctrl) *	2
MIC	0.06	>16	0.125	>16	0.125	>16	0.125	>16	MIC	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 5280 ATCC MYA-3626	MEC	≤0.015	0.125	0.25	≤0.015	0.125	≤0.015	0.06	MIC	1
MIC	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	MIC	(0.5-4) ⁶
1. Clinical and Laboratory Standards Institute Concentración mínima de concentración efectiva (MEC), rango de control de calidad. 2. Colección Cultura Tipo Americana. 3. Concentración mínima efectiva. 4. Concentración mínima inhibidora. 5. La placa no se puede leer a las 48 horas, pero podría leer los resultados después de 68 horas de incubación. 6. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio Concentración Mínima de Inhibición (MIC) del rango de control de calidad.										

FIG.2

Organismo		Anidulafungina		Caspofungin		Compuesto 1		Compuesto 16		Anfotericina B	
Serum Humano% presente		0	50	0	50	0	50	0	50	0	50
<i>Candida albica</i> 104 ATCC ³ 90028	24 hr 48 hr	≤0.015 ≤0.015	NG	0.06 0.06	NG	0.03 0.03	NG	0.03 0.03	NG	≤0.06 0.125	NG
<i>Candida glabrata</i> 635 ATCC 90030	24 hr 48 hr	0.03 0.03	0.5 0.5	0.125 0.125	0.25 0.25	0.03 0.03	0.125 0.125	0.03 0.03	0.06 0.06	0.06 0.25	0.125 0.25
<i>Candida guilliermondii</i> 628 ATCC 34134	24 hr 48 hr	1 2	NG	0.25 >16 ⁴	NG	0.5 2	NG	0.5 1	NG	≤0.06 ≤0.06	NG
<i>Candida krusei</i> 629 ATCC 14243	24 hr 48 hr	0.03 0.06	NG	0.25 0.5	NG	0.03 0.03	NG	0.03 0.03	NG	0.25 0.5	NG
<i>Candida lusitanae</i> 631 ATCC 34134	24 hr 48 hr	0.125 0.125	NG	0.25 0.25	NG	0.25 0.25	NG	0.25 0.25	NG	≤0.06 ≤0.06	NG
<i>Candida parapsilosis</i> 2323 ATCC 22019	24 hr 48 hr	0.5 0.5 (0.25-2) ¹ (0.5-2) ²	NG	0.25 0.5 (0.25-1) ¹ (0.5-4) ²	NG	0.5 1	NG	0.25 0.5	NG	0.25 0.5 (0.25-2) ¹ (0.5-4) ²	NG
<i>Candida tropicalis</i> 4783 ATCC 90874	24 hr 48 hr	≤0.015 ≤0.015	NG	0.06 0.06	NG	≤0.015 ≤0.015	NG	≤0.015 ≤0.015	NG	0.25 0.25	NG

1. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio Concentración de inhibición mínima (MIC, por sus siglas en inglés), rango de control de calidad para lectura de 24 horas.

2. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio Concentración mínima de inhibición (MIC) del rango de control de calidad para lectura de 48 horas.

3. Colección Cultura Tipo Americana.

4. Crecimiento reducido de 0.5-16 mg/mL, pero no alcanzó el punto final descrito por CLSI.

FIG. 3A

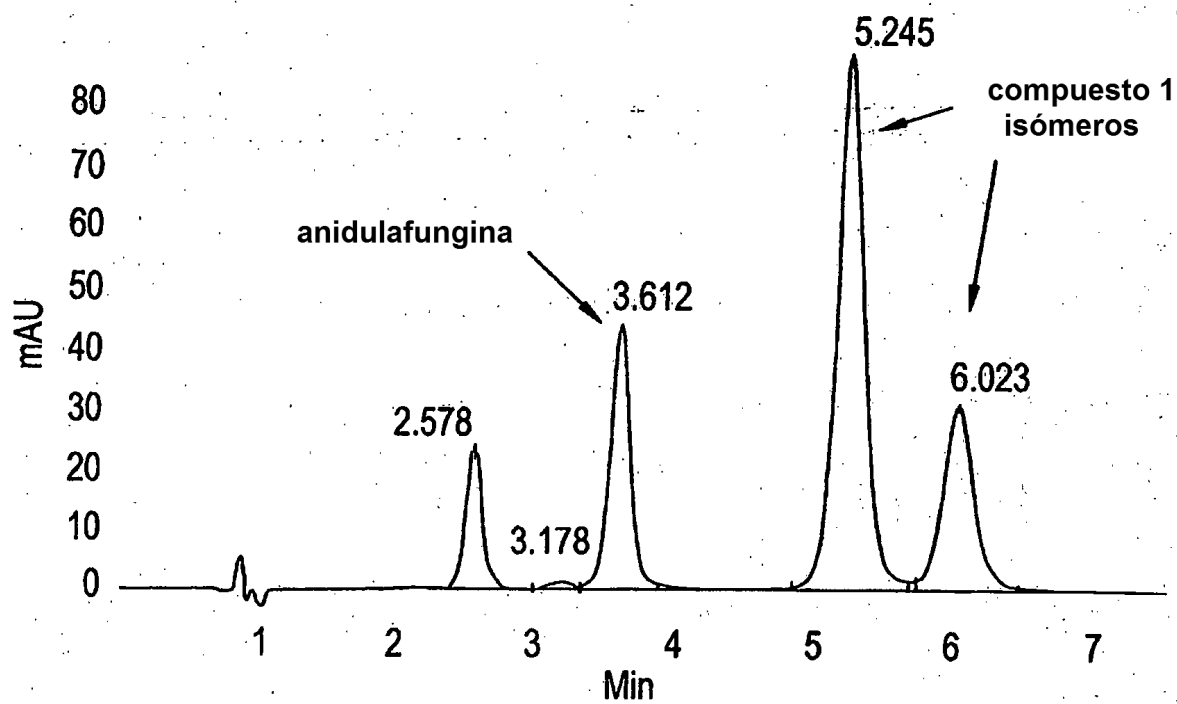


FIG. 3B

