

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 927**

51 Int. Cl.:

C07H 17/08 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2015 PCT/US2015/030965**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15175875**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2015 E 15793421 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3142672**

54 Título: **Derivado de anfotericina b con toxicidad reducida**

30 Prioridad:

16.05.2014 US 201461994450 P
04.09.2014 US 201462045907 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2020

73 Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (100.0%)
352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street
Urbana, IL 61801, US

72 Inventor/es:

BURKE, MARTIN, D. y
UNO, BRICE, E.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 749 927 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivado de anfotericina b con toxicidad reducida

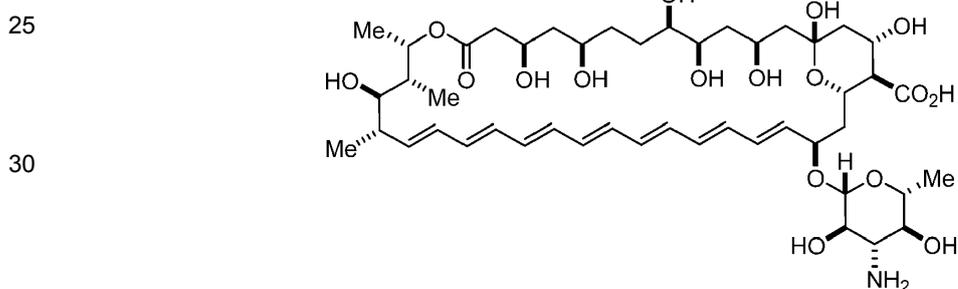
5 Antecedentes de la invención

El producto natural de macrólido poliénico anfotericina B (AmB) es el arquetipo tanto de moléculas pequeñas que forman canales iónicos en las células vivas¹ como de antibióticos que son inherentemente refractarios a la resistencia microbiana.² Desafortunadamente, la AmB es también altamente tóxica,³ lo que limita con frecuencia su uso eficaz como la última línea de defensa contra infecciones fúngicas sistémicas que amenazan la vida. Debido a que tanto la incidencia de tales infecciones fúngicas como la resistencia a todas las demás clases de antifúngicos están en aumento,² se ha convertido en un problema cada vez más importante encontrar una manera de mejorar el índice terapéutico de AmB. Se han hecho algunos progresos con las formulaciones liposomales, pero estas son con frecuencia, prohibitivamente caras,⁴ y la toxicidad sustancial aún permanece.⁵ A pesar de 50 años de extensos esfuerzos en todo el mundo, aún no ha surgido un derivado clínicamente viable de AmB con un mejor índice terapéutico.⁶

Varios derivados de anfotericina se describen en Croatt y otros. (Org. Lett. 2011, vol 13(6) páginas 1390-1393), Wilcock y otros (J.A.C.S. vol. 135, no.23, 2013, páginas 8488-8491), y en el documento WO2014/059436 A1.

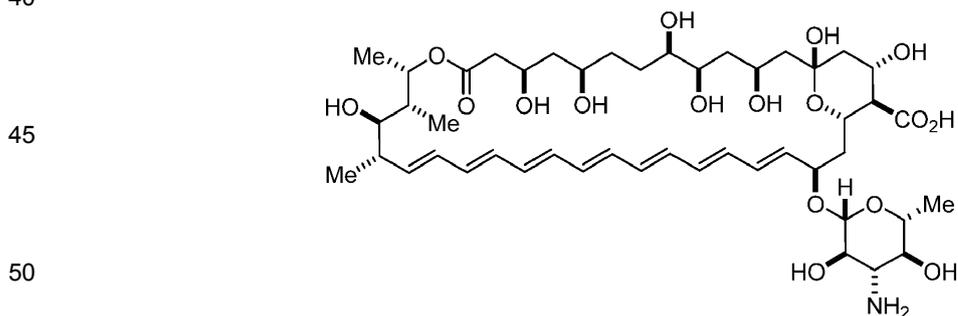
20 Resumen de la invención

Un aspecto de la invención es C2'epiAmB, representado por



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica, que comprende C2'epiAmB, representado por

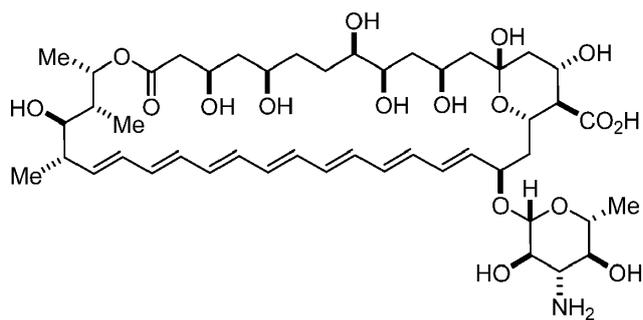


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un portador farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto de la invención es un método para inhibir el crecimiento de una levadura u hongo, que comprende poner en contacto la levadura u hongo con una cantidad eficaz de C2'epiAmB, representado por

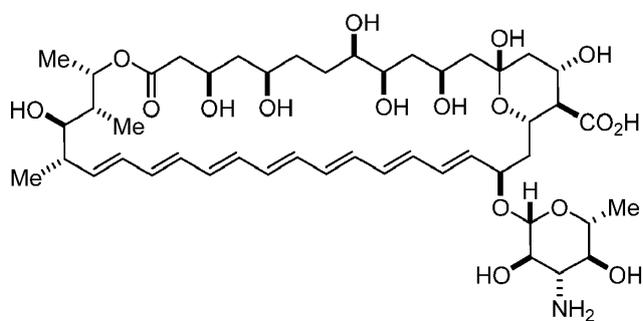
60

65



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dicho método no se realiza en el cuerpo humano o animal.

Un aspecto de la invención es proporcionar un compuesto para su uso en un método de tratamiento de una infección por hongos o levaduras, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de C2'epiAmB, representado por



35 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A describe la actividad de AmB como una esponja de esterol. Los discos que se describen representan el ergosterol.

40 La figura 1B describe las estructuras de la anfotericina B (AmB, (1)) y de los derivados sintéticos AmdeB (4) y C2'epiAmB (5) de la misma. También se describen las estructuras de la micosamina, el ergosterol (2) y el colesterol (3).

La figura 1C es un dibujo que muestra los dos supuestos puntos de contacto entre AmB y el ergosterol (Erg).

La figura 2A es una representación de la estructura cristalina de N-yodoacilAmB con colesterol unido a la conformación del estado fundamental, estabilizado por dos contactos intramoleculares polares.

45 La figura 2B describe la incapacidad de C2'deOAmB para unirse al colesterol.

La figura 2C describe la incapacidad de C2'epiAmB para unirse al colesterol.

La figura 2D describe el compuesto de la técnica anterior C2'epiAmE.

La figura 3 describe un esquema para la síntesis de C2'epiAmB.

La figura 4 describe un esquema para la síntesis de C2'epiAmB.

50 La figura 5 es un gráfico que expresa la afinidad de unión, la actividad antifúngica y los datos de toxicidad de C2'epiAmB. Col, colesterol; Erg, ergosterol; ITC, calorimetría de titulación isotérmica; MHC, concentración mínima hemolítica; MIC, concentración mínima inhibitoria; MTC, concentración mínima tóxica; RBC, glóbulos rojos humanos; REC, células epiteliales renales humanas.

La figura 6A es un gráfico que describe la unión de AmB, AmdeB, C2'deOAmB y C2'epiAmB al ergosterol. LUV, vesículas unilamelares grandes; NS, no estadísticamente significativo.

La figura 6B es un gráfico que describe la unión de AmB, AmdeB, C2'deOAmB y C2'epiAmB al colesterol. LUV, vesículas unilamelares grandes; NS, no estadísticamente significativo.

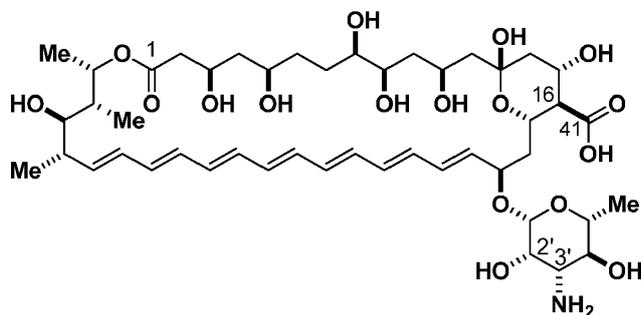
La figura 7 es un gráfico de barras que describe la carga fúngica renal (unidades formadoras de colonias, CFU) en ratones neutropénicos inoculados por vía intravenosa con *C. albicans*, y tratados dos horas después con una dosis intraperitoneal única del vehículo o 16 mg/kg de AmB o C2'epiAmB.

La figura 8 es un gráfico que describe la letalidad en ratones sanos como resultado de administraciones intravenosas únicas en las dosis indicadas de AmB o C2'epiAmB.

Descripción detallada de la invención

65

La anfotericina B (AmB) es un macrólido poliénico con un apéndice de micosamina, el compuesto completo tiene la siguiente estructura:



Anfotericina B (AmB)

La anfotericina B (AmB) es un antimicótico clínicamente vital pero su uso está limitado por su toxicidad. La unión al ergosterol, independiente de la formación de canales, es el mecanismo principal por el cual AmB destruye la levadura, y la unión al colesterol puede relacionarse principalmente con toxicidad para las células humanas. Un modelo estructural líder predice que el grupo hidroxilo C2' en el apéndice de micosamina es clave para la unión a ambos esteroides.

La AmB generalmente se obtiene a partir de una cepa de *Streptomyces nodosus*. Actualmente está aprobada para su uso clínico en los Estados Unidos para el tratamiento de infecciones fúngicas progresivas y que son potencialmente una amenaza para la vida, incluidas las infecciones como candidiasis sistémica, aspergilosis, criptococosis, blastomycosis, coccidioidomycosis, histoplasmosis y mucormycosis. La AmB generalmente se formula para inyección intravenosa. La anfotericina B está disponible comercialmente, por ejemplo, como Fungizone® (Squibb), Amphocin® (Pfizer), Abelcet® (Enzon) y Ambisome® (Astellas). Debido a sus efectos secundarios tóxicos no deseados, la dosificación generalmente se limita a un máximo de aproximadamente 1,0 mg/kg/día, y las dosis acumulativas totales no deben exceder de aproximadamente 3 g en seres humanos.

Durante muchas décadas se ha aceptado ampliamente que la AmB destruye principalmente células de levadura y humanas a través de la permeabilización de la membrana.⁷ Con este modelo como guía, se han centrado grandes esfuerzos en el desarrollo de derivados que forman selectivamente canales iónicos en células de levadura frente a células humanas.^{7b-e}

A diferencia de este modelo clásico, recientemente se descubrió que la AmB se autoensambla en una 'esponja de esteroides' extramembranosa^{8d} (Figura 1A) que principalmente destruye células mediante la unión y extracción de esteroides de una manera dependiente de micosamina.⁸ La evidencia apoya un modelo en el que C2'-OH y C3'-NH₃⁺ en el apéndice de micosamina⁹ están implicados en la estabilización de una conformación del estado fundamental de AmB que permite la unión tanto del ergosterol (Erg) como del colesterol (Col); es decir, no se requiere la formación de canales.⁸ Cuando el C2'-OH o C3'-NH₃⁺ se elimina, la AmB todavía se une al Erg pero ya no se une al Col.⁹ Estos resultados sugieren que el C2'-OH y el C3'-NH₃⁺ no se unen directamente a los esteroides, pero son sitios potenciales de modificación alostérica (figura 1C). Además, este cambio en la unión a esteroides se correlaciona directamente con una disminución sustancial de la toxicidad observada en las células humanas.⁹ Esto sugiere que la simple unión al colesterol puede explicar alternativamente la toxicidad de la AmB para las células humanas, y que los esfuerzos para mejorar el índice terapéutico de este antimicótico clínicamente vital pueden centrarse en el problema mucho más simple de maximizar la afinidad de unión relativa para el ergosterol frente al colesterol.

Anteriormente, se descubrió que la eliminación del apéndice de micosamina de la AmB elimina su capacidad de unirse tanto al ergosterol como al colesterol.⁸ También se descubrió que el derivado resultante, anfoterionolida B (AmdeB), no es tóxico para la levadura.⁸ Sin embargo, las funciones desempeñadas por cada heteroátomo contenido en el apéndice de micosamina permanecen poco claras.

En el modelo estructural líder existente, la AmB se une tanto al ergosterol como al colesterol a través de un complejo similar en donde el grupo hidroxilo C2' de AmB forma un enlace de hidrógeno crítico con el grupo hidroxilo 3-β en cada esteroide (Figura 1B).¹⁰ Sin embargo, faltaba evidencia sólida a favor o en contra de esta hipótesis. Por ejemplo, simulaciones por computadora¹¹ sugieren que tal enlace de hidrógeno desempeña un papel importante en la unión al ergosterol, pero no al colesterol. Alternativamente, estudios anteriores que comparan las actividades de permeabilización de membrana de derivados conformacionalmente restringidos de AmB^{10c} concluyeron que este enlace de hidrógeno desempeña un papel clave con ambos esteroides. Ninguno de estos estudios anteriores midió directamente la unión a esteroides.

Las exotermas relativas observadas en los ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a la concentración mínima hemolítica (MHC), sugieren que la AmB se une preferentemente

al Erg sobre el Col. Se sugiere que esta predisposición se debe a que el Col es ligeramente más voluminoso que el Erg. Además, cuando se le realizan modificaciones alostéricas a AmB (es decir, la eliminación de C2'-OH o C3'-NH₃⁺), la selectividad de esteroides naturales se magnifica para favorecer solo la unión al Erg (Figura 2B). Con estos dos sitios de alosterismo potenciales identificados, se procedió a investigar cómo las modificaciones sutiles a la posición C2' podrían aumentar aún más la selectividad para unirse al Erg.

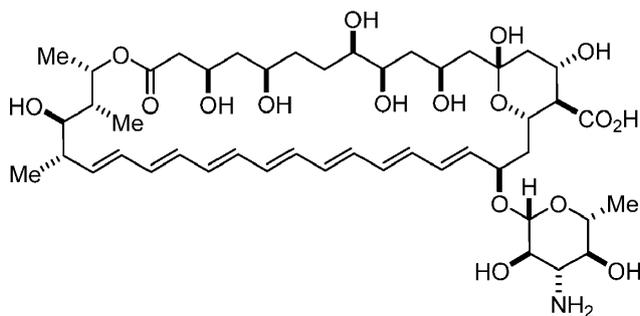
Se presume que la epimerización del C2'-OH conduciría a un aumento similar de la unión a Erg como se observa cuando se elimina C2'-OH. De acuerdo con la comprensión de una posible conformación del estado fundamental de AmB (FIG. 2A) - informada por la estructura cristalina de N-IodoacylAmB⁸ - se propuso que una interacción potencial del enlace de hidrógeno entre el C2'-OH, una molécula de agua y el C13-OH está implicada en la capacidad de AmB para unirse tanto a Erg como a Col. Por lo tanto, la epimerización en la posición C2' podría causar una interrupción o alteración de este supuesto 'puente de agua', lo que conduce posiblemente a un cambio en la forma del bolsillo de unión a esteroides que resultaría en una mayor preferencia por la unión a Erg (figura 2C).

La síntesis del éster metílico de C2'epiAmB doblemente modificado (C2'epiAmE; figura 2D) fue informada anteriormente por Carreira y sus colegas en 2011⁹. Curiosamente, observaron en sus ensayos de MIC de levadura que C2'epiAmE era equipotente para AmB. También observaron que causaba el flujo de salida de iones de potasio de los liposomas POPC que contienen tanto Erg como Col a 1 μM. A partir de estos datos, Carreira y sus colegas concluyeron que "la configuración de la posición C2' era intrascendente"⁹. Carreira y sus colegas no analizaron la toxicidad humana o la unión a Col de C2'epiAmE.

De acuerdo con la invención, el grupo hidroxilo C2' se epimerizó, en comparación con AmB, y se determinó el impacto de esta modificación en la unión al ergosterol y al colesterol. Muchos de los resultados experimentales se presentan en la sección de Ejemplificación y en las Figuras. Sorprendentemente, se ha descubierto un nuevo derivado de AmB eficaz y no tóxico, C2'epiAmB, que hasta ahora muestra el mayor potencial como un reemplazo terapéutico clínicamente viable para AmB. En comparación con AmB, C2'epiAmB conserva el carácter zwitteriónico de AmB y solo difiere en la inversión de un sólo estereocentro.

Con estos resultados notables *in vitro* disponibles, también se probó la eficacia y la toxicidad de C2'epiAmB en un estudio con ratones en comparación directa con AmB y C2'deOAmB. Los estudios *in vivo* muestran que C2'epiAmB es equipotente para AmB pero sustancialmente menos tóxico para los ratones. Además, debido a que hay un grupo hidroxilo en la posición C2', predecimos que C2'epiAmB debería ser tan estable como AmB *in vivo*.

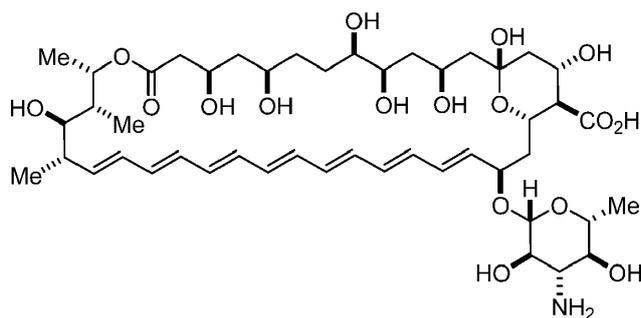
Un aspecto de la invención es C2'epiAmB, representado por



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. A continuación, se describen en la presente descripción los métodos para preparar C2'epiAmB.

Un "compuesto de la invención" como se usa en la presente descripción se refiere a C2'epiAmB y cualquiera de las anteriores sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica, que comprende C2'epiAmB, representado por



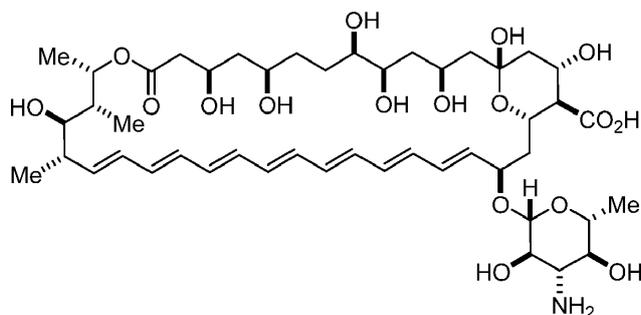
5

10

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable", como se describe con más detalle a continuación, significa uno o más de un sólido compatible o relleno de líquido, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuadas para la administración a un ser humano u otro sujeto.

20 Un aspecto de la invención es un método para inhibir el crecimiento de una levadura u hongo, dicho método que no se realiza en el cuerpo humano o animal, que comprende poner en contacto la levadura u hongo con una cantidad eficaz de C2'epiAmB, representado por

25



30

35

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 Las levaduras son organismos eucariotas clasificados en el reino Hongos. Las levaduras se describen típicamente hongos en forma de brotes. Las especies de levadura que pueden causar infecciones en huéspedes mamíferos son de una importancia particular en relación con la invención. Estas infecciones ocurren con mayor frecuencia en huéspedes inmunocomprometidos, incluidos los huéspedes con barreras comprometidas para la infección (por ejemplo, víctimas de quemaduras) y los huéspedes con sistemas inmunitarios comprometidos (por ejemplo, los huéspedes que reciben quimioterapia o terapia inmunosupresora y los huéspedes infectados con el VIH). Las levaduras patógenas incluyen, sin limitación, varias especies del género *Candida*, así como de *Cryptococcus*. Entre las levaduras patógenas del género *Candida* son de interés particular *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. viswanathii* y *C. lusitanae*. El género *Cryptococcus* incluye específicamente *Cryptococcus neoformans*. La levadura puede causar infecciones de las membranas mucosales, por ejemplo, infecciones orales, esofágicas y vaginales en seres humanos, así como infecciones de huesos, sangre, tracto urogenital y sistema nervioso central. Este listado es ilustrativo y no es limitante de ninguna manera.

50

Los hongos incluyen, además de las levaduras, otros organismos eucariotas incluidos mohos y setas. Una serie de hongos (aparte de la levadura) pueden causar infecciones en los huéspedes mamíferos. Estas infecciones ocurren con mayor frecuencia en huéspedes inmunocomprometidos, incluidos los huéspedes con barreras comprometidas para la infección (por ejemplo, víctimas de quemaduras) y los huéspedes con sistemas inmunitarios comprometidos (por ejemplo, los huéspedes que reciben quimioterapia o terapia inmunosupresora y los huéspedes infectados con el VIH). Los hongos patógenos (aparte de la levadura) incluyen, sin limitación, especies de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermophyton*. Entre los anteriores son de interés particular *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *H. capsulatum*, *C. immitis* y *B. dermatitidis*. Los hongos pueden causar infecciones de tejidos profundos en pulmones, huesos, sangre, tracto urogenital y sistema nervioso central, por nombrar algunos. Algunos hongos son responsables de las infecciones de la piel y las uñas.

