

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 723**

51 Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2016 PCT/GB2016/051467**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016 WO16185225**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2016 E 16724958 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3298006**

54 Título: **Antifúngico 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-N -(2-hidroxiciclohexil)benzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo**

30 Prioridad:

21.05.2015 EP 15168637

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

29.10.2020

73 Titular/es:

**PULMOCIDE LIMITED (100.0%)
Covington&Burling LLP, 265 Strand
London WC2R 1BH, GB**

72 Inventor/es:

**COLLEY, THOMAS CHRISTOPHER;
ITO, KAZUHIRO;
STRONG, PETER;
SUNOSE, MIHIRO y
MCCONVILLE, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 790 723 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

Antifúngico 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahydrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-N-(2-hidroxiciclohexil)benzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

Campo de la invención

Esta invención se refiere a compuestos útiles en el tratamiento de la micosis, composiciones que los contienen y los compuestos para su uso en la terapia.

10

Antecedentes de la invención

La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado sustancialmente a lo largo de las dos últimas décadas y las formas invasivas son las principales causas de morbilidad y mortalidad, especialmente entre pacientes inmunocomprometidos o inmunodeprimidos. La candidiasis diseminada, la aspergilosis pulmonar y los hongos oportunistas emergentes son los agentes más comunes que producen estas micosis graves. Una característica particular de los hongos es que son capaces de generar una matriz extracelular (MEC) que los une y les permite adherirse a sus sustratos *in vitro* o *in vivo*. Estas biopelículas sirven para protegerlos contra los entornos hostiles del sistema inmunitario del huésped y para resistir la muerte antimicrobiana (**Kaur y Singh**, 2013).

20

La aspergilosis pulmonar se puede segmentar en aquellos pacientes que padecen una enfermedad no invasiva frente a aquellos con una afección invasiva. Se usa una subdivisión adicional para caracterizar a los pacientes que exhiben un componente alérgico a la aspergilosis (conocido como ABPA; aspergilosis broncopulmonar alérgica) en comparación con aquellos que no lo hacen. Los factores que precipitan la aspergilosis pulmonar pueden ser agudos, tales como la exposición a altas dosis de medicamentos inmunosupresores o a la intubación en una unidad de cuidados intensivos. Alternativamente, pueden ser crónicos, tales como una infección anterior por TB (**Denning y col.**, 2011a). Las infecciones pulmonares crónicas con *Aspergillus* pueden dejar a los pacientes con daño pulmonar amplio y permanente, lo que requiere tratamiento de por vida con fármacos azólicos orales (**Limper y col.**, 2011).

25

Un grupo de investigaciones creciente sugiere que la infección por *Aspergillus* puede desempeñar un papel importante en el asma clínico (**Chishimba y col.**, 2012; **Pasqualotto y col.**, 2009). Además, el trabajo publicado recientemente ha correlacionado la infección por *Aspergillus* con peores resultados clínicos en pacientes con EPOC (**Bafadhel y col.**, 2013). Estudios transversales similares han demostrado asociaciones entre la presencia de *Aspergillus spp.* y *Candida spp.* en el esputo y la función pulmonar empeorada (**Chotirmall y col.**, 2010; **Agbetile y col.**, 2012).

35

La aspergilosis invasiva (AI) presenta tasas altas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo, aquellos sometidos a trasplante alogénico de células madre o trasplantes de órganos sólidos (tales como trasplantes de pulmón). El primer caso de AI descrito en un paciente inmunocomprometido se produjo en 1953. Este evento fue concurrente con la introducción de los corticosteroides y la quimioterapia citotóxica en los regímenes de tratamiento (**Rankin**, 1953). La aspergilosis invasiva es una preocupación importante en el tratamiento de la leucemia y otras malignidades hematológicas dada su alta incidencia y la mortalidad asociada. Las tasas de mortalidad por lo general superan el 50% (**Lin y col.**, 2001) y las tasas a largo plazo pueden alcanzar el 90 % en receptores de trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas, a pesar de la disponibilidad de medicamentos triazólicos orales (**Salmeron y col.**, 2012). En pacientes sometidos a trasplantes de órganos sólidos (particularmente del pulmón), el uso de dosis altas de esteroides deja a los pacientes vulnerables a la infección (**Thompson y Patterson**, 2008), lo que es un problema grave. La enfermedad también se ha presentado en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos menos gravemente. Estas incluyen aquellos que padecen EPOC o cirrosis subyacente, pacientes que reciben dosis altas de esteroides e individuos provistos de catéteres venosos centrales o asistidos por ventilación mecánica (**Dimopoulos y col.**, 2012).

40

Los medicamentos antifúngicos existentes se administran predominantemente oral o sistémicamente. Estas vías de administración utilizadas habitualmente son deficientes para tratar infecciones de las vías respiratorias pulmonares, ya que las concentraciones de fármaco alcanzadas en el punto de infección tienden a ser inferiores a aquellas en otros órganos. Esto es así especialmente para el hígado, que es un punto de toxicidad: hasta 15 % de los pacientes tratados con voriconazol padecen niveles elevados de transaminasas (**Levin y col.**, 2007; **Lat y Thompson**, 2011). La exposición del hígado también da como resultado interacciones farmacológicas significativas que surgen de la inhibición de las enzimas hepáticas P450 (**Jeong, y col.**, 2009; **Wexler y col.**, 2004).