55

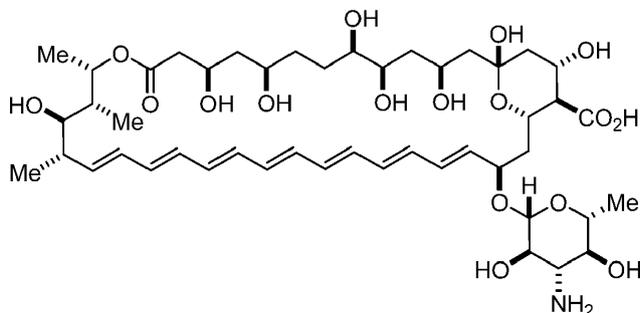
60

Como se usa en la presente descripción, "inhibir" o "inhibición" significa reducir en una cantidad o grado objetivamente medible en comparación con el control. En una modalidad, inhibir o inhibición significa reducir al menos en una cantidad estadísticamente significativa en comparación con el control. En una modalidad, inhibir o inhibir significa reducir al menos

65

en un 5 por ciento en comparación con el control. En varias modalidades individuales, inhibir o inhibición significa reducir al menos en un 10, 15, 20, 25, 30, 33, 40, 50, 60, 67, 70, 75, 80, 90 o 95 por ciento en comparación con el control.

Un aspecto de la invención es proporcionar un compuesto para su uso en un método de tratamiento de una infección por hongos o levaduras, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de C2'epiAmB, representado por



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como se usa en la presente descripción, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren a realizar una intervención que proporcione como resultado (a) prevenir que se produzca una afección o enfermedad en un sujeto que puede estar en riesgo de desarrollar o predispuesto a tener la afección o enfermedad pero aún no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir una afección o enfermedad, por ejemplo, retardar o detener su desarrollo; o (c) aliviar o mejorar una afección o enfermedad, por ejemplo, causar la regresión de la afección o enfermedad. En una modalidad, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren a realizar una intervención que proporcione como resultado (a) inhibir una afección o enfermedad, por ejemplo, retardar o detener su desarrollo; o (b) aliviar o mejorar una afección o enfermedad, por ejemplo, causar regresión de la afección o enfermedad.

Una "infección por levadura" como se usa en la presente descripción se refiere a una infección con una levadura como se define en la presente descripción.

Una "infección fúngica" como se usa en la presente descripción se refiere a una infección con un hongo como se define en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, un "sujeto" se refiere a un mamífero vivo. En varias modalidades, un sujeto es un mamífero no humano, que incluye, sin limitación, un ratón, rata, hámster, conejillo de indias, conejo, oveja, cabra, gato, perro, cerdo, caballo, vaca o un primate no humano. En una modalidad un sujeto es un ser humano.

Como se usa en la presente descripción, un "sujeto que tiene una infección por levaduras u hongos", se refiere a un sujeto que exhibe al menos una manifestación objetiva de una infección por levaduras u hongos. En una modalidad, un sujeto que tiene una infección por levaduras u hongos es sujeto al que se le ha diagnosticado que tiene una infección por levaduras u hongos y necesita tratamiento para la misma. Los métodos para diagnosticar una infección por levaduras u hongos se conocen bien y no necesitan describirse aquí en detalle.

Como se usa en la presente descripción, el término "administrar" tiene su significado habitual y abarca la administración por cualquier vía adecuada, que incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, directa (por ejemplo, en un tumor), mucosal, por inhalación, oral y tópica.

En una modalidad, la administración es la administración sistémica.

En una modalidad, la administración es la administración tópica.

Como se usa en la presente descripción, la frase "cantidad eficaz" se refiere a cualquier cantidad que sea suficiente para lograr un efecto biológico deseado. Como se usa en la presente descripción, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a cualquier cantidad que sea suficiente para lograr un efecto terapéutico deseado, por ejemplo, para tratar una infección por levaduras u hongos.

Los compuestos y sales de la invención pueden combinarse con otros agentes terapéuticos. El compuesto de la invención y otro agente terapéutico pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, pueden administrarse en las mismas formulaciones o en formulaciones separadas, pero se administran sustancialmente al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se administran secuencialmente con otros y con el compuesto de la invención, cuando se separa temporalmente la administración de los

otros agentes terapéuticos y el compuesto de la invención. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser cuestión de minutos o puede ser más larga.

5 Los ejemplos de otros agentes terapéuticos incluyen otros agentes antifúngicos, que incluyen AmB, así como otros antibióticos, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores y agentes anticancerígenos.

10 Como se indicó anteriormente, una "cantidad eficaz" se refiere a cualquier cantidad que sea suficiente para lograr un efecto biológico deseado. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en la presente descripción, cuando se elige entre los varios compuestos activos y factores de ponderación tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y la manera de administración, puede planificarse un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no cause una toxicidad sustancial no deseada y que todavía sea eficaz para tratar a un sujeto en particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar en dependencia de factores tales como la enfermedad o afección que se trata, el compuesto particular de la invención que se administra, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un compuesto particular de la invención y/u otro agente terapéutico sin necesidad de una experimentación indebida. Se prefiere generalmente que se use una dosis máxima, o sea, la dosis segura más alta de acuerdo con algún criterio médico. Pueden contemplarse dosis múltiples por día para lograr niveles sistémicos apropiados de los compuestos. Los niveles sistémicos apropiados pueden determinarse, por ejemplo, mediante la medición del pico o el nivel plasmático sostenido del fármaco del paciente. Los términos "dosis" y "dosificación" se usan indistintamente en la presente descripción.

25 En general, las dosis intravenosas diarias de C2'epiAmB, para sujetos humanos, serán similares o mayores que las dosis intravenosas diarias habituales de AmB. De manera similar, otras dosis parenterales diarias de C2'epiAmB, para sujetos humanos, serán similares o mayores que las dosis parenterales diarias habituales de AmB.

30 En una modalidad, la administración intravenosa de un compuesto de la invención puede ser típicamente de 0,1 mg/kg/día a 20 mg/kg/día. En una modalidad, la administración intravenosa de un compuesto de la invención puede ser típicamente de 0,1 mg/kg/día a 2 mg/kg/día. En una modalidad, la administración intravenosa de un compuesto de la invención puede ser típicamente de 0,5 mg/kg/día a 5 mg/kg/día. En una modalidad, la administración intravenosa de un compuesto de la invención puede ser típicamente de 1 mg/kg/ día a 20 mg/kg/día. En una modalidad, la administración intravenosa de un compuesto de la invención puede ser típicamente de 1 mg/kg/ día a 10 mg/kg/día. Por lo tanto, la dosificación intravenosa puede ser similar a, o ventajosamente, puede exceder las dosis máximas toleradas de AmB.

35 Generalmente, las dosis orales diarias de los compuestos activos, para los sujetos humanos, serán de aproximadamente 0,01 miligramos/kg por día a 1000 miligramos/kg por día. Se espera que las dosis orales en el intervalo de 0,5 a 50 miligramos/kg, en una o más administraciones por día, produzcan resultados terapéuticos. La dosificación puede ajustarse adecuadamente para lograr los niveles de fármaco deseados, locales o sistémicos, en dependencia del modo de administración. Por ejemplo, se espera que la administración intravenosa sea de una dosis por día más baja en un orden a varios órdenes de magnitud. En el caso de que la respuesta en un sujeto sea insuficiente a tales dosis, pueden emplearse dosis aún más altas (o dosis más altas efectivas por una vía de distribución diferente y más localizada), hasta el límite que permita la tolerancia del paciente. Se contemplan dosis múltiples por día para lograr niveles sistémicos apropiados de los compuestos.

45 Para cualquier compuesto descrito en la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse inicialmente a partir de modelos animales. También puede determinarse una dosis terapéuticamente eficaz a partir de datos humanos para los compuestos de la invención que se han probado en seres humanos y para compuestos que se sabe que exhiben actividades farmacológicas similares, tales como otros agentes activos relacionados (por ejemplo, AmB). Pueden requerirse dosis más altas para la administración parenteral. La dosis aplicada puede ajustarse en función de la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. Dentro de las capacidades del experto en la técnica está ajustar la dosis para lograr una eficacia máxima en función de los métodos descritos anteriormente y otros métodos que son bien conocidos en la técnica.

50 Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener habitualmente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, portadores compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

55 Puede administrarse una cantidad eficaz del compuesto de la invención a un sujeto para su uso en terapia, por cualquier modo que suministre el compuesto de la invención a la superficie deseada. La administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede realizarse por cualquier medio conocido por el experto en la técnica. Las vías de administración incluyen, entre otras, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intravesical (vejiga urinaria), oral, subcutánea, inyección directa (por ejemplo, en un tumor o absceso), mucosal (por ejemplo, tópico para los ojos), inhalación y tópica.

60 Para las vías de administración intravenosa y otras vías parenterales, C2'epiAmB generalmente puede formularse de manera similar a AmB. Por ejemplo, C2'epiAmB puede formularse como una preparación liofilizada con ácido desoxicólico, como una preparación liofilizada de un compuesto activo encapsulado o intercalado en liposomas, como un complejo

lipídico en suspensión acuosa o como un complejo de colestiril sulfato. Las formulaciones liofilizadas generalmente se reconstituyen en una solución acuosa adecuada, por ejemplo, en agua o solución salina estéril, poco antes de la administración.

5 Para la administración oral, los compuestos (es decir, C2'epiAmB y sales farmacéuticamente aceptables del mismo y otros agentes terapéuticos) pueden formularse fácilmente mediante la combinación del(de los) compuesto(s) activo(s) con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formulen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, semilíquidos, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un sujeto a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para su uso oral pueden obtenerse como un excipiente sólido, opcionalmente triturando una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después añadiendo los auxiliares adecuados, si se desea, para obtener los núcleos de las tabletas o grageas. Los excipientes adecuados incluyen, en particular, rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, tales como la polivinil pirrolidona reticulada, el agar, o el ácido algínico o una sal de los mismos tal como el alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también pueden formularse en solución salina o tampones, por ejemplo, EDTA para neutralizar las condiciones ácidas internas o pueden administrarse sin ningún portador.

20 También se contemplan específicamente las formas de dosificación oral del componente o los componentes anteriores. El componente o los componentes pueden modificarse químicamente para que la administración oral del derivado sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos una porción a la propia molécula componente, donde esta porción permite (a) la inhibición de la hidrólisis ácida; y (b) la absorción en el torrente sanguíneo desde el estómago o el intestino. También se desea el aumento de la estabilidad general del componente o los componentes y el aumento del tiempo de circulación en el cuerpo. Los ejemplos de tales porciones incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", en: Enzymes as Drugs, Hocenberg y Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, páginas 367-383 (1981); Newmark y otros, J Appl Biochem 4:185-9 (1982). Otros polímeros que podrían usarse son el poli-1,3-dioxolano y el poli-1,3,6-tioxocano. Las porciones de polietilenglicol son las que se prefieren para uso farmacéutico, como se indicó anteriormente.

35 Para el componente (o derivado) la ubicación de la liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un experto en la técnica tiene formulaciones disponibles que no se disolverán en el estómago, pero liberarán el material en el duodeno o en cualquier otra parte del intestino. Preferentemente, la liberación evitará los efectos nocivos del ambiente del estómago, ya sea mediante la protección del compuesto de la invención (o derivado) o mediante la liberación del material biológicamente activo más allá del entorno del estómago, tal como en el intestino.

40 Para garantizar una resistencia gástrica completa es esencial un recubrimiento impermeable al menos a pH 5,0. Los ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se usan como recubrimientos entéricos son trimelitato de acetato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y goma laca. Estos recubrimientos pueden usarse como películas mixtas.

45 También puede usarse un recubrimiento o una mezcla de recubrimientos en tabletas, que no están destinadas a la protección contra el estómago. Esto puede incluir recubrimientos de azúcares o recubrimientos que hacen que la tableta sea más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una cubierta dura (tal como gelatina) para el suministro del producto terapéutico seco (por ejemplo, en polvo); para formas líquidas, puede usarse una cubierta de gelatina blanda. El material de la cubierta de la cápsula podría ser almidón grueso u otro papel comestible. Para las píldoras, pastillas, tabletas moldeadas o triturados de tabletas, pueden usarse técnicas de masa húmeda.

50 La terapéutica puede incluirse en la formulación como multipartículas finas en forma de gránulos o bolitas de tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de cápsulas también podría ser como un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como tabletas. El producto terapéutico podría prepararse por compresión.

55 Pueden incluirse colorantes y agentes aromatizantes. Por ejemplo, el compuesto de la invención (o derivado) puede formularse (tal como por encapsulación en liposomas o microesferas) y después contenido dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes aromatizantes.

60 Puede diluirse o aumentarse el volumen del producto terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. Determinadas sales inorgánicas también pueden usarse como rellenos, que incluyen trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

65

Los desintegrantes pueden incluirse en la formulación del producto terapéutico en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como desintegrantes incluyen, pero no se limitan a almidón, incluido el desintegrante comercial basado en almidón, Explotab. Pueden usarse glicolato de almidón de sodio, Amberlita, carboximetilcelulosa de sodio, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, piel de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los desintegrantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Las gomas en polvo pueden usarse como desintegrantes y como aglutinantes y pueden incluir gomas en polvo como agar, Karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal de sodio también son útiles como desintegrantes.

Los aglutinantes pueden usarse para mantener unido el agente terapéutico para formar una tableta dura e incluir materiales de productos naturales tales como acacia, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). La polivinil pirrolidona (PVP) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) podrían usarse en soluciones alcohólicas para granular el producto terapéutico.

Puede incluirse un agente antifricción en la formulación del producto terapéutico para evitar que se pegue durante el proceso de formulación. Los lubricantes pueden usarse como una capa entre el producto terapéutico y la pared, y estos pueden incluir, pero no se limitan a; ácido esteárico incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También pueden usarse lubricantes solubles como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

Pueden añadirse deslizantes que podrían mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y para ayudar a la reorganización durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

Puede añadirse un surfactante como un agente humectante para ayudar a la disolución del producto terapéutico en el medio acuoso. Los surfactantes pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Pueden usarse detergentes catiónicos y pueden incluir, por ejemplo, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los detergentes no iónicos posibles que podrían incluirse en la formulación como surfactantes incluyen laurmacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso y sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos surfactantes podrían estar presentes en la formulación del compuesto de la invención o de un derivado, ya sea solo o como una mezcla en diferentes relaciones.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas, hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos en una mezcla con relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tal como estearato de talco o magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o glicoles de polietileno líquidos. Además, pueden adicionarse los estabilizadores. También pueden usarse microesferas formuladas para la administración oral. Tales microesferas se han definido bien en la técnica. Todas las formulaciones para la administración oral deben ser en dosis adecuadas para dicha administración.

Para la administración oral, las composiciones pueden adoptar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, C2'epiAmB para su uso de acuerdo con la presente invención puede suministrarse convenientemente en forma de una presentación de atomización de aerosol desde empaques presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse al proporcionar una válvula para liberar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos para usar, por ejemplo, en un inhalador o insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

También se contempla en la presente descripción el suministro pulmonar de C2'epiAmB (o sales del mismo). El compuesto de la invención (o derivado) se suministra a los pulmones de un mamífero mientras se inhala y atraviesa el revestimiento epitelial del pulmón hacia el torrente sanguíneo. Otros informes de moléculas inhaladas incluyen Adjei y otros, Pharm Res 7:565-569 (1990); Adjei y otros, Int J Pharmaceutics 63:135-144 (1990) (acetato de leuprolida); Braquet y otros, J Cardiovasc Pharmacol 13 (supl. 5):143-146 (1989) (endotelina-1); Hubbard y otros., Annal Int Med 3: 206-212 (1989)) (α 1-antitripsina); Smith y otros, 1989, J Clin Invest 84:1145-1146 (a-1-proteinasa); Oswein y otros, 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, marzo, (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs y otros, 1988, J Immunol 140:3482-3488 (interferón-gamma y factor de necrosis tumoral alfa) y Platz y otros, patente de los Estados Unidos núm. 5,284,656 (factor estimulante de colonias de granulocitos; incorporada como referencia). Un método y composición para el suministro pulmonar de fármacos para efecto sistémico se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 5,451,569 (incorporada como referencia), emitida el 19 de septiembre de 1995 a Wong y otros.

65

Para el uso de esta invención se contemplan en la práctica un amplio intervalo de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, que incluyen, pero sin limitarse a, nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo, los cuales son familiares para los expertos en la técnica.

5 Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles adecuados para la práctica de esta invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo.; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colo.; el inhalador de dosis medida Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Mass.

10 Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación de C2'epiAmB (o una sal del mismo). Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o portadores usuales útiles en la terapia. Además, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de portadores. El compuesto modificado químicamente de la invención también puede prepararse en diferentes formulaciones en
15 dependencia del tipo de modificación química o del tipo de dispositivo empleado.

Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, ya sea a chorro o ultrasónico, comprenderán típicamente el compuesto de la invención (o derivado) disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg del compuesto biológicamente activo de la invención por ml de solución. La formulación también puede incluir un tampón y
20 un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización del compuesto de la invención y la regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador también puede contener un surfactante, para reducir o prevenir la agregación superficial inducida del compuesto de la invención causada por la atomización de la solución en la formación del aerosol.

Las formulaciones para el uso con un dispositivo inhalador de dosis medida generalmente comprenderán un polvo finamente dividido que contiene el compuesto de la invención (o una sal del mismo) suspendido en un propulsor con la ayuda de un surfactante. El surfactante puede ser cualquier material convencional empleado para este propósito, tal como un clorofluorocarburo, un hidroc fluorocarburo, un hidrofluorocarburo o un hidrocarburo, que incluye
25 triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o combinaciones de los mismos. Los surfactantes adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como un surfactante.
30

Las formulaciones para dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un compuesto que contiene polvo seco finamente dividido de la invención (o un derivado) y también pueden incluir un agente en volumen, tal como la lactosa, el sorbitol, la sacarosa o el manitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo del dispositivo, por ejemplo,
35 del 50 al 90 % en peso de la formulación. El compuesto de la invención (o un derivado) debe prepararse ventajosamente en forma de partículas con un tamaño promedio de menos de 10 micrómetros (μm), preferentemente de 0,5 a 5 μm , para un suministro más eficaz al pulmón profundo.

También se contempla el suministro nasal de una composición farmacéutica de la presente invención. El suministro nasal permite el paso de una composición farmacéutica de la presente invención al torrente sanguíneo directamente después de administrar el producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de depositar el producto en el pulmón. Las formulaciones para la administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano.
40

Para la administración nasal, un dispositivo útil es un frasco pequeño y duro al que se une un pulverizador de dosis medida. En una modalidad, la dosis medida se suministra llevando la composición farmacéutica de la solución de la presente invención a una cámara de volumen definido, cuya cámara tiene una abertura dimensionada para aerosolizar y se obtiene la formulación en aerosol formando un aerosol cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En una modalidad específica, la cámara es un arreglo de pistón. Estos dispositivos están comercialmente disponibles.
45
50

Alternativamente, se usa una botella de plástico con una abertura o rendija dimensionada para aerosolizar una formulación de aerosol que lo genera cuando se usa exprimido. La abertura generalmente se encuentra en la parte superior de la botella, y la parte superior generalmente se estrecha para que se ajuste parcialmente en los conductos nasales para una administración eficiente de la formulación en aerosol. Preferentemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad
55 medida de la formulación en aerosol, para la administración de una dosis medida del fármaco.

Los compuestos, cuando es deseable que se suministren sistémicamente, pueden formularse para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o por infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con adición de un conservante. Las composiciones pueden tomar formas de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación como agentes para suspensión, estabilización y/o dispersión.
60

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones apropiadas de inyección oleosa. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como el
65

- 5 aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como el oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir preparaciones con soluciones de alta concentración.
- 10 Alternativamente, los compuestos activos pueden encontrarse en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.
- 15 Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.
- Además de las formulaciones descritas anteriormente, C2'epiAmB pueden formularse además como una preparación de depósito. Estas formulaciones que actúan a largo plazo, pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.
- 20 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además portadores o excipientes en fase sólida o en gel adecuados. Los ejemplos de tales portadores o excipientes incluyen, pero no se limitan, a carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.
- 25 Las formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, recubiertas con partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizados, aerosoles, bolitas para implantación en la piel, o secados sobre un objeto afilado para ser frotado en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, tabletas, tabletas recubiertas, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación los excipientes y aditivos y/o los auxiliares tales como desintegrantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes inflamatorios, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes se usan habitualmente como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Para una revisión breve de los métodos de suministro de fármacos, ver Langer, Science 249:1527-33 (1990).
- 30 C2'epiAmB y opcionalmente otros productos terapéuticos pueden administrarse *per se* (puras) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales deben ser farmacéuticamente aceptables cuando se usan en la medicina, pero las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden usarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Estas sales incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Además, tales sales pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo del ácido carboxílico.
- 35 Los agentes tamponantes adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).
- 40 Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad eficaz de C2'epiAmB y opcionalmente agentes terapéuticos incluidos en un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa uno o más de sólido o relleno líquido compatible, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuadas para la administración en un ser humano u otro animal vertebrado. El término "portador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas además son capaces de ser mezclados con los compuestos de la presente invención, y entre sí, de manera tal que no haya interacción que pueda afectar substancialmente la eficiencia farmacológica deseada.
- 45 El(Los) agente(s) terapéutico(s), incluido específicamente, pero sin limitación, C2'epiAmB, puede proporcionarse en partículas. Las partículas como se usa en la presente descripción significan nanopartículas o micropartículas (o en algunos casos partículas más grandes) las cuales pueden consistir en todo o en parte del compuesto de la invención o el(los) otro(s) agente(s) terapéutico(s) como se describen en la presente descripción. Las partículas pueden contener el(los) agente(s) terapéutico(s) en un núcleo rodeado por un recubrimiento, que incluye, pero no se limita a, un recubrimiento entérico. El(Los) agente(s) terapéutico(s) pueden dispersarse además a todo lo largo de las partículas. El(Los) agente(s) terapéutico(s) pueden adsorberse además en las partículas. Las partículas pueden ser de cualquier orden de cinética de liberación, que incluyen la liberación de orden cero, de primer orden, de segundo orden, la liberación retardada, sostenida, inmediata, o una combinación de las mismas, etc. La partícula puede incluir además el agente terapéutico, cualquiera de los materiales usados habitualmente en la técnica de farmacia y medicina, que incluyen, pero no se limitan a, material erosionable, no erosionable, biodegradable, o no biodegradable o combinaciones de los mismos. Las partículas pueden

ser microcápsulas que contienen el compuesto de la invención en una solución o en un estado semisólido. Las partículas pueden ser virtualmente de cualquier forma.

5 Tanto los materiales poliméricos no biodegradables como los biodegradables pueden usarse en la fabricación de las partículas para la administración del(de los) agente(s) terapéutico(s). Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona basado en el periodo de tiempo durante el cual se desea la liberación. Los polímeros bioadhesivos de interés particular incluyen hidrogeles bioerosionables descritos en Sawhney H S y otros (1993) Macromolecules 26:581-7, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente descripción. Estos incluyen los ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhidruros, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metil metacrilatos), poli(etil metacrilatos), poli(butil metacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexil metacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), y poli(octadecil acrilato).

15 El(Los) agente(s) terapéutico(s) pueden estar contenidos en los sistemas de liberación controlada. El término "liberación controlada" pretende referirse a cualquier formulación que contenga un fármaco en donde se controle la manera y el perfil de liberación del fármaco desde la formulación. Esto se refiere a formulaciones de liberación inmediata así como también no inmediata, donde las formulaciones de liberación no inmediata incluyen pero no se limitan a formulaciones de liberación sostenida y de liberación retardada. El término "liberación sostenida" (también denominado "liberación prolongada") se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco durante un período prolongado de tiempo, y que preferentemente, aunque no necesariamente, da como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco durante un período de tiempo prolongado. El término "liberación retardada" se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco en donde hay un retardo de tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco desde allí. La "liberación retardada" puede o no implicar la liberación gradual del fármaco durante un período prolongado de tiempo y, por lo tanto, puede ser o no "liberación sostenida".

25 El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de afecciones crónicas. La liberación a "largo plazo", como se usa en la presente descripción, significa que el implante se construye y dispone para que suministre niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 7 días y preferentemente durante 30-60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

30 Una vez descrita en detalle la presente invención, la misma se comprenderá de forma más clara como referencia a los siguientes ejemplos, los que se incluyen adjuntos solo para propósitos de ilustración y no pretenden ser limitantes de la invención.

EJEMPLOS

Métodos Generales

40

Materiales

45 Los materiales comercialmente disponibles se adquirieron de Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Strem o Fisher Scientific, y se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. La anfotericina B fue un regalo generoso de Bristol-Myers Squibb Company. El ácido canforsulfónico se recrystalizó a partir de acetato de etilo antes de su uso. Todos los solventes se dispensaron de un sistema de purificación de solventes que purifica los solventes al pasarlos a través de columnas empaquetadas de acuerdo con el método de Pangborn y colegas (THF, Et₂O, CH₂Cl₂, CH₃N, dioxano, hexanos: alúmina neutra seca; benceno, tolueno: alúmina neutra seca y reactivo Q5; DMSO, DMF, CH₃OH: tamices moleculares activados). Ermishkin, LN y otros (1976) Nature 262:698-699. El agua fue doblemente destilada u obtenida de un sistema de purificación de agua MilliQ Millipore (Billerica, MA). La trietilamina se destiló recién en una atmósfera de nitrógeno de CaH₂. El ácido (±)-10-canforsulfónico se recrystalizó a partir de EtOAc.

50

Reacciones

55 Debido a la sensibilidad a la luz y al aire de los polienos, todas las manipulaciones de los polienos se llevaron a cabo en condiciones de poca luz y los compuestos se almacenaron en una atmósfera de argón. Todas las reacciones se realizaron en material de vidrio secado al horno (~125 ° C) o al fuego, bajo una atmósfera de argón a menos que se indique lo contrario. Las reacciones se monitorearon por cromatografía analítica en capa fina realizada con el uso del solvente indicado en placas F₂₅₄ de gel de sílice 60 E. Merck (0,25 mm). Los compuestos se visualizaron con el uso de una lámpara UV (λ₂₅₄) o se tiñeron con una solución de tinción de *p*-anisaldehído, seguido de un calentamiento con una pistola de calor Varitemp. La cromatografía rápida en columna se llevó a cabo con el uso de gel de sílice 60 de Merck (230-400 mesh).

60

Purificación y Análisis

65 Los espectros de ¹NMR H se registraron a temperatura ambiente con el uso de uno de los siguientes instrumentos: Varian Unity 500 (500 MHz), Varian VXR 500 (500 MHz) o Varian Unity Inova 500NB (500 MHz). Los desplazamientos químicos

se informan en partes por millón (ppm) hacia campos bajos de tetrametilsilano y se hace referencia al protio residual en el solvente de NMR (CDCl_3 , $\delta = 7,26$; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, $\delta = 2,05$, línea central). Los datos espectrales se presentan de la siguiente manera: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, sext = sexteto, dd = doblete de dobletes, dt = doblete de tripletes, ddd = doblete de doblete de dobletes, m = multiplete, b = amplio, aplicación = aparente), constante de acoplamiento (J) e integración. Los espectros de ^{13}C NMR se registraron a temperatura ambiente con el uso de uno de los siguientes instrumentos: Instrumento Varian VXR 500 (125 MHz), Varian Unity 500 (125 MHz) o Varian Unity 400 (101 MHz). Los desplazamientos químicos se informan en ppm hacia campos bajos de tetrametilsilano y se hace referencia a resonancias de carbono en el solvente de NMR (CDCl_3 , $\delta = 77,16$, línea central; $\text{CD}_3\text{C}(\text{O})\text{CD}_3$, $\delta = 29,84$, línea central). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se adquirieron por el Sr. Pulin Wang, el Sr. Furong Sun o el Dr. Haijun Yao en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Illinois. Los datos se informan en forma de m/z . El análisis de cromatografía de gases se realizó en un instrumento Agilent Technologies 7890A.

15 Determinación del coeficiente de extinción

Una muestra del compuesto seco se pesó en un vial tarado con el uso de una microbalanza Mettler Toledo MT5. Esta muestra se disolvió después en DMSO para crear una solución madre concentrada. Una porción de esta solución madre concentrada se diluyó por un factor de cinco con DMSO para crear una solución madre diluida. Para lograr la concentración final para los experimentos de UV/vis, se diluyó un volumen de la solución madre diluida a 0,5 ml con MeOH. Para cada compuesto, se realizaron experimentos de UV/vis con el uso de cinco concentraciones finales diferentes, y cada una se preparó tres veces para obtener una absorbancia promedio. La absorbancia promedio se graficó en función de la concentración. Los datos se ajustaron con un ajuste lineal de mínimos cuadrados con el uso de Excel, y la pendiente de la línea ajustada se usó como el coeficiente de extinción. Los coeficientes de extinción fueron los siguientes: AmB ($\epsilon_{406} = 164,000$), AmdeB ($\epsilon_{406} = 102,000$), C2'deOAmB ($\epsilon_{406} = 73,000$).

25 Ejemplo 1. Síntesis de C2'epiAmB

En la síntesis de primera generación de C2'epiAmB, la síntesis de Carreira de C2'epiAmE se modificó para permitir el acceso al material desprotegido. Específicamente, se empleó un éster alílico fácilmente eliminable en la posición C41. Se sintetizó C2'epiAmB empleando una ruta anteriormente informada a la aglicona 5.5^{3b,5} completamente protegido con el donante de micosamina y las condiciones de glicosilación anteriormente usadas en la construcción de C3'deNHAniB⁵ (figura 3).

Aunque la síntesis de C2'epiAmB fue posible a partir de una ruta de glicosilación híbrida similar a la de C2'deOAmB⁴ y C3'deNHAmB⁵, se notó que la metodología de acilación selectiva de sitio de AmB anteriormente informada podría proporcionar una síntesis más eficiente y práctica de C2'epiAmB¹¹.

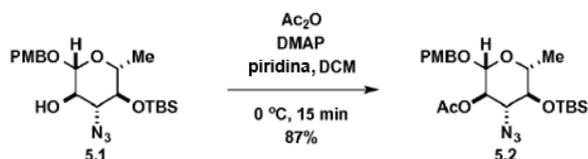
En la síntesis de la segunda generación de C2'epiAmB, descrita en la figura 4, se empleó una estrategia de grupo protector diferente. El Aloc se instaló como grupo protector en el nitrógeno. El carboxilato C41 se protegió con un grupo alilo. Ambos grupos se eliminarían concomitantemente en el paso final con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y ácido tiosalicílico. Los cetales de PMP fueron críticos para la metodología de acilación selectiva y podrían eliminarse simultáneamente con el metilcetal C13 como penúltimo paso en condiciones ligeramente ácidas. Se usaron grupos éter de dietilisopropil sililo (DEIPS) porque son lo suficientemente resistentes como para sobrevivir a la hidrólisis mediada por KCN de ambos productos intermedios de benzoato C2', pero se eliminan fácilmente en condiciones de piridina HF tamponada con piridina¹¹.

En el sentido hacia delante, el grupo Aloc, el hemicetal, los cetales PMP y los grupos alilo se instalaron en tres etapas desde AmB con una separación cromatográfica que proporciona 5.11 con un rendimiento del 55 %. En este punto, el C2'-OH de 5.11 se aciló selectivamente con cloruro de *p*-tercbutilbenzoilo en las condiciones anteriormente informadas, para generar 4.12 con un rendimiento preparativamente útil del 30 %. Los grupos DEIPS se instalaron con el uso del triflato correspondiente, que proporciona 5.13 con un rendimiento del 72 %. La hidrólisis posterior mediada por KCN del benzoato de *p*-tercbutilo C2' proporcionó C2'-OH libre 5.14 con un rendimiento del 63 %. La inversión de C2'-OH de 5,14 procedió en condiciones de Mitsunobu, que proporciona *p*-nitrobenzoato ecuatorial a C2' 5.15 con un rendimiento del 65 %. El C2'-nitrobenzoato resultante 5.15 se escindió en condiciones de KCN similares para generar C2'epiAmB completamente protegido 5.16. Tres etapas de desprotección global permanecen en la 2^{da} vía de generación para C2'epiAmB: 1) desililación de HF-piridina; 2) hidrólisis cetal con ácido trifluoroacético en DMF; y 3) eliminación concomitante de los grupos alil éster y aloc con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y ácido tiosalicílico.

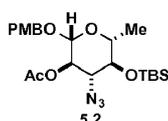
Los detalles de la síntesis descrita en la figura 3 y la figura 4 son los siguientes.

60 Síntesis del producto intermedio 5.2

65



10 A una solución agitada de azido alcohol 5.1 (1,14 g, 2,69 mmol, 1,0 equivalentes) y piridina (2,17 ml, 26,87 mmol, 10,0 equivalentes) en 27 ml de DCM a 0 °C en un matraz de fondo redondo de 100 ml se añadieron secuencialmente anhídrido acético (1,27 ml, 13,4 mmol, 5,0 equivalentes) y DMAP (16,4 mg, 0,135 mmol, 0,05 equivalentes). Después de 15 min, la solución se calentó a 23 °C, se agitó durante 10 min, se vertió en un embudo separador que contenía Et₂O y bicarbonato acuoso saturado. La capa acuosa se extrajo con Et₂O (3 x 20 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La piridina se eliminó azeotrópicamente con benceno (3 x 15 ml). El producto purificado por cromatografía rápida (gradiente de elución, EtoAc:Hex al 5 % a EtoAc:Hex al 10 %) proporcionó acetato 5.2 (1,09 g, 2,34 mmol, 87 %) como un aceite transparente e incoloro.

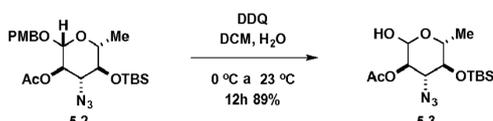


25 $R_f = 0,65$ (Et₂O/Hex 1:1, tinción de CAM)
¹H NMR: (500 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 7,33 - 7,28 (m, 2H), 6,95 - 6,90 (m, 2H), 4,97 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 4,68 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H), 4,64 (dd, $J = 10,6, 3,7$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,77 - 3,72 (m, 2H), 3,23 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H), 2,09 (s, 1H), 2,07 (s, 3H), 1,24 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H), 0,93 (s, 11H).
 HRMS (ESI)

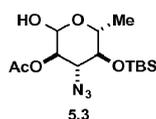
30

Calculado para C ₂₂ H ₃₅ N ₃ O ₆ Si (M + Na) ⁺ :	488,2193
Encontrado:	488,2193

35 Síntesis del producto intermedio 5.3



45 A una solución agitada de acetato 5.2 (1,09 g, 2,34 mmol, 1,0 equivalentes) en una mezcla de DCM:H₂O (23,4 ml, 10:1) a 0 °C en un vial iChem de 40 ml cubierto con papel de aluminio se le añadió DDQ (623 mg, 2,81 mmol, 1,2 equivalentes). Después de 5 min, la reacción se calentó a 23 °C, se agitó durante 12 horas y se vertió en un embudo de decantación que contenía Et₂O y bicarbonato acuoso saturado. Los productos orgánicos se lavaron con salmuera saturada. Las capas acuosas combinadas se extrajeron con Et₂O (3 x 20 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (SiO₂, gradiente de elución, EtoAc:Hex al 10 %, a EtoAc:Hex al 15 % a EtoAc:Hex al 20 %) proporcionó hemiacetal 5.3 (716 mg, 2,07 mmol, 89 %) como un aceite transparente e incoloro.



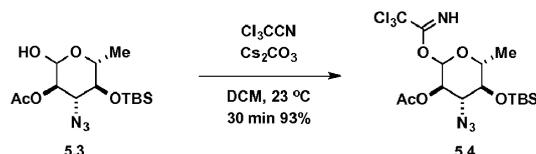
60 $R_f = 0,45$ (Et₂O/Hex 1:1, tinción de CAM)
¹H NMR: (500 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 5,23 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 4,61 (dd, $J = 10,5, 3,6$ Hz, 1H), 3,92 (dq, $J = 9,2, 6,3$ Hz, 1H), 3,77 (dd, $J = 10,5, 9,2$ Hz, 1H), 3,19 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H), 2,09 (s, 3H), 2,08 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 1,24 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H), 1,19 (d, $J = 6,3$ Hz, 4H), 0,94 (s, 10H), 0,93 (s, 2H), 0,21 (d, $J = 3,3$ Hz, 4H), 0,15 (s, 4H).
 HRMS (ESI)

65

Calculado para C ₁₄ H ₂₇ N ₃ O ₅ Si (M + Na) ⁺ :	368,1618
Encontrado:	368,1620

Síntesis del producto intermedio 5.4

5

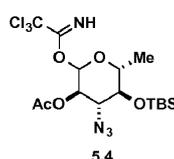


10

15

A una solución agitada de hemiacetal 5.3 (716 mg, 2,07 mmol, 1,0 equivalentes) en 10,35 ml de DCM, a $23\text{ }^\circ\text{C}$ en un vial iChem de 40 ml se le añadieron secuencialmente tricloroacetnitrilo (1,04 ml, 10,35 mmol, 5,0 equivalentes) y carbonato de cesio (337,2 mg, 1,03 mmol, 0,5 equivalentes). Después de 30 min, la reacción se vertió en un embudo separador que contenía hexanos y agua. Las capas se separaron, la fase acuosa se extrajo con hexano (3 x 30 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El agua exógena se eliminó azeotrópicamente con benceno (3 x 10 ml) y se usó tricloroacetimidato 5.4 sin purificación adicional en la reacción posterior. Como este producto no era estable, se usó inmediatamente después de la formación o se congeló en una matriz de argón benceno.

20



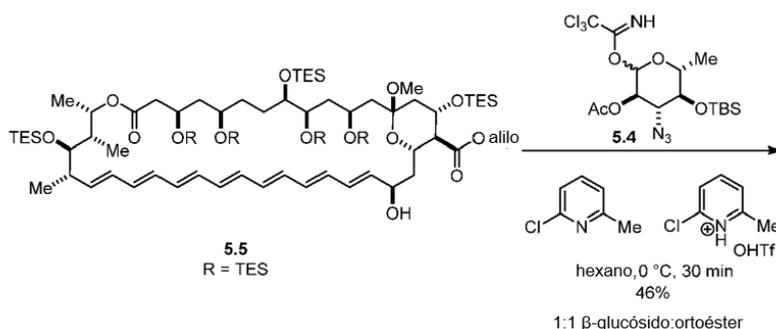
25

$R_f = 0,95$ ($\text{Et}_2\text{O}/\text{Hex}$ 1:1 con Et_3N al 0,1 %, tinción de CAM)

30

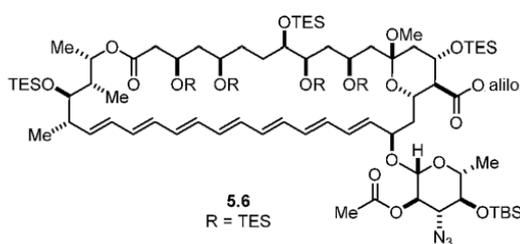
Síntesis del producto intermedio 5.6

35



40

45



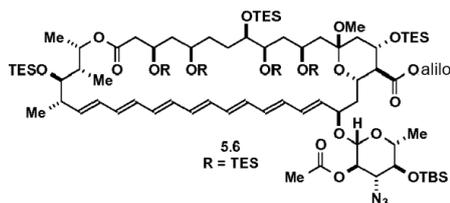
50

55

60

Se secó azeotrópicamente AmB aglicona 5.5 (2,19 g, 1,34 mmol, 1,0 equivalentes) con benceno (3 x 10 ml) y se dejó en alto vacío durante toda la noche en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadió tricloroacetimidato 5.4 (944 mg, 1,93 mmol, 1,44 equivalentes) al matraz que contenía 5.5 como una solución en benceno y se concentró. Se añadieron hexanos (70 ml) y posteriormente se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$ después de que el sistema se colocó bajo una atmósfera de N_2 . Se añadió 2-cloro-6-metilpiridina (147 ml, 1,34 mmol, 1,0 equivalentes) seguido de triflato de 2-cloro-6-metilpiridinio (186,0 mg, 0,67 mmol, 0,5 equivalentes) como un sólido en una porción. Después de 8 min se observó un cambio de color de naranja a amarillo verdoso y una ligera formación de precipitado. La reacción se interrumpió 30 min después de la adición de la sal triflato vertiéndola en un embudo separador que contenía hexanos y bicarbonato de sodio acuoso saturado. La fase acuosa se extrajo con hexanos (2 x 50 ml) y las fases orgánicas posteriores se lavaron con salmuera saturada, después se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (gradiente de elución de $\text{EtOAc}:\text{Hex}$ 5:95 a $\text{EtOAc}:\text{Hex}$ 1:9) proporcionó una mezcla inseparable 1:1 de β -glucósido 5.6 y su ortoéster (1,21 g, 46 % de rendimiento) como un sólido de color naranja amarillento. Esta mezcla se llevó a la reacción posterior donde la escisión del grupo acetato proporciona un producto aislable.

65



5

10

$R_f = 0,73$ (EtOAc:Hex 1:9, tinción de CAM)

$^1\text{H NMR}$: (500 MHz, $\text{CD}_3\text{C}(\text{O})\text{CD}_3$) δ 6,52 (ddd, $J = 14,0, 10,5, 3,3$ Hz, 5H), 6,46 - 5,97 (m, 31H), 5,53 (ddd, $J = 14,3, 9,5, 3,6$ Hz, 2H), 4,76 - 4,54 (m, 11H), 4,45 (td, $J = 10,5, 4,7$ Hz, 3H), 4,29 - 4,19 (m, 4H), 4,15 (s, 3H), 4,07 - 3,99 (m, 4H), 3,92 - 3,83 (m, 3H), 3,77 - 3,67 (m, 4H), 3,67 - 3,59 (m, 4H), 3,15 (s, 3H), 3,07 (s, 4H), 2,68 - 2,52 (m, 5H), 2,44 (q, $J = 8,3$ Hz, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,13 - 1,98 (m, 150H), 1,98 - 1,59 (m, 39H), 1,52 (d, $J = 12,6$ Hz, 3H), 1,28 (d, $J = 9,1$ Hz, 3H), 1,25 (d, $J = 6,2$ Hz, 7H), 1,18 (d, $J = 6,0$ Hz, 8H), 1,13 - 0,91 (m, 191H), 0,91 - 0,82 (m, 5H), 0,81 - 0,56 (m, 112H), 0,22 (d, $J = 1,2$ Hz, 7H), 0,16 (d, $J = 3,4$ Hz, 7H).

15

$^{13}\text{C NMR}$: (126 MHz, Acetona) δ 172,89, 139,33, 135,50, 134,89, 133,85, 133,69, 133,06, 132,81, 132,76, 131,64, 130,31, 129,83, 119,34, 119,04, 101,55, 98,52, 77,20, 76,93, 75,92, 74,28, 74,20, 72,97, 71,35, 70,50, 69,63, 69,27, 68,93, 67,71, 67,11, 66,27, 66,17, 58,17, 48,33, 48,26, 43,72, 41,49, 32,51, 30,51, 30,35, 30,20, 30,05, 29,89, 29,74, 29,66, 29,58, 27,74, 26,46, 26,38, 24,37, 21,12, 20,18, 19,53, 18,88, 18,81, 18,75, 18,73, 14,58, 11,33, 7,91, 7,88, 7,87, 7,75, 7,69, 7,56, 7,54, 7,48, 7,38, 7,37, 6,68, 6,65, 6,41, 6,13, 6,08, 6,04, 6,02, 5,96, 5,90, 5,86, 1,33, -3,83, -3,86, -4,01, -4,04.

20

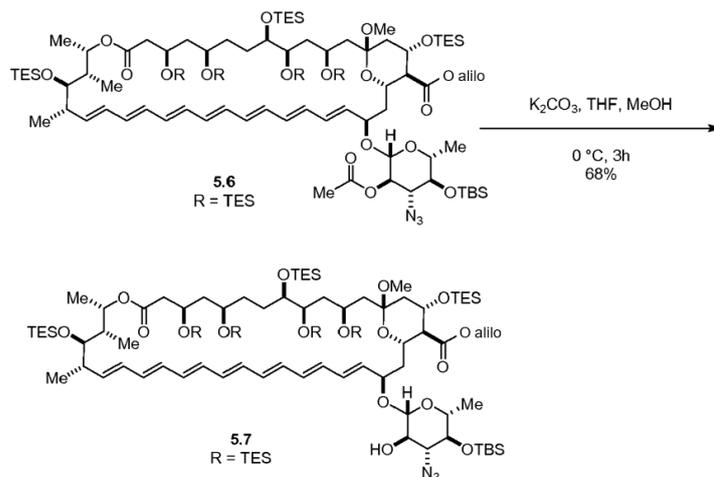
HRMS (ESI)

25

Calculado para $\text{C}_{101}\text{H}_{191}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{Si}_8$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$:	1981,2175
Encontrado:	1981,2169

Síntesis del producto intermedio 5.7

30



35

40

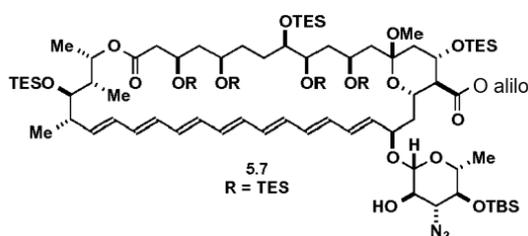
45

A una solución agitada de una mezcla de 5.6 y el correspondiente ortoéster como una mezcla 1:1 (1,01 g, 0,515 mmol, 1,0 equivalentes) en THF:MeOH (51 ml: 51 ml) a 0 °C en un matraz de fondo redondo de 200 ml se añadió K_2OC_3 (2,85 g, 20,6 mmol, 40,0 equivalentes). Después de agitar a 0 °C durante 2,5 horas, la reacción se dejó calentar a 23 °C y se agitó durante 1,5 h adicionales. La reacción se trató después transfiriéndola a un embudo separador que contenía salmuera saturada y hexanos. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con bicarbonato acuoso saturado, seguido de agua DI, salmuera saturada, y después se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (gradiente de elución de EtOAc:Hex isocrático 5:95) proporcionó persilil-C41alil-C2'epiOH-metilcetal-azidoAmB puro 5.7 (333 mg, 0,174 mmol, 68 % basado en 0,2575 mmol) como un sólido amarillo anaranjado.

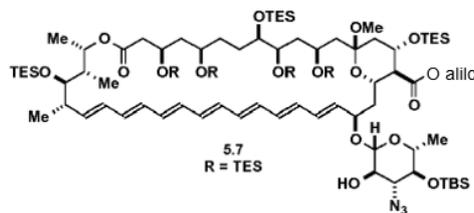
50

55

60



65



5

10 $R_f = 0,62$ (EtOAc:Hex 1:9, tinción de CAM)

$^1\text{H NMR}$: (500 MHz, $\text{CD}_3\text{C}(\text{O})\text{CD}_3$) δ 6,57 - 5,97 (m, 14H), 4,74 - 4,59 (m, 3H), 4,43 (q, $J = 6,2, 5,3$ Hz, 1H), 4,38 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 4,21 (s, 1H), 4,05 (qd, $J = 8,1, 7,6, 4,8$ Hz, 3H), 3,71 (dt, $J = 6,5, 4,5$ Hz, 1H), 3,64 (dd, $J = 10,6, 4,7$ Hz, 1H), 3,35 (ddt, $J = 10,3, 4,1, 2,6$ Hz, 2H), 3,28 (t, $J = 9,4$ Hz, 1H), 3,15 (s, 3H), 3,08 (t, $J = 9,0$ Hz, 1H), 2,63 - 2,52 (m, 2H), 2,09 (s, 1H), 1,99 - 1,69 (m, 14H), 1,69 - 1,57 (m, 5H), 1,57 - 1,46 (m, 3H), 1,40 - 1,23 (m, 33H), 1,23 - 1,09 (m, 10H), 1,09 - 0,91 (m, 90H), 0,91 - 0,82 (m, 29H), 0,80 - 0,55 (m, 48H), 0,21 (s, 3H), 0,14 (s, 3H).

15

$^{13}\text{C NMR}$: (126 MHz, $\text{CD}_3\text{C}(\text{O})\text{CD}_3$) δ 172,81, 169,91, 134,76, 134,17, 133,32, 132,81, 132,48, 132,00, 131,80, 131,69, 130,73, 130,06, 129,88, 118,41, 101,82, 100,77, 76,58, 76,07, 75,14, 73,90, 73,40, 72,96, 70,94, 70,47, 68,41, 66,87, 66,71, 65,53, 59,87, 56,85, 47,52, 43,65, 42,83, 40,70, 36,83, 36,21, 34,60, 31,66, 29,65, 28,73, 26,87, 25,66, 25,52, 25,15, 22,64, 20,26, 20,17, 19,31, 18,37, 18,10, 18,07, 13,85, 13,71, 11,04, 10,56, 7,03, 7,01, 6,89, 6,77, 6,70, 6,67, 6,53, 5,77, 5,71, 5,55, 5,29, 5,27, 5,24, 5,21, 5,17, 5,02, -4,53, -4,73.

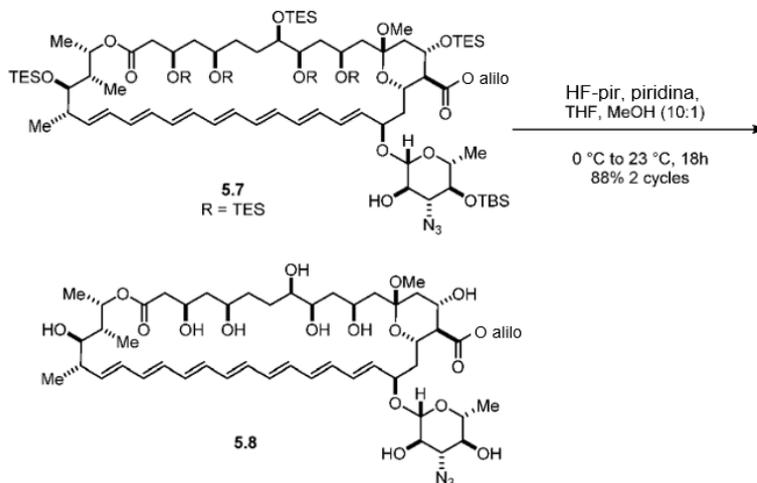
20

HRMS (ESI)

25	Calculado para $\text{C}_{99}\text{H}_{189}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{Si}_8$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$:	1939,2069
	Encontrado:	1939,2126

Síntesis del producto intermedio 5.8

30



35

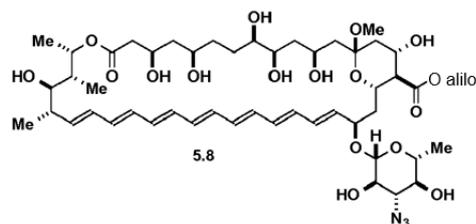
40

45

A una solución agitada de piridina (5 ml, 62 mmol, 351 equivalentes) en MeOH 250 μl en un vial de Teflón de 50 ml a 0 $^\circ\text{C}$ se añadió gota a gota un complejo de 70 % de HF-piridina (1,04 ml, 328 equivalentes). A esta solución se le añadió por medio de una cánula 5.7 (333 mg, 174 μmol , 1,0 equivalentes) como una solución en THF (1,5 ml). El vial que contenía 5,7 se lavó con THF (3 x 500 μl) para asegurar la transferencia cuantitativa de material. Luego se dejó calentar la reacción a 23 $^\circ\text{C}$ y se agitó durante 18 h. La reacción después se enfrió a 0 $^\circ\text{C}$ y se inactivó mediante la adición lenta de MeOSiMe_3 (excedente bruto) después se dejó calentar a 23 $^\circ\text{C}$ y se agitó durante 1 h. La reacción se concentró después a presión reducida y la piridina se eliminó azeotrópicamente con benceno (3 x 15 ml). La purificación por HPLC preparativa de fase inversa (C_{18} SiO_2 , $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ 5:95 a 95:5 a 25 ml/min durante 20 min) proporcionó C41alil-C2'epiOH-metilcetal-azidoAmB 5.8 (48,6 mg, 0,047 mmol, 27 % de rendimiento) como un sólido escamoso amarillo. También se recuperó material con grupos sililo adicionales restantes (111 mg). Este material se volvió a someter a condiciones de reacción similares (asumiendo 5.7 completamente sililado como un peso molecular: piridina 585 μl , 7,25 mmol, 125 equivalentes; HF-pir al 70 %, 345 μl , 19 mmol, 328 equivalentes; THF: MeOH 1,2 ml:0,2 ml). Un segundo ciclo y la purificación por HPLC produjeron 5.8 (152,6 mg, 152 μmol , 88 % de rendimiento combinado) como un sólido escamoso amarillo.

60

65



R_f = 15,68 min ($C_{18}SiO_2$ HPLC analítica, MeCN:H₂O 5:95 a 95:5 durante 20 min, 1 ml/min)

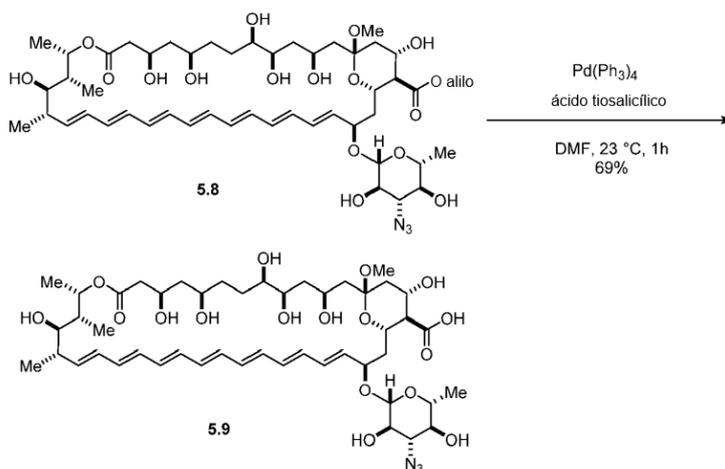
¹H NMR: (500 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 6,55 - 6,15 (m, 23H), 6,06 - 5,89 (m, 3H), 5,54 - 5,46 (m, 2H), 5,41 (dq, J = 17,3, 1,7 Hz, 1H), 5,38 - 5,31 (m, 1H), 5,24 (dq, J = 10,5, 1,5 Hz, 2H), 4,76 - 4,61 (m, 8H), 4,36 - 4,32 (m, 1H), 4,32 - 4,15 (m, 4H), 4,15 - 4,05 (m, 5H), 3,97 (dt, J = 19,0, 4,2 Hz, 3H), 3,91 - 3,84 (m, 2H), 3,84 - 3,71 (m, 5H), 3,64 - 3,49 (m, 12H), 3,44 - 3,26 (m, 9H), 3,22 (d, J = 6,3 Hz, 7H), 3,01 (td, J = 9,0, 5,1 Hz, 2H), 2,49 - 2,20 (m, 8H), 2,17 - 2,08 (m, 3H), 2,04 - 1,72 (m, 13H), 1,71 - 1,53 (m, 16H), 1,53 - 1,39 (m, 12H), 1,21 (qd, J = 7,2, 6,4, 3,1 Hz, 12H), 1,12 (dd, J = 6,9, 3,7 Hz, 6H), 1,02 (t, J = 8,0 Hz, 6H).

¹³C NMR: (126 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 172,92, 172,30, 137,60, 136,91, 135,04, 134,98, 134,35, 133,89, 133,82, 133,76, 133,68, 133,36, 133,18, 132,79, 131,24, 118,46, 104,39, 102,54, 102,51, 78,81, 77,90, 76,00, 75,24, 75,17, 73,99, 73,54, 72,91, 71,14, 70,63, 69,47, 68,66, 68,30, 67,49, 67,18, 67,06, 65,94, 62,57, 62,36, 56,45, 48,68, 44,49, 43,60, 42,74, 42,43, 41,38, 38,46, 36,82, 33,03, 31,79, 30,66, 30,63, 30,40, 30,31, 30,25, 30,23, 30,19, 30,09, 30,07, 30,01, 27,21, 24,24, 18,97, 18,20, 17,52, 12,46.

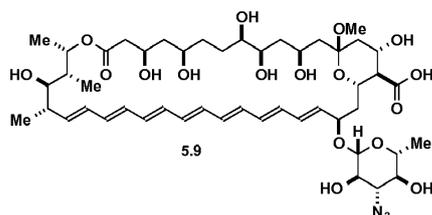
HRMS (ESI)

Calculado para C ₅₁ H ₇₇ N ₃ O ₁₇ (M + Na) ⁺ :	1026,5151
Encontrado:	1026,5115

Síntesis del producto intermedio 5.9



El producto intermedio 5.8 (104 mg, 0,135 mmol, 1,0 equivalentes) se secó azeotrópicamente con benceno (3 x 2 ml) colocado en un alto vacío durante toda la noche en un vial iChem de 20 ml. En la caja, se añadió Pd (PPh₃)₄ (35,9 mg, 0,03105 mmol, 30 % mol) y ácido tereftálico (79,8 mg, 0,517 mmol, 5,0 equivalentes) seguido de DMF (3,5 ml) y se selló bajo una atmósfera de Ar y se agitó durante 1 hora a 23 °C. La reacción se transfirió gota a gota en Et₂O (100 ml) de agitación rápida. El precipitado se filtró a través de una pipeta de 5" que contenía una pequeña pieza de un kim-wipe™ como filtro. La torta del filtro se lavó después con Et₂O adicional y después se eluyó a través del filtro con DMSO. El filtro se lavó adicionalmente con DMSO mínimo. Las fracciones combinadas de DMSO se liofilizaron para producir 5.9 (68,9 mg, 0,714 mmol, 69 %) como un polvo amarillo y se llevó a la reacción siguiente sin purificación adicional. Por HPLC analítica se observó la conversión completa en un solo pico.

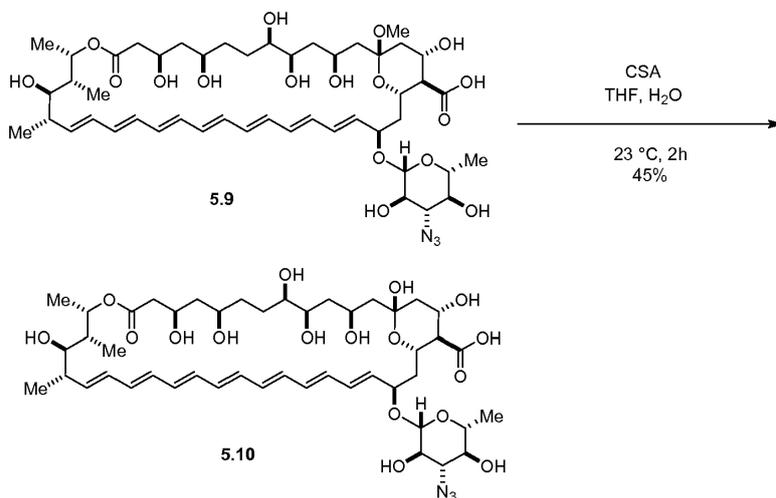


ES 2 749 927 T3

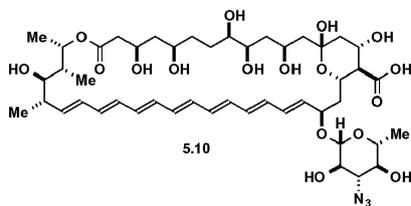
$R_f = 18,7$ min ($C_{18}SiO_2$ HPLC analítica, MeCN:H₂O 5:95 a 95:5 p/0,1 % de ácido fórmico durante 20 min, 1 ml/min)
HRMS (ESI)

Calculado para $C_{48}H_{73}N_3O_{17}$ (M + Na) ⁺ :	986,4838
Encontrado:	986,4825

Síntesis del producto intermedio 5.10



A una solución agitada de 5.9 (68,9 mg, 0,0715 mmol, 1,0 equivalentes) en THF:H₂O (1,59 ml: 0,8 ml 2:1) en un vial de 7 ml a 23 °C se añadió CSA (4,5 mg, 0,0178 mmol, 0,25 equivalentes) y se agitó durante 2 h. Se añadió bicarbonato acuoso saturado (0,5 ml) y después se filtró a través de filtros de HPLC seguido de una purificación por HPLC preparativa de fase inversa ($C_{18}SiO_2$, MeCN:H₂O 5:95 a 95:5 con ácido fórmico al 0,1 % durante 25 min a 25 ml/min) rindiendo 5.10 (30,8 mg, 32,2 μmol, 45 %) como un polvo amarillo.

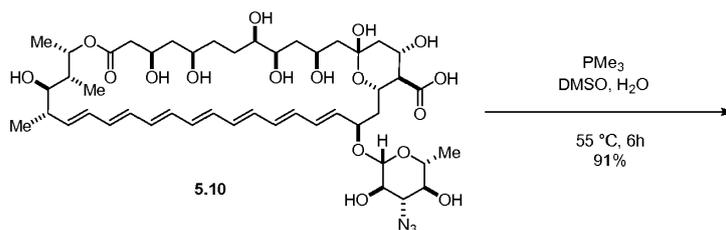


$R_f = 19,3$ min ($C_{18}SiO_2$ HPLC analítica, MeCN:H₂O 5:95 a 95:5 durante 20 min, 1 ml/min)
HRMS (ESI)

Calculado para $C_{47}H_{71}N_3O_{17}$ (M + Na) ⁺ :	972,4681
Encontrado:	972,4661

Síntesis de C2'epiAmB

5



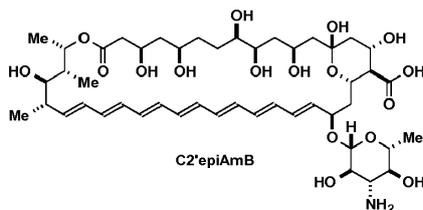
10

15

20 A una solución agitada de 5.10 (30,8 mg, 32,2 μmol , 1,0 equivalentes) en DMSO (1,1 ml) y H_2O (58 μl , 100 equivalentes) en un vial de 7 ml a 23 $^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de Ar se añadió PMe_3 como una solución 1,0 M en THF (97 μl , 97,0 μmol , 3,0 equivalentes) y después se calentó a 55 $^\circ\text{C}$ durante 6 h. La reacción se concentró después a presión reducida seguido de una purificación por HPLC preparativa de fase inversa ($\text{C}_{18}\text{SiO}_2$, $\text{MeCN}:\text{NH}_4\text{OAc}$ 5:95 a 95:5 (15 mM) durante 20 min a 25 ml/min) rindiendo C2'epiAmB (11,2 mg, 17,2 μmol , 54 %) como un polvo amarillo.

25

30



35

$R_f = 11,17$ min ($\text{C}_{18}\text{SiO}_2$ HPLC analítica, $\text{MeCN}:\text{NH}_4\text{OAc}$ 5:95 a 95:5 (5 mM) durante 20 min, 1 ml/min)

Coefficiente de extinción: 92,000 cm^2/mol

40

$^1\text{H NMR}$: (500 MHz, $\text{CD}_3\text{S(O)CD}_3$) δ 6,55 - 6,03 (m, 10H), 5,97 (dd, $J = 15,5, 8,7$ Hz, 1H), 5,75 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 5,44 (dd, $J = 15,0, 10,1$ Hz, 1H), 5,34 (s, 1H), 5,21 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 4,89 - 4,71 (m, 3H), 4,62 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,41 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H), 4,39 - 4,30 (m, 2H), 4,25 (t, $J = 10,5$ Hz, 2H), 4,06 (s, 1H), 3,91 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 3,49 (d, $J = 31,6$ Hz, 2H), 3,17 - 3,04 (m, 2H), 3,04 - 2,84 (m, 2H), 2,66 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H), 2,40 (s, 1H), 2,28 (dd, $J = 14,6, 7,5$ Hz, 1H), 2,17 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H), 2,05 - 1,68 (m, 5H), 1,65 - 1,47 (m, 5H), 1,47 - 1,29 (m, 7H), 1,24 (q, $J = 5,6, 4,6$ Hz, 6H), 1,20 - 1,08 (m, 6H), 1,04 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 0,91 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 0,86 (td, $J = 7,1, 4,2$ Hz, 1H).

HRMS (ESI)

45

Calculado para $\text{C}_{47}\text{H}_{73}\text{NO}_{17}$ (M + H) ⁺ :	924,4957
Encontrado:	924,4960

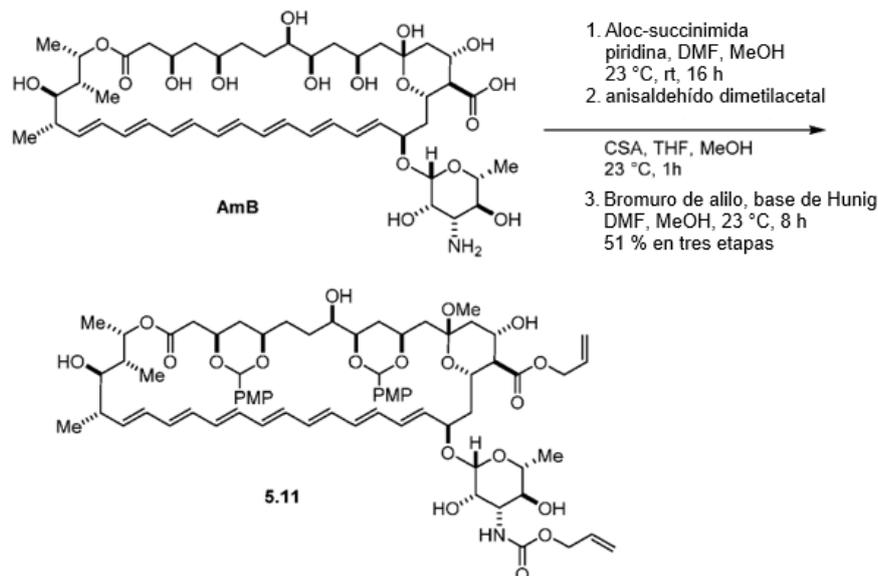
50

Síntesis del producto intermedio 5.11

55

60

65



25

A una suspensión agitada de AmB (4,0 g, 4,3 mmol, 1,0 equivalentes) en DMF:MeOH (75 ml:75 ml) en un fondo redondo de 300 ml a 23 °C, se añadió secuencialmente, piridina (5,0 ml, 50,0 mmol, 11,5 equivalentes) y aloc-succinimida (2,4 g, 12,05 mmol, 2,8 equivalentes). Después de agitar durante 16 h a 23 °C, la solución naranja oscura y homogénea se vertió lentamente en Et₂O (3,5 l) en agitación rápida. La suspensión amarilla se filtró a través de papel de filtro Whatman™ 42 y se lavó con Et₂O (3 x 100 ml) antes de que la torta se dejara secar completamente. El polvo amarillo de aloc-AmB completamente seco (4,3 mmol, cuantitativo) se llevó a la reacción posterior sin purificación adicional.

30

A una suspensión agitada de aloc-AmB (4,3 mmol, 1,0 equivalentes) en MeOH (35 ml, 0,1 M) en un matraz de fondo redondo de 300 ml a 23 °C se añadió anisaldehído dimetilacetal (4,0 ml, 23,5 mmol, 5,5 equivalentes) y se agitó durante 10 min hasta que se formó una suspensión muy fina y uniforme. Luego se añadió CSA (250 mg, 1,08 mmol, 0,25 equivalentes) como un sólido cristalino blanco en una porción. Después de agitar a 23 °C durante 30 min, se añadió Et₃N (~160 µl) seguido de THF (81 ml para diluir hasta 0,03 M). La reacción se vertió lentamente en hexano con agitación rápida (3,5 l). La suspensión amarilla posterior se filtró a través de papel de filtro Whatman 42 y se lavó con Et₂O (3 x 100 ml) antes de que la torta se dejara secar completamente. El aloc-bisPMP-metilcetal completamente seco (4,3 mmol, cuantitativo) se llevó a la reacción posterior como un polvo amarillo sin purificación adicional.

35

A una suspensión agitada de aloc-bisPMP-metilcetal (4,0 g, 4,3 mmol, 1,0 equivalentes) en DMF:MeOH (10:1) en un fondo redondo de 300 ml a 23 °C, se añadió secuencialmente, la base de Hunig (3,75 ml, 21,5 mmol, 5,0 equivalentes) y bromuro de alilo (11,2 ml, 129,0 mmol, 30 equivalentes). Después de agitar durante 8 h a 23 °C, la solución homogénea de color naranja oscuro se transfirió a un embudo separador que contenía EtOAc y H₂O desionizada (1:1). La fase orgánica se lavó con agua (3 x 200 ml) seguido de salmuera. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (SiO₂, gradiente de elución de EtOAc:Hex:MeOH 50:49:1 a EtOAc:Hex:MeOH 75:24:1) proporcionó 5.12 (2,83 g, 2,19 mmol, 51 %) como un sólido naranja.

40

45

50

55

60

5.11

60

$R_f = 0,21$ (EtOAc:Hex:MeOH 50:49:1)

¹H NMR: (500 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 7,43 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,38 - 7,33 (m, 2H), 6,90 - 6,82 (m, 4H), 6,48 - 6,18 (m, 11H), 6,05 - 5,84 (m, 3H), 5,59 (dd, $J = 14,3, 9,3$ Hz, 1H), 5,52 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 5,45 - 5,38 (m, 1H), 5,28 - 5,22 (m, 1H), 4,71 - 4,62 (m, 3H), 4,60 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 4,53 (q, $J = 7,2, 4,6$ Hz, 2H), 4,17 (tt, $J = 10,4, 6,0$ Hz, 2H), 3,95 (dd, $J = 9,9, 6,9$ Hz, 3H), 3,79 (d, $J = 2,9$ Hz, 7H), 3,77 - 3,66 (m, 3H), 3,61 (td, $J = 9,0, 3,2$ Hz, 1H), 3,45 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 3,39 (p, $J =$

65

6,8 Hz, 2H), 3,33 (q, $J = 8,6$ Hz, 3H), 3,08 (s, 2H), 2,36 - 2,25 (m, 3H), 1,96 - 1,88 (m, 2H), 1,88 - 1,78 (m, 3H), 1,73 (dt, $J = 16,4, 8,1$ Hz, 3H), 1,69 - 1,42 (m, 8H), 1,41 - 1,21 (m, 28H), 1,19 (p, $J = 5,2$ Hz, 4H), 1,13 - 1,08 (m, 5H), 1,02 (d, $J = 7,1$ Hz, 4H), 0,95 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H), 0,87 (dt, $J = 12,0, 7,0$ Hz, 22H).

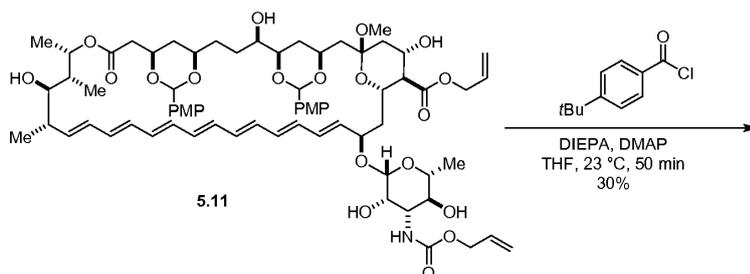
HRMS (ESI)

5

Calculado para $C_{71}H_{95}NO_{21}$ ($M + Na$) ⁺ :	1320,6294
Encontrado:	1320,6285

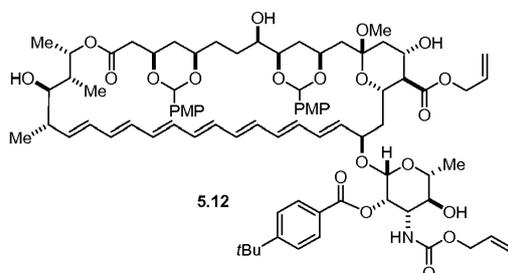
10 Síntesis del producto intermedio 5.12

15



20

25

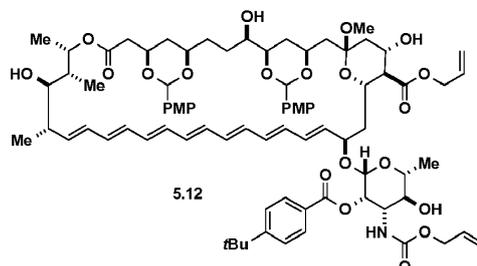


30

El producto intermedio 5.11 (2,83 g, 2,18 mmol, 1,0 equivalentes) se secó azeotrópicamente con benceno (3 x 10 ml) y se colocó a alto vacío durante toda la noche en un matraz de fondo redondo de 300 ml. Al producto intermedio 5.11 se añadió THF (74 ml) seguido de DIPEA (0,61 ml, 3,49 mmol, 1,6 equivalentes). En un matraz de fondo redondo de 200 ml separado se añadió secuencialmente, THF (46 ml), DMAP (426 mg, 3,49 mmol, 1,6 equivalentes) y cloruro de *p*-tercbutilbenzoilo gota a gota (595 μ l, 3,05 mmol, 1,4 equivalentes) formando una fina suspensión blanca. La mayor parte de esta suspensión se añadió lentamente gota a gota a través de una cánula a la solución de THF, DIPEA y 5.11 durante 50 min hasta que la mayoría del material de partida se convirtió según el criterio de TLC. La reacción se diluyó con EtOAc y se transfirió a un embudo separador que contenía bicarbonato de sodio saturado acuoso y se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (SiO_2 , gradiente de elución EtOAc:Hex:MeOH isocrático 65:33:2) proporcionó 5.11 (930 g, 0,654 mmol, 30 % de rendimiento) como un sólido naranja.

45

50



55

$R_f = 0,24$ (EtOAc:Hex:MeOH 65:33:2)

1H NMR: (500 MHz, $CD_3C(O)CD_3$) δ 8,07 - 7,89 (m, 2H), 7,64 - 7,48 (m, 2H), 7,38 (ddt, $J = 25,4, 8,0, 2,2$ Hz, 4H), 6,86 (ddd, $J = 9,5, 4,6, 2,4$ Hz, 4H), 6,46 - 6,11 (m, 10H), 6,10 - 5,96 (m, 3H), 5,96 - 5,82 (m, 3H), 5,82 - 5,65 (m, 1H), 5,58 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 5,52 - 5,38 (m, 2H), 5,33 - 5,18 (m, 1H), 5,11 (td, $J = 9,2, 7,5, 3,9$ Hz, 1H), 4,88 (s, 0H), 4,73 - 4,56 (m, 2H), 4,49 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 4,24 - 4,10 (m, 1H), 4,01 - 3,82 (m, 2H), 3,82 - 3,75 (m, 4H), 3,75 - 3,63 (m, 1H), 3,59 (td, $J = 9,6, 6,1$ Hz, 1H), 3,56 - 3,46 (m, 1H), 3,45 - 3,34 (m, 1H), 2,85 (s, 1H), 2,60 (s, 1H), 2,45 - 2,35 (m, 1H), 2,35 - 2,23 (m, 1H), 2,02 - 1,94 (m, 1H), 1,91 - 1,82 (m, 1H), 1,80 - 1,40 (m, 6H), 1,36 (d, $J = 3,6$ Hz, 8H), 1,32 - 1,26 (m, 3H), 1,22 - 1,15 (m, 2H), 1,12 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 1,01 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H).

65

HRMS (ESI)

Calculado para C ₈₂ H ₁₀₇ NO ₂₂ (M + Na) ⁺ :	1480,7182
Encontrado:	1480,7172

5

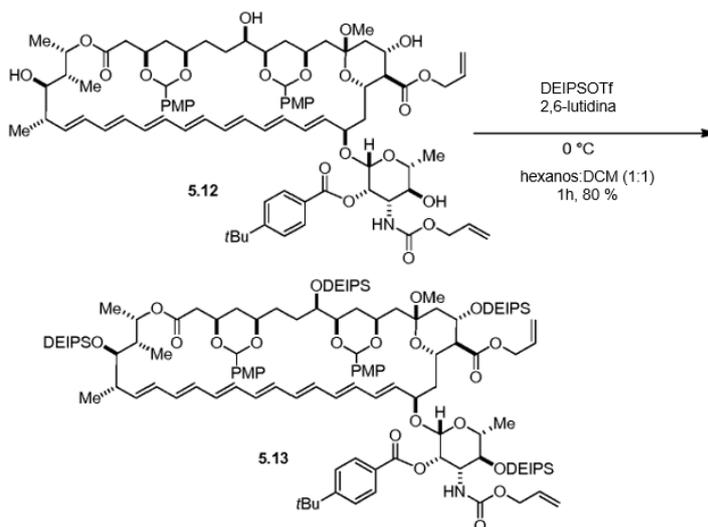
Síntesis del producto intermedio 5.13

10

15

20

25



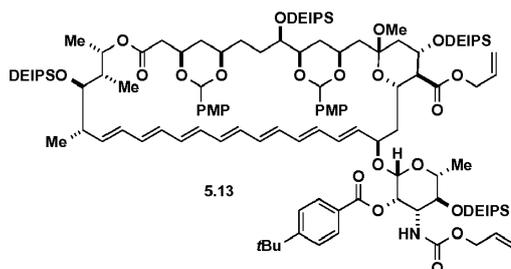
30

El producto intermedio 5.12 (910 mg, 0,624 mmol, 1,0 equivalentes) se secó azeotrópicamente con benceno (3 x 10 ml) y se colocó en alto vacío durante toda la noche en un matraz de fondo redondo de 300 ml. Al producto intermedio 5.13 se añadió DCM (10,5 ml) y hexanos (10,5 ml) seguido de 2,6-lutidina recién destilada (654 μ l, 5,61 mmol, 9,1 equivalentes) y se enfrió a 0 °C. Se añadió DEIPSOTf (743 μ l, 3,74 mmol, 6,0 equivalentes) gota a gota durante 10 min y se agitó durante otra hora. La reacción se transfirió a un embudo separador que contenía Et₂O y bicarbonato acuoso saturado y se extrajo con Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (SiO₂, gradiente de elución de EtOAc:Hex 1:9 a EtOAc:Hex 1:4) proporcionó 5.13 (980 mg, 0,5 mmol, 80 % de rendimiento) como un sólido naranja.

35

40

45



50

R_f = 0,21 (EtOAc:Hex 1:4)

¹H NMR: (500 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 8,07 - 7,95 (m, 2H), 7,65 - 7,54 (m, 2H), 7,37 - 7,31 (m, 4H), 6,94 - 6,81 (m, 6H), 6,41 - 6,32 (m, 5H), 6,32 - 6,24 (m, 3H), 6,20 - 6,13 (m, 3H), 6,10 - 5,84 (m, 4H), 5,72 (ddd, *J* = 21,6, 15,2, 6,4 Hz, 2H), 5,52 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 5,45 (q, *J* = 1,6 Hz, 0H), 5,41 (d, *J* = 10,3 Hz, 3H), 5,34 (dt, *J* = 10,3, 1,4 Hz, 1H), 5,27 (dq, *J* = 17,3, 1,8 Hz, 1H), 5,13 (dq, *J* = 10,4, 1,5 Hz, 1H), 4,91 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,71 - 4,62 (m, 2H), 4,62 - 4,55 (m, 2H), 4,52 (dt, *J* = 5,6, 1,6 Hz, 2H), 4,33 - 4,25 (m, 1H), 4,19 - 4,08 (m, 1H), 4,07 - 3,94 (m, 1H), 3,93 - 3,81 (m, 3H), 3,81 - 3,73 (m, 10H), 3,72 - 3,60 (m, 4H), 3,51 (dq, *J* = 8,8, 6,1 Hz, 1H), 2,75 (s, 3H), 2,53 - 2,39 (m, 2H), 2,27 (dd, *J* = 17,7, 4,4 Hz, 1H), 2,23 - 2,11 (m, 2H), 2,09 (s, 7H), 1,99 - 1,94 (m, 1H), 1,89 (ddt, *J* = 12,5, 8,0, 3,9 Hz, 1H), 1,78 - 1,56 (m, 5H), 1,56 - 1,41 (m, 4H), 1,37 (d, *J* = 3,4 Hz, 14H), 1,32 - 1,21 (m, 6H), 1,21 - 1,11 (m, 7H), 1,09 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,07 - 0,76 (m, 79H), 0,76 - 0,65 (m, 12H), 0,61 - 0,49 (m, 7H), 0,43 (dq, *J* = 14,1, 7,9, 1,7 Hz, 5H).

55

60

¹³C NMR: (126 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 172,60, 170,01, 166,28, 160,93, 160,80, 157,48, 157,01, 138,66, 135,17, 134,93, 134,66, 134,40, 134,27, 134,01, 133,67, 133,05, 132,92, 132,79, 132,29, 131,26, 130,93, 130,90, 129,29, 129,12, 128,87, 128,47, 127,24, 126,28, 119,43, 117,28, 114,09, 114,08, 113,99, 102,02, 101,18, 100,78, 96,73, 81,57, 75,89, 75,03, 74,97, 74,17, 73,14, 73,02, 72,98, 68,92, 66,82, 65,95, 65,84, 58,56, 57,01, 55,68, 48,58, 43,99, 42,91, 41,29, 38,08, 36,90, 35,90, 33,75, 32,97, 31,64, 30,77, 28,14, 19,27, 18,24, 18,19, 18,07, 18,01, 17,70, 17,68, 14,19, 14,17, 14,03, 13,76, 7,94, 7,90, 7,82, 7,77, 7,72, 7,71, 7,48, 7,36, 5,21, 5,10, 4,94, 4,89, 4,69, 4,44.

65

HRMS (ESI)

Calculado para $C_{110}H_{171}NO_{22}$ ($M + Na$) ⁺ :	1993,1268
Encontrado:	1993,1189

5

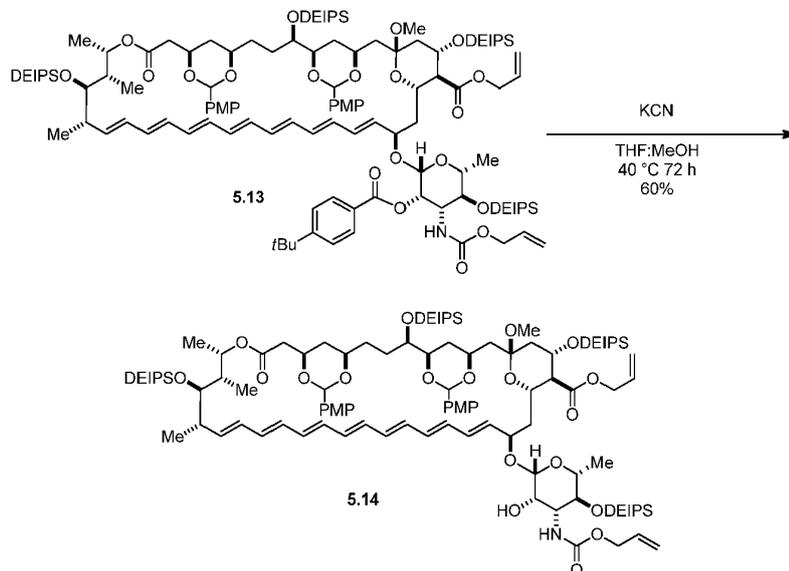
Síntesis del producto intermedio 5.14

10

15

20

25



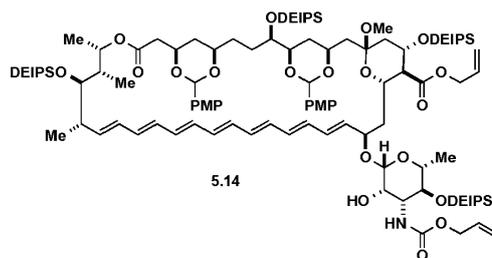
30

El producto intermedio 5.13 (980 mg, 0,497 mmol, 1,0 equivalentes) se secó azeotrópicamente con benceno (3 x 10 ml) y se colocó en alto vacío durante toda la noche en un iChem de 40 ml. Al producto intermedio 5.13 se añadió THF (6,2 ml) y MeOH (12,3 ml) seguido de KCN (48,5 mg, 0,745 mmol, 1,5 equivalentes) colocado bajo atmósfera de Ar y se calentó a 40 ° C y agitó durante 72 h. La reacción se transfirió a un embudo separador que contenía Et₂O y bicarbonato acuoso saturado. La fase orgánica se lavó con agua seguido de salmuera. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (SiO₂, gradiente de elución de EtOAc:Hex 1:9 a EtOAc:Hex 1:4) proporcionó 5.14 (542 mg, 0,298 mmol, 60 % de rendimiento) como un sólido naranja.

35

40

45



50

$R_f = 0,22$ (EtOAc:Hex 3:7)

¹H NMR: (500 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 7,43 - 7,30 (m, 5H), 6,92 - 6,79 (m, 5H), 6,48 - 6,14 (m, 12H), 6,11 (dd, $J = 15,0, 10,0$ Hz, 1H), 6,03 - 5,89 (m, 3H), 5,88 - 5,73 (m, 2H), 5,43 (d, $J = 3,6$ Hz, 3H), 5,37 (dq, $J = 21,8, 1,6$ Hz, 1H), 5,33 - 5,26 (m, 2H), 5,17 (dq, $J = 10,6, 1,5$ Hz, 1H), 4,79 (s, 1H), 4,71 - 4,48 (m, 7H), 4,27 (td, $J = 10,6, 4,7$ Hz, 1H), 4,21 - 4,11 (m, 1H), 3,95 - 3,82 (m, 4H), 3,79 (s, 4H), 3,78 (s, 4H), 3,77 - 3,63 (m, 6H), 3,54 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,38 - 3,26 (m, 1H), 2,49 (dd, $J = 17,6, 7,6$ Hz, 1H), 2,43 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H), 2,32 - 2,24 (m, 3H), 1,96 (s, 3H), 1,94 - 1,86 (m, 2H), 1,82 - 1,67 (m, 3H), 1,66 - 1,57 (m, 2H), 1,58 - 1,27 (m, 7H), 1,26 (d, $J = 6,1$ Hz, 4H), 1,23 - 1,10 (m, 8H), 1,10 - 0,86 (m, 58H), 0,86 - 0,76 (m, 15H), 0,70 (td, $J = 8,2, 4,4, 2,9$ Hz, 11H), 0,63 - 0,48 (m, 5H), 0,48 - 0,36 (m, 4H).

55

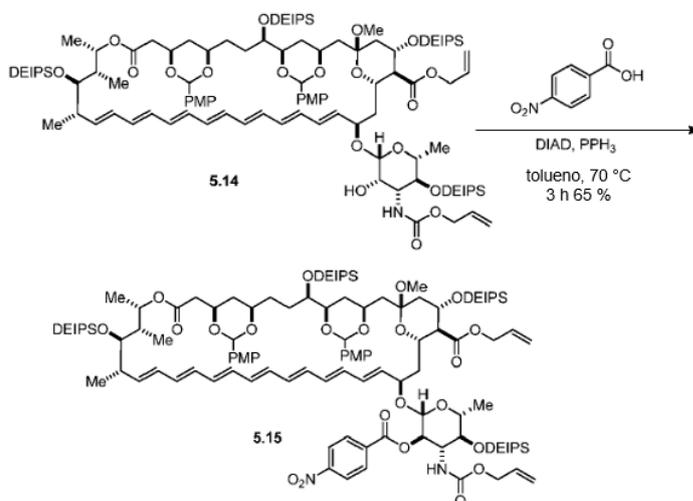
HRMS (ESI)

Calculado para $C_{99}H_{159}NO_{21}$ ($M + Na$) ⁺ :	1833,0379
Encontrado:	1833,0355

60

Síntesis del producto intermedio 5.15

65



5

10

15

20

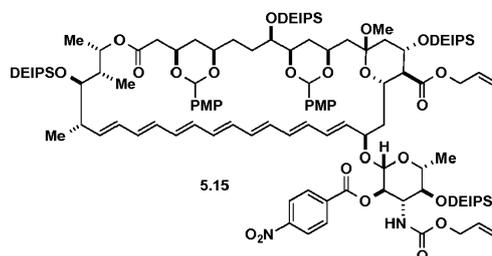
25

30

El producto intermedio 5.14 (271 mg, 0,15 mmol, 1,0 equivalentes) se secó azeotrópicamente con benceno (3 x 10 ml) y se colocó en alto vacío durante toda la noche en un iChem de 40 ml. Al producto intermedio 5.14 se le añadió ácido p-nitrobenzoico (103 mg, 0,621 mmol, 4,15 equivalentes), PPh_3 (179 mg, 0,674 mmol, 4,5 equivalentes) y tolueno (5 ml). La solución se enfrió a 0°C y se añadió DIAD (132 μl , 0,674 mmol, 4,5 equivalentes) gota a gota y se agitó a 0°C durante 1 h. La reacción se calentó después a 70°C durante 3 h. La reacción se transfirió a un embudo separador que contenía Et_2O y bicarbonato de sodio saturado acuoso. La fase orgánica se lavó con agua seguido de salmuera. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con Et_2O . Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (SiO_2 , gradiente de elución de $\text{EtOAc}:\text{Hex}$ 1:9 a $\text{EtOAc}:\text{Hex}$ 1:4) proporcionó nitrobenzoato C2'epi 5.15 (80,4 mg, 40,4 μmol , 27 % de rendimiento) como un sólido naranja.

35

40



$R_f = 0,2$ ($\text{EtOAc}:\text{Hex}$ 1:4)

45

$^1\text{H NMR}$: (500 MHz, $\text{CD}_3\text{C}(\text{O})\text{CD}_3$) δ 8,37 (s, 4H), 7,37 - 7,30 (m, 4H), 6,89 - 6,81 (m, 5H), 6,50 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 6,45 - 6,09 (m, 15H), 6,07 - 5,95 (m, 1H), 5,86 (ddd, $J = 19,1, 14,5, 5,8$ Hz, 2H), 5,67 (ddt, $J = 17,3, 10,6, 5,4$ Hz, 1H), 5,47 - 5,39 (m, 2H), 5,35 (s, 1H), 5,30 (dq, $J = 10,4, 1,3$ Hz, 1H), 5,15 (dd, $J = 10,4, 7,9$ Hz, 1H), 5,08 (dq, $J = 17,2, 1,7$ Hz, 1H), 4,92 (dq, $J = 10,5, 1,4$ Hz, 1H), 4,82 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,79 - 4,69 (m, 2H), 4,61 (qdt, $J = 13,1, 6,0, 1,4$ Hz, 3H), 4,33 (qdt, $J = 13,6, 5,4, 1,5$ Hz, 2H), 4,18 - 4,09 (m, 1H), 3,97 (td, $J = 10,6, 4,6$ Hz, 1H), 3,90 - 3,81 (m, 3H), 3,77 (d, $J = 2,9$ Hz, 8H), 3,75 - 3,63 (m, 7H), 3,52 (dq, $J = 9,0, 6,1$ Hz, 1H), 2,69 (s, 3H), 2,53 - 2,39 (m, 2H), 2,34 - 2,21 (m, 1H), 2,19 - 2,07 (m, 2H), 2,04 - 1,98 (m, 1H), 1,88 (dddd, $J = 12,9, 10,2, 6,6, 3,8$ Hz, 1H), 1,79 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 1,76 - 1,64 (m, 2H), 1,61 (dt, $J = 13,0, 2,5$ Hz, 1H), 1,56 - 1,40 (m, 5H), 1,37 - 1,24 (m, 14H), 1,23 - 1,12 (m, 8H), 1,10 - 0,95 (m, 45H), 0,94 - 0,84 (m, 19H), 0,84 - 0,76 (m, 13H), 0,74 - 0,60 (m, 15H), 0,53 (dq, $J = 26,8, 7,8, 3,2$ Hz, 5H), 0,42 - 0,28 (m, 5H).

50

55

$^{13}\text{C NMR}$: (126 MHz, $\text{CD}_3\text{C}(\text{O})\text{CD}_3$) δ 173,00, 170,05, 164,87, 160,93, 160,79, 157,06, 151,67, 138,05, 136,54, 134,87, 134,73, 134,64, 134,56, 134,45, 134,16, 133,82, 133,65, 133,35, 132,91, 132,75, 132,48, 132,40, 131,84, 130,96, 128,86, 128,47, 127,65, 124,39, 119,57, 117,11, 114,07, 113,98, 101,97, 101,21, 100,71, 98,47, 81,53, 76,09, 76,00, 75,09, 74,92, 73,67, 73,04, 72,94, 68,84, 66,84, 66,12, 65,56, 59,60, 58,12, 55,66, 55,12, 48,39, 43,94, 42,99, 41,32, 38,08, 36,35, 33,68, 32,96, 28,21, 22,01, 18,87, 18,20, 18,14, 18,00, 17,98, 17,93, 17,62, 17,60, 14,15, 14,12, 14,02, 13,67, 7,90, 7,86, 7,76, 7,73, 7,69, 7,66, 7,36, 5,15, 5,06, 4,93, 4,91, 4,88, 4,63, 4,36.

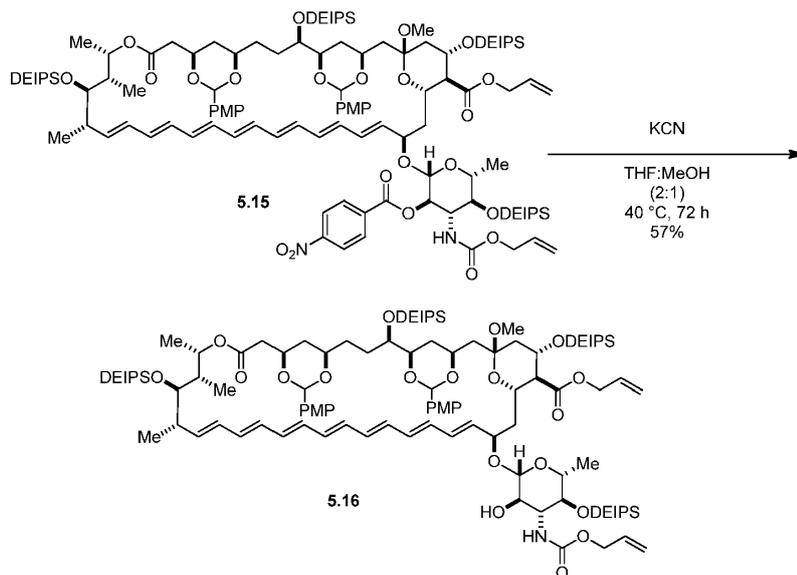
HRMS (ESI)

60

Calculado para $\text{C}_{106}\text{H}_{162}\text{N}_2\text{O}_{24}\text{Si}_4$ (M + Na) +:	1982,0492
Encontrado:	1982,0464

65

Síntesis del producto intermedio 5.16



5

10

15

20

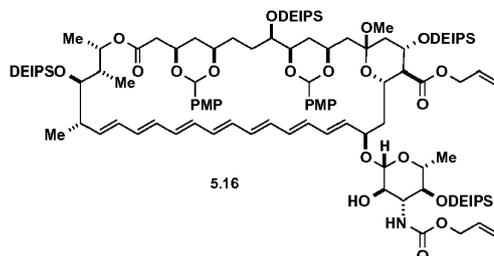
25

30

El producto intermedio 5.15 (80,4 g, 40,4 μmol , 1,0 equivalentes) se secó azeotrópicamente con benceno (3 x 10 ml) y se colocó en un alto vacío durante toda la noche en un iChem de 7 ml. Al producto intermedio 5.15 se le añadió THF (1,0 ml) y MeOH (0,5 ml) seguido de KCN (4,08 mg, 61,4 μmol , 1,5 equivalentes), se colocó bajo una atmósfera de Ar y se calentó a 40 °C y se agitó durante 72 h. La reacción se transfirió a un embudo separador que contenía Et₂O y bicarbonato acuoso saturado. La fase orgánica se lavó con agua seguido de salmuera. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía rápida (SiO₂, gradiente de elución de EtOAc:Hex 1:9 a EtOAc:Hex 1:4) proporcionó 5.16 (42,6 mg, 23,4 μmol , 57 % de rendimiento) como un sólido naranja.

35

40



R_f = 0,2 (EtOAc:Hex 3:7)

45

¹H NMR: (500 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 7,43 - 7,32 (m, 4H), 6,87 (ddd, *J* = 13,9, 8,9, 2,1 Hz, 4H), 6,47 - 6,15 (m, 13H), 6,10 (dd, *J* = 15,1, 10,0 Hz, 1H), 6,06 - 5,82 (m, 3H), 5,78 (dd, *J* = 15,1, 8,6 Hz, 1H), 5,43 (d, *J* = 6,0 Hz, 3H), 5,36 (dt, *J* = 31,2, 1,6 Hz, 1H), 5,31 - 5,25 (m, 1H), 5,16 (dt, *J* = 10,7, 1,5 Hz, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,66 - 4,55 (m, 3H), 4,51 (td, *J* = 4,9,3,9, 1,5 Hz, 2H), 4,37 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 4,33 - 4,23 (m, 1H), 4,22 - 4,12 (m, 1H), 4,01 - 3,82 (m, 3H), 3,79 (d, *J* = 1,8 Hz, 3H), 3,78 (d, *J* = 1,9 Hz, 3H), 3,76 - 3,66 (m, 4H), 3,43 (tt, *J* = 9,2, 3,9 Hz, 3H), 3,34 (h, *J* = 6,3 Hz, 1H), 3,05 (d, *J* = 1,9 Hz, 3H), 2,49 (dd, *J* = 17,6, 7,7 Hz, 1H), 2,46-2,38 (m, 1H), 2,27 (dt, *J* = 14,3, 4,6 Hz, 3H), 2,09 (d, *J* = 1,6 Hz, 4H), 2,01 - 1,93 (m, 1H), 1,93 - 1,85 (m, 2H), 1,85 - 1,77 (m, 1H), 1,73 (q, *J* = 10,2, 9,4 Hz, 1H), 1,68 - 1,38 (m, 7H), 1,31 (q, *J* = 10,9 Hz, 5H), 1,24 (t, *J* = 5,4 Hz, 4H), 1,22 - 1,16 (m, 6H), 1,10 - 0,86 (m, 52H), 0,86 - 0,75 (m, 14H), 0,69 (dddd, *J* = 13,6, 11,6, 8,0, 3,8 Hz, 10H), 0,63 - 0,49 (m, 4H), 0,49 - 0,34 (m, 4H).

50

¹³C NMR: (126 MHz, CD₃C(O)CD₃) δ 173,37, 170,15, 160,95, 160,81, 157,34, 137,97, 134,87, 134,84, 134,77, 134,74, 134,35, 134,15, 133,96, 133,77, 133,56, 133,36, 132,90, 132,78, 132,42, 131,08, 129,69, 128,90, 128,50, 119,55, 117,30, 114,08, 114,01, 103,12, 102,07, 101,27, 100,90, 81,60, 76,29, 76,20, 75,23, 74,59, 73,32, 73,28, 72,97, 69,07, 67,63, 66,27, 65,64, 61,38, 57,67, 55,66, 48,58, 44,14, 43,33, 41,41, 38,08, 37,66, 33,73, 32,93, 30,76, 28,33, 19,26, 19,11, 18,21, 18,14, 18,05, 18,02, 18,00, 17,69, 17,67, 14,15, 14,04, 13,72, 7,90, 7,87, 7,80, 7,78, 7,75, 7,71, 7,47, 7,45, 5,18, 5,06, 5,02, 4,96, 4,90, 4,88, 4,66,4,43.

55

HRMS (ESI)

60

Calculado para C ₉₉ H ₁₅₉ NO ₂₁ Si ₄ (M + Na) +:	1833,0379
Encontrado:	1833,0309

65 Ejemplo 2. C2'epiAmB se une al ergosterol pero no al colesterol

Se investigó la capacidad de unión de C2'epiAmB para determinar si la epimerización en C2' afecta la capacidad de AmB para unirse al ergosterol. C2'epiAmB se une al ergosterol, pero no al colesterol, dentro de los límites del ensayo de unión, como se indica en la figura 6.

- 5 Los datos de ITC para C2'epiAmB son los siguientes:
 Sin esterol: Exoterma total = $-6,70 \pm 0,11$ μ cal.
 10 % de ergosterol: Exoterma total = $-15,24 \pm 1,66$ μ cal.
 10 % de colesterol: Exoterma total = $-6,43 \pm 2,80$ μ cal.

- 10 A continuación, se describen técnicas ilustrativas para realizar el ensayo de unión.

Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

- 15 En un ensayo optimizado basado en calorimetría de titulación isotérmica (ITC), se tituló una solución acuosa de AmB con una suspensión de vesículas unilamelares grandes (LUV) compuestas sólo de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), y se registró la exoterma neta. La titulación se repitió con el uso de las LUV de POPC que contenían 10 % de ergosterol. Se observó un aumento significativo en la exoterma neta al cambiar a las LUV que contenían ergosterol, lo que indica una interacción directa de unión de AmB-esteroles. La titulación se repitió con el uso de C2'epiAmB. Un aumento significativo en la exoterma neta indicó una capacidad retenida para que el derivado epimérico se una al ergosterol. El ensayo de ITC también se realizó con colesterol en lugar de ergosterol. No se encontró que C2'epiAmB se uniera al colesterol.

Información General

- 25 Los experimentos se realizaron con el uso un calorímetro de titulación isotérmica NanoITC (Instrumentos TA, Wilmington, DE). Las soluciones de los compuestos a probar se prepararon diluyendo una solución madre de 60,0 mM del compuesto en DMSO a 600 μ M con tampón K (HEPES/KHEPES al 5,0 mM, pH = 7,4). La concentración final de DMSO en la solución fue de 1 % v/v. Se prepararon grandes vesículas unilamelares compuestas sólo de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (LUV de POPC) y se cuantificó el contenido de fósforo y ergosterol como se describe a continuación. Las soluciones de LUV se diluyeron con tampón y DMSO para dar una concentración final de fosfolípidos de 12,0 mM en una solución tampón de DMSO/K al 1 %. Inmediatamente antes del uso, todas las soluciones se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y se desgasificaron al vacío a 37 °C durante 10 minutos. La celda de referencia del instrumento (volumen = 0,190 ml) se llenó con una solución tampón de DMSO/K al 1 % v/v.

- 35 Preparación de LUV

- Se obtuvo palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC) como una solución de 20 mg/ml en CHCl_3 de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) y se almacenó a -20 °C bajo una atmósfera de argón seco y se usó dentro de 1 mes. Se preparó mensualmente una solución de 4 mg/ml de ergosterol en CHCl_3 y se almacenó a 4 °C bajo una atmósfera de argón seco.
- 40 Antes de preparar una película lipídica, las soluciones se calentaron a temperatura ambiente para evitar que la condensación contaminara las soluciones. Se cargó un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con 800 μ l de POPC y 230 μ l de la solución de ergosterol. Se cargó un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con 800 μ l de POPC y 224 μ l de la solución de ergosterol para los liposomas que contenían ergosterol. Para los liposomas libres de esteroides, se cargó un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con 800 μ l de POPC. El solvente se eliminó con un flujo suave de nitrógeno y la película lipídica resultante se almacenó a alto vacío durante un mínimo de ocho horas antes de su uso. La película se hidrató después con 1 ml de tampón K y se agitó vigorosamente durante aproximadamente 3 minutos para formar una suspensión de vesículas multilamelares (MLV). La suspensión de lípidos resultante se introdujo en una jeringuilla hermética Hamilton (Reno, NV) de 1 ml y se colocó en una Avanti Polar Lipids Mini-Extruder. La solución lipídica se pasó después 21 veces a través de un filtro de policarbonato Millipore (Billerica, MA) de 0,20 μ m, la suspensión de vesículas unilamelares grandes (LUV) recién formada se recolectó en la jeringuilla que no contenía la suspensión original de las MLV para evitar el arrastre de las MLV en la solución de LUV.

Determinación del contenido de fósforo

- 55 La determinación del fósforo total se adaptó del informe de Chen y colegas. Chen, PS y otros (1956) Anal. Chem. 28:1756. La solución de LUV se diluyó diez veces con tampón K y se añadieron tres muestras de 10 μ l de la suspensión de LUV diluida en tres viales separados de 7 ml. Posteriormente, el solvente se eliminó con una corriente de N_2 . A cada película de LUV seca, y a un cuarto vial que no contenía lípidos que se usó como blanco, se añadieron 450 μ l de H_2SO_4 8,9 M. Las cuatro muestras se incubaron abiertas a la atmósfera ambiente en un bloque de calentamiento de aluminio a 225 °C durante 25 min y después se retiraron a 23 °C y se enfriaron durante 5 minutos. Después de enfriar, se añadieron 150 μ l de peróxido de hidrógeno acuoso al 30 % p/v a cada muestra, y los viales se devolvieron al bloque de calentamiento a 225 °C durante 30 minutos. Las muestras se retiraron después a 23 °C y se enfriaron durante 5 minutos antes de la adición de 3,9 ml de agua. Luego se añadieron 500 μ l de molibdato de amonio al 2,5 % p/v a cada vial y las mezclas resultantes se agitaron en vórtex brevemente y vigorosamente cinco veces. Posteriormente, se añadieron 500 μ l de ácido ascórbico al 10 % p/v a cada vial y las mezclas resultantes se agitaron en vórtex brevemente y vigorosamente cinco veces. Los viales se taparon con una tapa recubierta de PTFE y después se colocaron en un bloque de calentamiento de aluminio a

100 °C durante 7 minutos. Las muestras se retiraron a 23 °C y se enfriaron durante aproximadamente 15 minutos antes del análisis mediante espectroscopía UV/Vis. El fósforo total se determinó observando la absorbancia a 820 nm y comparando este valor con una curva estándar obtenida a través de este método y una solución de fósforo estándar de concentración conocida.

5

Determinación del contenido de ergosterol

10

El contenido de ergosterol se determinó por espectrofotometría. Se añadió una porción de 50 µl de la suspensión de LUV a 450 µl de hexano:isopropanol:agua 2:18:9 (v/v/v). Se prepararon tres muestras independientes y después se agitaron vigorosamente durante aproximadamente un minuto. Las soluciones se analizaron después por espectroscopía UV/Vis y la concentración del ergosterol en solución se determinó por el coeficiente de extinción de 10400 l mol⁻¹ cm⁻¹ en la UV_{máx} de 282 nm y se comparó con la concentración de fósforo para determinar el porcentaje de contenido de esteroides. El coeficiente de extinción se determinó independientemente en el sistema de solvente ternario anterior. Las LUV preparadas por este método contenían entre 7 y 14 % de ergosterol.

15

Experimento de titulación

20

Las titulaciones se realizaron inyectando la suspensión de LUV a temperatura ambiente en la celda de muestra (volumen = 0,191 ml) que contenía la solución 600 µM del compuesto en cuestión a 25 °C. El volumen de la primera inyección fue de 0.23 µl. De acuerdo con el procedimiento estándar (Heerklotz, H y otros (2000) Biochim. Biophys Acta 1508:69), debido al gran error comúnmente asociado con la primera inyección de los experimentos de ITC, el calor de esta inyección no se incluyó en el análisis de los datos. A continuación, se realizaron seis inyecciones de 7,49 µl de la suspensión de LUV. El espacio entre cada inyección fue de 720 segundos para garantizar que el instrumento volviera a una línea base estable antes de que se realizara la siguiente inyección. La tasa de agitación para cada experimento fue de 300 rpm.

25

Análisis de Datos

30

El software NanoAnalyze (Instrumentos TA) se usó para la determinación de la línea base y la integración de los calores de inyección, y se usó Microsoft Excel para la resta de los calores de dilución y el cálculo del calor general evolucionado. Para corregir la dilución y los calores de mezcla, el calor de la inyección final de cada ciclo se restó de todos los calores de inyección para ese experimento en particular. Ver, por ejemplo, te Welscher, YM y otros (2008) J. Biol. Chem. 283:6393. Mediante este método, el calor promedio generado durante el experimento se calculó con el uso de la siguiente fórmula:

35

$${}^{\text{cal}}_{\text{total}} = \sum_{i=1}^n (\Delta h_{\text{inyección}}^i - \Delta h_{\text{inyección}}^n)$$

donde i = número de inyección, n = número total de inyecciones,

40

$$\Delta h_{\text{inyección}}^i =$$

temperatura de la i^{ma} inyección,

$$\Delta h_{\text{inyección}}^n =$$

45

el calor de la inyección final del experimento.

Ejemplo 3. C2'epiAmB ejerce actividad antifúngica *in vitro*

50

Se probó la actividad de AmB, C2'deOAmB y C2'epiAmB contra dos cepas de levadura que contenían ergosterol, *S. cerevisiae* y *C. albicans*. *C. albicans* representa la causa más común de infecciones fúngicas sistémicas potencialmente mortales en seres humanos. Como se muestra en la Figura 5, C2'epiAmB demostró una potente actividad antifúngica contra ambos *S. cerevisiae* (MIC = 2 µM) y *C. albicans* (MIC = 2 µM).

55

Los métodos ilustrativos para los ensayos de actividad antifúngica son los siguientes:

Condiciones de crecimiento para *S. cerevisiae*

60

S. cerevisiae se mantuvo con medios de crecimiento de levadura peptona dextrosa (YPD) que consta de 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de dextrosa y 20 g/l de agar para medios sólidos. El medio se esterilizó en autoclave a 250 °F durante 30 min. Posteriormente se añadió dextrosa como una solución estéril en agua al 40 % p/v (las soluciones de dextrosa se esterizaron por filtración). Los medios sólidos se prepararon vertiendo medios estériles que contenían agar (20 g/l) sobre placas de poliestireno de 100 x 20 mm de Corning (Corning, NY). Los cultivos líquidos se incubaron a 30 °C en un agitador rotatorio y los sólidos se mantuvieron a 30 °C en una incubadora.

65

Condiciones de crecimiento para *C. albicans*

C. albicans se cultivó de manera similar a *S. cerevisiae* excepto que tanto los cultivos líquidos como los sólidos se incubaron a 37 °C.

Ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) de microdilución en caldo de cultivo

5 El protocolo para el ensayo de microdilución en caldo de cultivo se adaptó del documento M27-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing, M27-A2, Approved Standard, 2da edición. Vol. 22, número 15, 2002. Se inocularon 50 ml de medio YPD y se incubaron durante toda la noche a 30 °C (*S. cerevisiae*) o 37 °C (*C. albicans*) en una incubadora con agitador.

10 La suspensión celular se diluyó después con YPD a una DO₆₀₀ de 0,10 (~5 x 10⁵ ufc/ml) medida con un espectrofotómetro UV/Vis PharmaSpec UV-1700 de Shimadzu (Kioto, Japón). La solución se diluyó 10 veces con YPD, y se añadieron alícuotas de 195 µl de la suspensión celular diluida en placas estériles de 96 pocillos Microtest Falcon (Franklin Lakes, NJ) por triplicado. Los compuestos se prepararon como soluciones madre 400 µM (AmB, C2'deOAmB) o 2 mM (AmdeB) en DMSO y se diluyeron en serie a las siguientes concentraciones con DMSO: 1600, 1200, 800, 400, 320, 240, 200, 160,

15 120, 80, 40, 20, 10 y 5 µM. Se añadieron alícuotas de 5 µl de cada solución a la placa de 96 pocillos por triplicado, donde cada columna representa una concentración diferente del compuesto de prueba. La concentración de DMSO en cada pocillo fue del 2,5 % y también se realizó por triplicado un pocillo control para confirmar la viabilidad solo con el uso de DMSO al 2,5 %. Esta dilución de 40 veces produjo las siguientes concentraciones finales: 50, 40, 30, 20, 10, 8, 6, 4, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 µM. Las placas se cubrieron y se incubaron a 30 °C (*S. cerevisiae*) o 37 °C (*C. albicans*) durante 24

20 horas antes del análisis. Se determinó que la MIC era la concentración del compuesto que no resultaba en un crecimiento visible de la levadura. Los experimentos se realizaron por duplicado y el MIC informado representa un promedio de dos experimentos.

Ejemplo 4. C2'epiAmB no es tóxico para las células humanas *in vitro*

25 Finalmente, se investigó la actividad de AmB, de C2'deOAmB y de C2'epiAmB contra las células humanas. Dos de los efectos secundarios tóxicos más importantes asociados con AmB son la anemia y la nefrotoxicidad causada por el daño a los glóbulos rojos y a las células del túbulo proximal renal, respectivamente.^{5a,15} De acuerdo con la literatura precedente, la AmB causa el 90 % de hemólisis de los glóbulos rojos humanos a una concentración de 8,5 µM. Esto se define como la concentración mínima hemolítica (MHC). En marcado contraste, encontramos que las MHC correspondientes para C2'deOAmB y C2'epiAmB, que no se unen al colesterol, fueron >500 µM (Figura 5). De manera similar, la AmB causa una pérdida del 90 % de la viabilidad celular de las células epiteliales del túbulo proximal renal primario humano a una concentración de 2,4 µM (la concentración mínima tóxica (MTC)). Nuevamente, en marcado contraste con la AmB, tanto C2'deOAmB como C2'epiAmB no mostraron evidencia de toxicidad hasta sus límites de solubilidad.¹⁶

30 Los métodos ilustrativos para los ensayos de toxicidad son los siguientes:

Ensayos de hemólisis

Preparación de eritrocitos

40 El protocolo para el ensayo de hemólisis se adaptó del informe de Paquet y colegas. Paquet, V y otros (2008) Chem. Eur. J. 14:2465-2481. Se adquirió sangre humana total (heparina de sodio) de Bioreclamation LLC (Westbury, NY) y se almacenó a 4 °C y se usó dentro de los dos días posteriores a la recepción. A un tubo Eppendorf de 2,0 ml, se añadió 1 ml de sangre humana total y se centrifugó a 10 000 g durante 2 minutos. El sobrenadante se retiró y el sedimento de eritrocitos se lavó con 1 ml de solución salina estéril y se centrifugó a 10 000 g durante 2 minutos. El lavado con solución salina se repitió por un total de tres veces. El sedimento de eritrocitos se suspendió en 1 ml de tampón RBC (NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4) para formar la suspensión madre de eritrocitos.

45

Ensayo de concentración mínima de hemólisis (MHC)

50 Los compuestos se prepararon como soluciones madre 1,03 mM (AmB) o 12,8 mM (C2'deOAmB y C2'epiAmB) en DMSO y se diluyeron en serie con DMSO a las siguientes concentraciones: 7689, 5126, 2563, 2050, 1538, 1025, 769, 513, 384, 256, 205, 154, 103, 77, 51, 26 µM. A un vial de PCR de 0,2 ml, se añadieron 24 µl de tampón RBC y 1 µl de solución madre compuesta, lo que produjo concentraciones finales de 500, 300, 200, 100, 80, 60, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1 µM. Los controles positivos y negativos se prepararon agregando 1 µl de DMSO al agua MilliQ o al tampón RBC respectivamente, a un vial de PCR de 0,2 ml. A cada vial de PCR, se añadieron 0,63 µl de la suspensión de reserva de eritrocitos y se mezcló por inversión. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Las muestras se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 10 000 g durante 2 minutos. Se añadieron 15 µl del sobrenadante de cada muestra a una sitio de 384 pocillos. Las absorbancias se leyeron a 540 nm con el uso de Biotek HI Synergy Hybrid Reader (Wanooski, VT). Los experimentos se realizaron por triplicado y la MHC informada representa un promedio de tres experimentos.

55

60

Análisis de Datos

El porcentaje de hemólisis se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

65

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{Abs_{muestra} - Abs_{neg.}}{Abs_{pos.} - Abs_{neg.}} \times 100\%$$

5 Se graficó la concentración en función del porcentaje de hemólisis y se ajustó a un ajuste de respuesta a la dosis logística de 4 parámetros (4PL) con el uso de OriginPro 8.6. Sebaugh, JL (2011) *Pharmaceut. Statist.* 10:128-134. La MHC se definió como la concentración que causa el 90 % de hemólisis.

Ensayos de proliferación celular WST-8

10

Preparación de células epiteliales del túbulo proximal renal primario

15 Las células epiteliales del túbulo proximal renal primario humano (RPTEC) se adquirieron de ATCC (Manassas, VA) y una vez recibidas se cultivaron inmediatamente. Se preparó un medio de crecimiento completo con el uso de un medio basal de células epiteliales renales (ATCC, PCS-400-030), un estuche de crecimiento de células epiteliales renales (ATCC, PCS-400-040) y penicilina-estreptomicina (10 unidades/ml y 10 µg/ml). Los medios completos se almacenaron a 4 °C en la oscuridad y se usaron dentro de los 28 días. Las RPTEC primarias se cultivaron en una incubadora de CO₂ a 37 °C con una atmósfera de 95 % de aire/5 % de CO₂.

20 Preparación del reactivo WST-8

El estuche de ensayo de proliferación celular WST-8 (10010199) se adquirió de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI) se almacenó a -20 °C y se usó dentro de los 6 meses posteriores a la recepción. El reactivo WST-8 y la solución mediadora de electrones se descongelaron y se mezclaron para preparar la solución del reactivo WST-8. La solución se almacenó a -20 °C y se usó dentro de una semana.

25

Ensayo WST-8

30 Una suspensión de RPTEC primarias en medios de crecimiento completos se ajustó a una concentración de 1 x 10⁵ células/ml. Se sembró una placa de 96 pocillos con 99 µl de la suspensión celular y se incubó a 37 °C con una atmósfera de 95 % de aire/5 % de CO₂ durante 3 horas. Se prepararon controles positivos y negativos sembrando con 100 µl de la suspensión celular o 100 µl del medio completo. Los compuestos se prepararon como soluciones madre 5 mM (AmB), 20 mM (C2'deOAmB) y 50 mM (C2'epiAmB) en DMSO y se diluyeron en serie con DMSO a las siguientes concentraciones: 50 000, 40 000, 30 000, 20 000, 10 000, 8000, 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 300, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25 y 0,1 µM. Se añadieron alícuotas de 1 µl de cada solución a la placa de 96 pocillos por triplicado, donde cada columna representa una concentración diferente del compuesto de prueba. La placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con una atmósfera de 95 % de aire/5 % de CO₂ durante 24 horas. Después de la incubación, se aspiraron los medios y se añadieron 100 µl de medio sin suero y 10 µl de la solución del reactivo WST-8 a cada pocillo. La placa de 96 pocillos se mezcló en una incubadora con agitación a 200 rpm durante 1 minuto y se incubó a 37 °C con una atmósfera de 95 % de aire/5 % de CO₂ durante 2 horas. Después de la incubación, la placa de 96 pocillos se mezcló en una incubadora con agitación a 200 rpm durante 1 minuto y se leyeron las absorbancias a 450 nm con el uso de Biotek H1 Synergy Hybrid Reader (Wanooski, VT). Los experimentos se realizaron por triplicado y la citotoxicidad informada representó un promedio de tres experimentos.

40

45 Análisis de Datos

El porcentaje de hemólisis se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$50 \quad \% \text{ hemólisis} = \frac{Abs_{muestra} - Abs_{neg.}}{Abs_{pos.} - Abs_{neg.}} \times 100\%$$

Se graficó la concentración en función del porcentaje de hemólisis y se ajustó a un ajuste de respuesta a la dosis logística de 4 parámetros (4PL)³ con el uso de OriginPro 8.6. La MTC se definió como la concentración que causa la pérdida del 90 % de la viabilidad celular.

55

Microscopía

60 Las células se observaron con el uso de un microscopio EVOS fl AMG (Bothell, WA). Las imágenes se tomaron con el uso de la luz transmitida a un objetivo de 10x.

Ejemplo 5. Evaluación de la actividad biológica in vivo

65 La eficacia antifúngica de C2'epiAmB se probó en un modelo de ratón de candidiasis diseminada. En este experimento, los ratones neutropénicos se infectaron con *C. albicans* a través de las venas de sus colas, y 2 horas después de la infección, se trataron con una inyección intraperitoneal única de 16 mg/kg de AmB o de C2'epiAmB. A las 24 horas pasada

la infección, los ratones se sacrificaron y se cuantificó la carga fúngica presente en sus riñones. Los resultados se muestran en la figura 7. C2'epiAmB fue más eficaz que AmB para reducir la carga fúngica presente en los riñones. En relación con AmB, C2'epiAmB redujo la carga fúngica en 0,5 unidades logarítmicas.

5 En un experimento separado, la toxicidad aguda se determinó mediante la administración intravenosa única de AmB o C2'epiAmB a ratones sanos, seguido del monitoreo de la letalidad. Los resultados se muestran en la figura 8. Todos los ratones en el grupo de dosificación de 4 mg/kg de AmB murieron en segundos. C2'epiAmB fue significativamente menos tóxica, sin muertes observadas incluso hasta una dosis de 16 mg/kg.

10 Referencias citadas

(1) Ermishkin, L. N.; Kasumov, K. M.; Potzeluyev, V. M. *Nature* 1976, 262, 698-699.

15 (2) (a) Monk, B. C.; Goffeau, A. *Science* 2008, 321, 367-369. (b) Cannon, R. D.; Lamping, E.; Holmes, A. R.; Niimi, K.; Tanabe, K.; Niimi, M.; Monk, B. C. *Microbiol.* 2007, 153, 3211-3217.

(3) Mora-Duarte, J.; Betts, R.; Rotstein, C.; Colombo, A. L.; Thompson-Moya, L.; Smietana, J.; Lupinacci, R.; Sable, C.; Kartsonis, N.; Perfect, J. N. *Engl. J. Med.* 2002, 347, 2020-2029.

20 (4) (a) Johnson, R. H.; Einstein, H. E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007, 1111, 434-441. (b) Schneemann, M.; Imhof, A. N. *Engl. J. Med.* 2005, 352, 410-414.

25 (5) (a) Walsh, T. J.; Teppler, H.; Donowitz, G. R.; Maertens, J. A.; Baden, L. R.; Dmoszynska, A.; Comely, O. A.; Bourque, M. R.; Lupinacci, R. J.; Sable, C. A.; dePauw, B. E. N. *Engl. J. Med.* 2004, 351, 1391-1402. (b) Walsh, T. J.; Pappas, P.; Winston, D. J.; Lazarus, H. M.; Petersen, F.; Raffalli, J.; Yanovich, S.; Stiff, P.; Greenberg, R.; Donowitz, G.; Lee, J. N. *Engl. J. Med.* 2002, 346, 225-234.

(6) Cereghetti, D. M.; Carreira, E. M. *Synthesis* 2006, 6, 914-942.

30 (7) (a) Zietse, R.; Zoutendijk, R.; Hoon, E. J. *Nat. Rev. Nephrol.* 2009, 5, 193-202. (b) Volmer, A. A.; Szpilman A. M.; Carreira, E. M. *Nat. Prod. Rep.* 2010, 27, 1329-1349. (c) Murata, M.; Kasai, Y.; Umegawa, Y.; Matsushita, N.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Oishi, T. *Pure Appl. Chem.* 2009, 81, 1123-1129. (d) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1567, 63-78. (e) Bolard, J. *Biochim. Biophys. Acta* 1986, 864, 257-304. (f) de Kruijff, B., Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* 1974, 339, 57-70. (g) Andreoli, T. E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1974, 235, 448-468.

35 (8) (a) Gray, K. C.; Palacios, D. S.; Dailey, I.; Endo, M. M.; Uno, B. E.; Wilcock, B. C.; Burke, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109, 2234-2239. (b) Palacios, D. S.; Dailey, I.; Siebert, D. M.; Wilcock, B. C.; Burke, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, 108, 6733-6738. (c) Palacios, D. S.; Anderson, T. M.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 13804-13805. (d) Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D.; Nieuwkoop, A. J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; Uno, B. E.; Wildeman, E. L.; Gonen, T.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. *Nat. Chem. Bio.* 2014, publicado en línea el 30 de marzo de 2014.

40 (9) (a) Wilcock, B. C.; Endo, M. M.; Uno, B. E.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 8488-91. (b) Uno, B. E.; Endo, M. M.; Struble, J. R.; Knapp, D. M.; Burke, M. D. manuscrito en progreso.

45 (10) (a) Croatt, M. P.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* 2011, 13, 1390-1393. (b) Neumann, A.; Czub, J.; Baginski, M. J. *Phys. Chem. B* 2009, 113, 15875-15885. (c) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 10667-10675. (d) Baran, M.; Mazerski, M. *Biophys. Chem.* 2002, 95, 125-133. (e) Silberstein, A. J. *Membr. Biol.* 1998, 162, 117-126.

50 (11) Neumann, A.; Baginski, M.; Czub, J. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 18266-18272.

(12) (a) Nogueira, J. M.; Issa, J. P.; Chu, A.-H. A.; Sisel, J. A.; Schum, R. S.; Bennett, C. S. *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 2012, 4927-4930. (b) Hou, D.; Lowary, T. L. *Carbohydr. Res.* 2009, 344, 1911-1940. (c) Oberhur, M.; Leimkuhler, C.; Kahne, D. *Org. Lett.* 2004, 6, 2873-2876. (d) Nicolaou, K. C.; Ladduwahetty, T.; Randall, J. L.; Chucholowski, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 2466-2467. (e) Overend, W.; Rees, C.; Sequeira, J. J. *J. Chem. Soc.* 1962, 3429-3440.

(13) Wilcock, B. C.; Uno, B. E.; Bromann, G. L.; Clark, M. J.; Anderson, T. M.; Burke, M. D. *Nat. Chem.* 2012, 4, 996-1003.

60 (14) (a) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 2821-2822. (b) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Ogawa, Y.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 4696-4705. (c) Szpilman, A. M.; Manthorpe, J. M.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 4339-4342. (d) Szpilman, A. M.; Cereghetti, D. M.; Manthorpe, J. M.; Wurtz, N. R.; Carreira, E. M. *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 7117-7128.

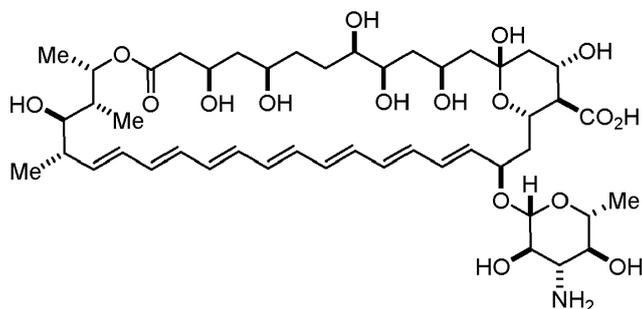
(15) Guo, H.; O'Doherty, G. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 5206-5208.

65

- (16) (a) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 2208-2210. (b) Nicolaou, K. C.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y.; Daines, R. A.; Simpkins, N. S.; Furst, G. T. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 4660-4672. (c) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 4685-4696.
- 5 (17) (a) Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K. *N. Engl. J. Med.* 2007, 356, 2571-2581. (b) Zager, R. A. *Am. J. Kidney Dis.* 2000, 36, 238-249. (c) Sawaya, B. P.; Briggs, J. P.; Schnerrmann, J. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1995, 6, 154-164. (d) Keim, G. R.; Poutsika, J. W.; Kirpan, J.; Keysser, C. H. *Science* 1973, 179, 584-585.
- 10 (18) Debido a la solubilidad limitada de la AmB y sus derivados en la célula renal media, la concentración mayor que podemos estudiar es 80 μM . A concentraciones mayores, el agregado bloquea el paso de luz de la lectura de la placa, dando lecturas falsas de alta absorbancia. Sin embargo, las imágenes al microscopio de las células renales después del tratamiento con AmdeB y C2'deOAmB a concentraciones incluso mayores de 200 μM no revela evidencia visual de toxicidad.
- 15 (19) (a) Fowler, B. S.; Laemmerhold, K. M.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 9755-9761. (b) Duggan, K. C.; Hermanson, D. J.; Musee, J.; Prusakiewicz, J. J.; Scheib, J. L.; Carter, B. D.; Banerjee, S.; Oates, J. A.; Marnett, L. J. *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 803-809. (c) Hendriks, B. S.; Seidl, K. M.; Chabot, J. R. *BMC Syst. Biol.* 2010, 4, 23-39. (d) Neant-Fery, M.; Garcia-Ordóñez, R. D.; Logan, T. P.; Selkoe, D. J.; Li, L.; Reinstatler, L.; Leissring, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105, 9582-9587. (e) Knight, Z. A.; Shokat, K. M. *Chem. Biol.* 2005, 12, 621-637. (f) Koike, K.; Oleschuk, C. J.; Haimeur, A.; Olsen, S. L.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 49495-49503. (g) Changeux, J. P.; Edelstein, S. J. *Neuron* 1998, 21, 959-980.
- 20 (20) (a) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1971, 93, 4560-4564. (b) Jarzemska, K. N.; Kaminski, D.; Hoser, A. A.; Malinska, M.; Senczyna, B.; Wozniak, K.; Gagos, M. *Cryst. Growth Des.* 2012, 12, 2336-2345.
- 25

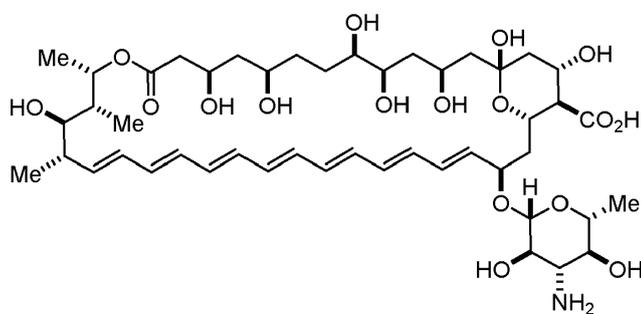
REIVINDICACIONES

1. C2'epiAmB, representado por



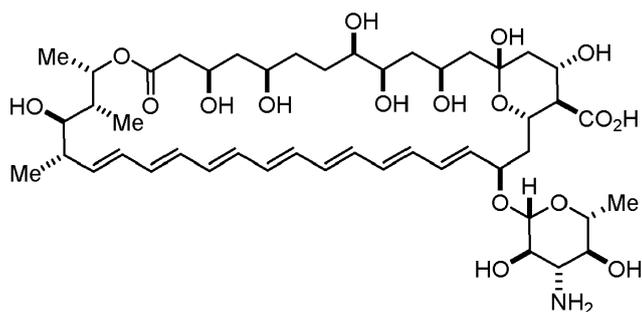
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica, que comprende C2'epiAmB, representado por



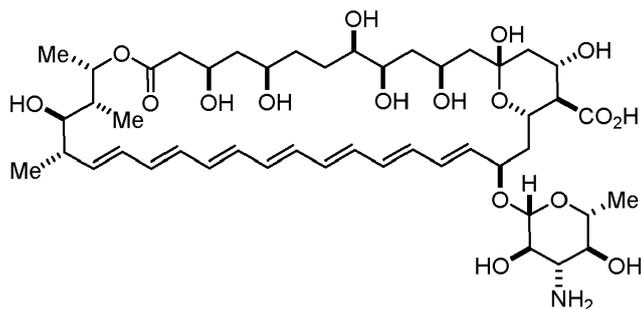
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un portador farmacéuticamente aceptable.

3. Un método para inhibir el crecimiento de una levadura u hongo, en donde el método no es un método de tratamiento para el cuerpo humano o animal y comprende poner en contacto la levadura u hongo con una cantidad eficaz de C2'epiAmB, representado por



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. C2'epiAmB para su uso en un método de tratamiento de una infección por levaduras u hongos en donde C2'epiAmB se representa por



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. C2'epiAmB para su uso de conformidad con la reivindicación 4, en donde el C2'epiAmB se administra a un sujeto que lo necesita y la administración es tópica.
6. C2'epiAmB para su uso de conformidad con la reivindicación 4, en donde el C2'epiAmB se administra a un sujeto que lo necesita y la administración es sistémica.
7. C2'epiAmB para su uso de conformidad con la reivindicación 4, en donde el C2'epiAmB se administra a un sujeto que lo necesita y la administración es oral.
8. C2'epiAmB para su uso de conformidad con la reivindicación 4, en donde el C2'epiAmB se administra a un sujeto que lo necesita y la administración es intravenosa.
9. C2'epiAmB para su uso de conformidad con la reivindicación 4, en donde el C2'epiAmB se administra a un sujeto que lo necesita y la administración es intramuscular.

FIG. 1A

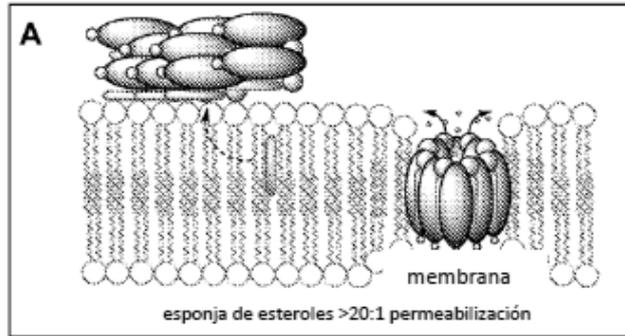


FIG. 1B

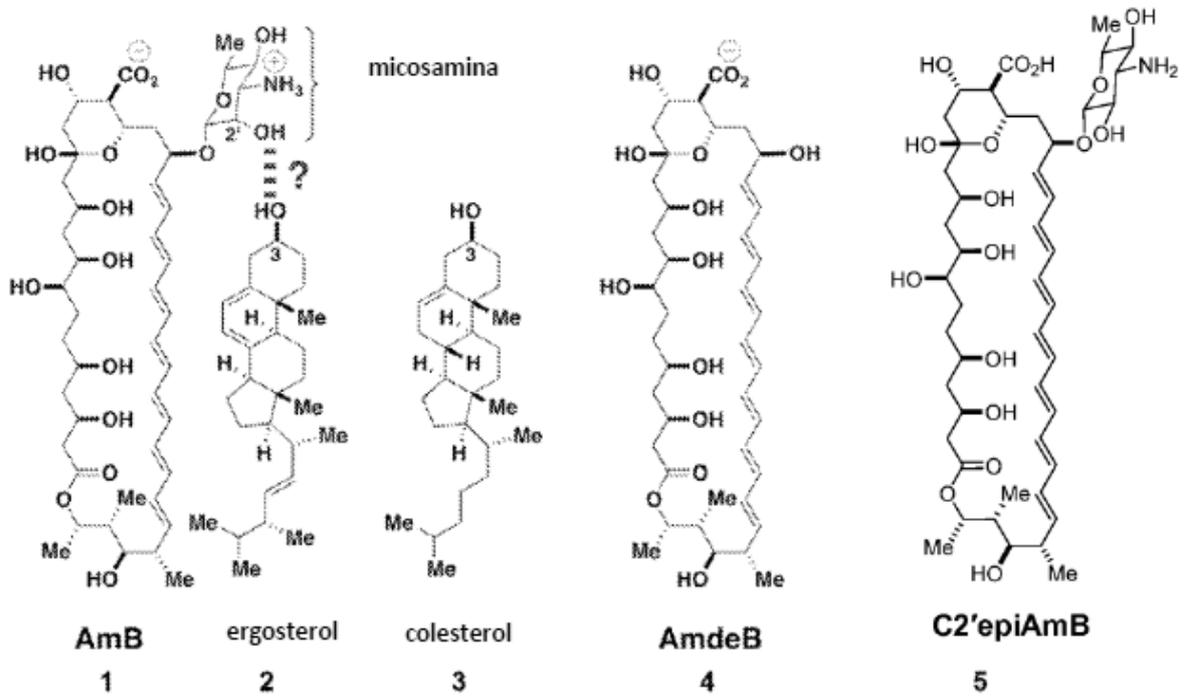


FIG. 2D Técnica anterior

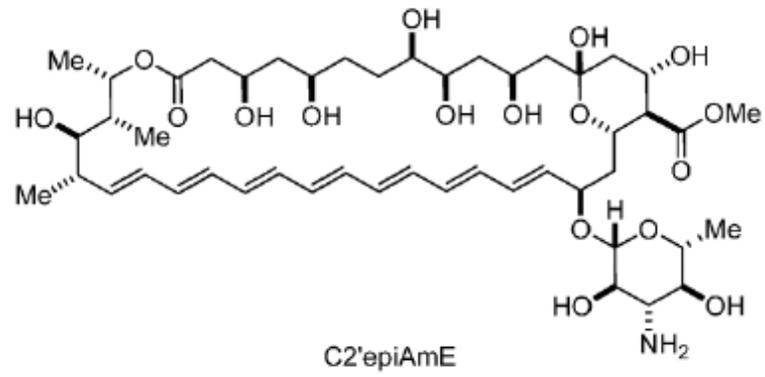


FIG. 3

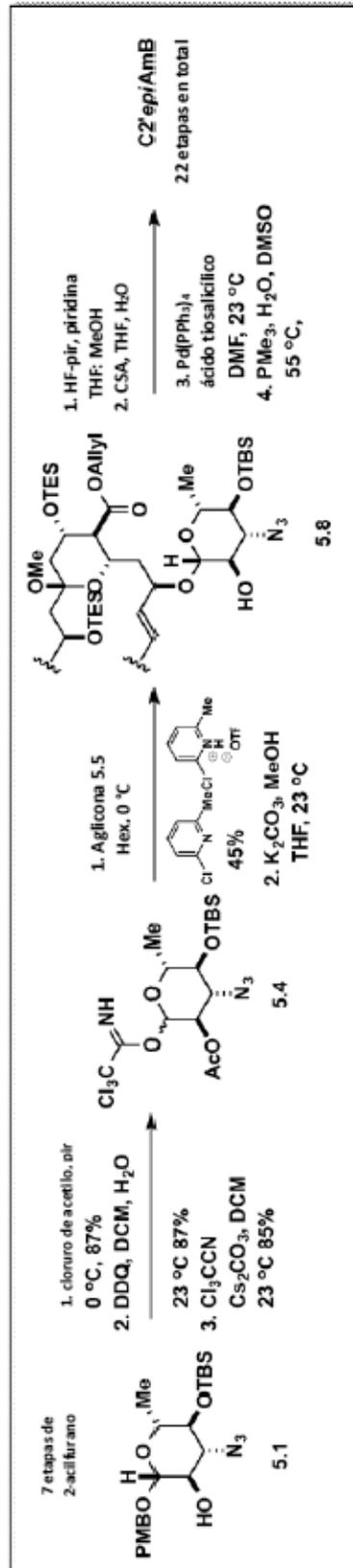


FIG. 4

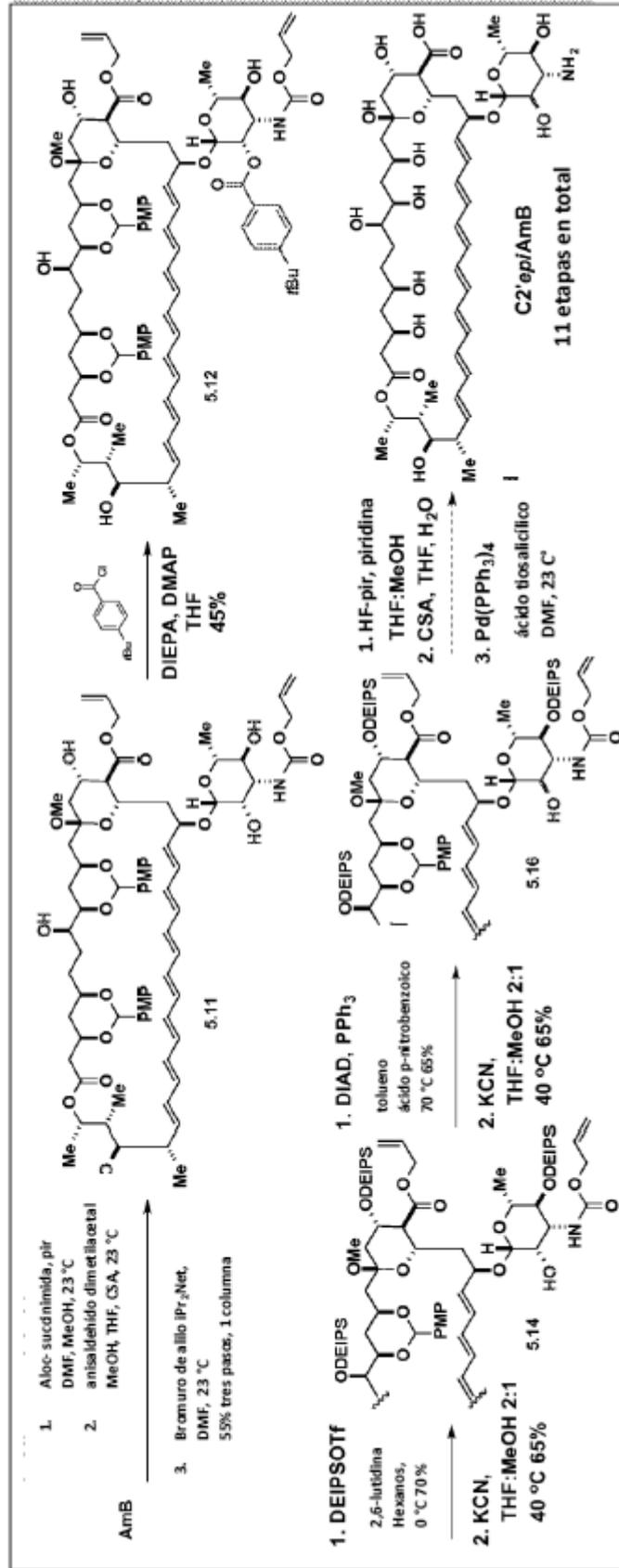


FIG. 5

		AmB	C2'deOAmB	C2'epiAmB
Unión de ITC	Erg	sí	sí	sí
	Col	sí	No	No
MIC (μM)	<i>S. cerevisiae</i>	0.5	1	2
	<i>C. albicans</i>	0.25	1	2
MHC (μM)	RBC	8.5	> 500	> 500
MTC (μM)	REC	2.4	> 80	> 80

FIG. 6A

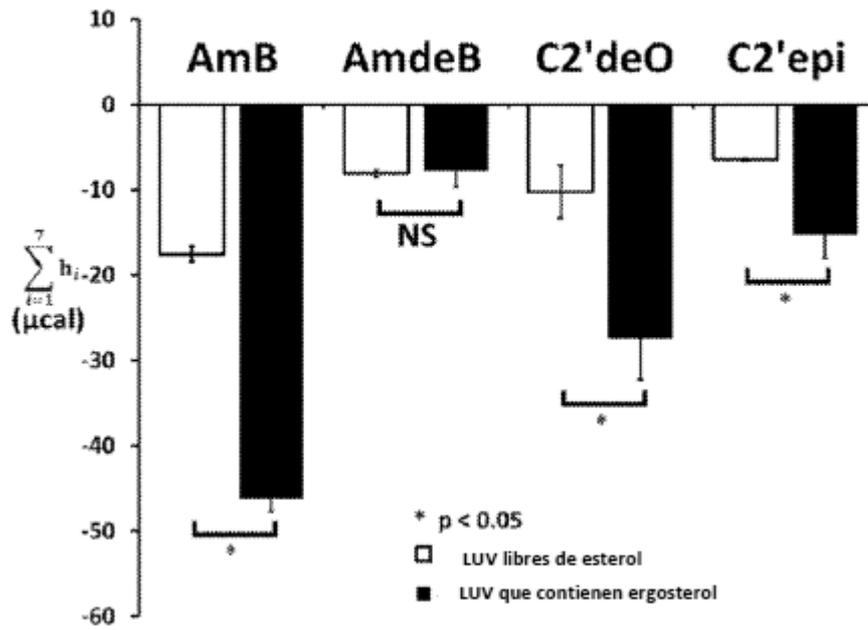


FIG. 6B

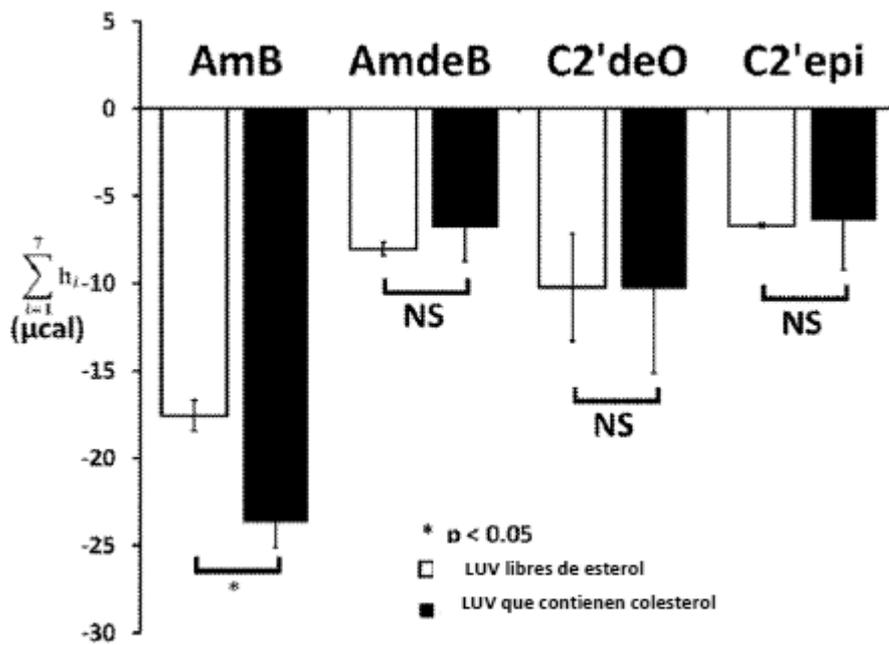


FIG. 7

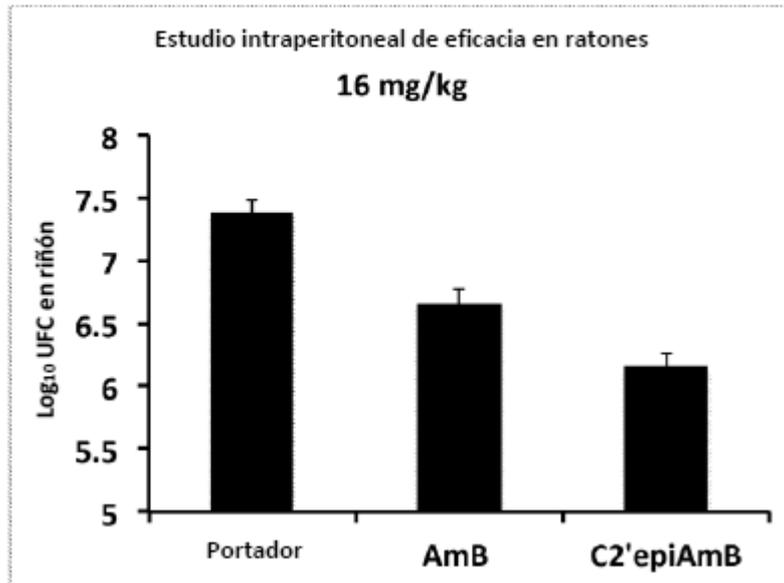


FIG. 8