55

Además, el uso generalizado de triazoles, tanto en la clínica como en la agricultura, ha conducido a una emergencia creciente y problemática de micosis resistentes en algunas ubicaciones (**Denning y col.**, 2011b; **Bowyer y Denning**, 2014).

60

EP0957101 (Janssen Pharmaceutica NV) se refiere a azoles solubles en agua como antifúngicos de amplio espectro y su uso como medicamentos.

WO95/17407 (Schering Corporation) se refiere a antifúngicos de tetrahidrofurano y su uso en procedimientos para el tratamiento y/o la prevención de infecciones fúngicas en huéspedes.

US5039676 (Schering Corporation) se refiere a oxetanos tri y tetrasustituidos y tetrahidrofuranos tri y tetrasustituidos y al uso de dichos compuestos para el tratamiento o la prevención de infecciones fúngicas susceptibles, enfermedades cutáneas hiperproliferativas, reacciones alérgicas y enfermedades autoinmunes.

10

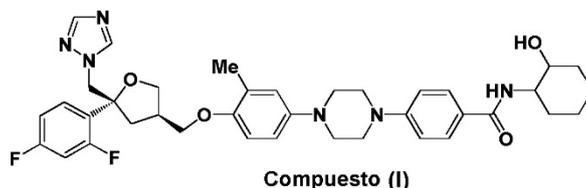
WO2013/036866 (The John Hopkins University) se refiere a derivados de Itraconazol, específicamente a análogos y composiciones de Itraconazol como productos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades.

15 Resulta claramente evidente que existe una necesidad médica urgente de medicamentos antifúngicos novedosos que aporten una eficacia mejorada y mejores perfiles de tolerabilidad sistémica.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona el compuesto (I)

20

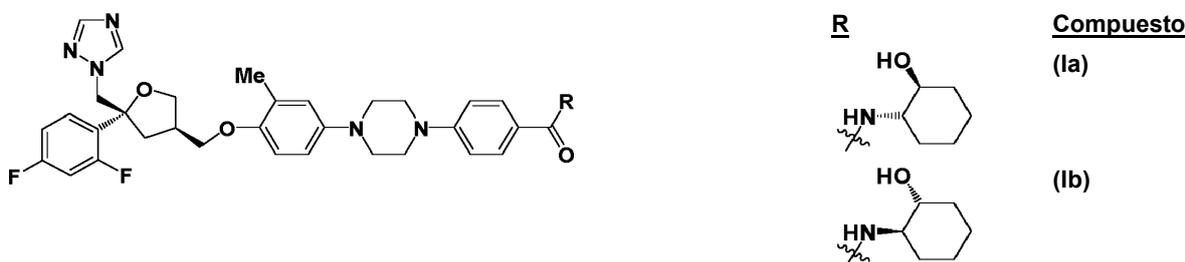


que es:

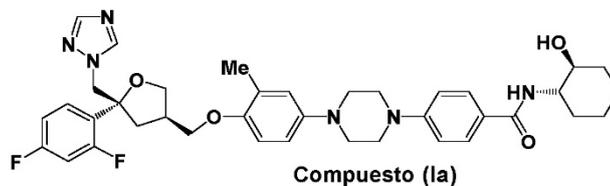
25 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-*N*-(2-hidroxiciclohexil)benzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (el "compuesto de la invención").

30 El compuesto (I) contiene dos centros estereogénicos dentro del radical 2-aminociclohexanol y se proporciona en forma de cualquiera de sus cuatro posibles estereoisómeros, ya sea como un estereoisómero singular o como una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción (incluidas mezclas racémicas).

35 En un aspecto preferido, la invención proporciona el Compuesto (I) en forma de un estereoisómero seleccionado entre los Compuestos (Ia) y (Ib) que se ilustran a continuación, que son los dos estereoisómeros derivados de los enantiómeros de *trans*-2-aminociclohexanol, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



40 En un aspecto más preferido, la invención proporciona el Compuesto (Ia) que se representa a continuación:



que es:

- 5 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-*N*-((1*S*,2*S*)-2-hidroxiciclohexil)benzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Adecuadamente, el Compuesto (I) como el Compuesto (Ia) se proporciona como un estereoisómero singular.

10

Los datos biológicos que se describen a continuación en esta solicitud revelan que el Compuesto (I), y su compuesto estereoisomérico (Ia) en particular, son potentes inhibidores del crecimiento del *Aspergillus fumigatus* en ensayos *in vitro*. En ratones inmunodeprimidos, el Compuesto (Ia) demostró una inhibición potente de las infecciones por *Aspergillus fumigatus*.

15

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra los efectos del tratamiento terapéutico con el Compuesto (Ia) sobre las UFC en los pulmones de ratones neutropénicos inmunocomprometidos e infectados con *Aspergillus fumigatus*.

20

La **Figura 2** muestra los efectos del tratamiento terapéutico con el Compuesto (Ia) sobre las concentraciones de galactomanano sérico en ratones neutropénicos inmunocomprometidos e infectados con *Aspergillus fumigatus*.

La **Figura 3** muestra los efectos del tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (Ia) sobre el contenido de ADN de *Aspergillus fumigatus* en los pulmones de ratones neutropénicos inmunocomprometidos e infectados con *Aspergillus fumigatus*.

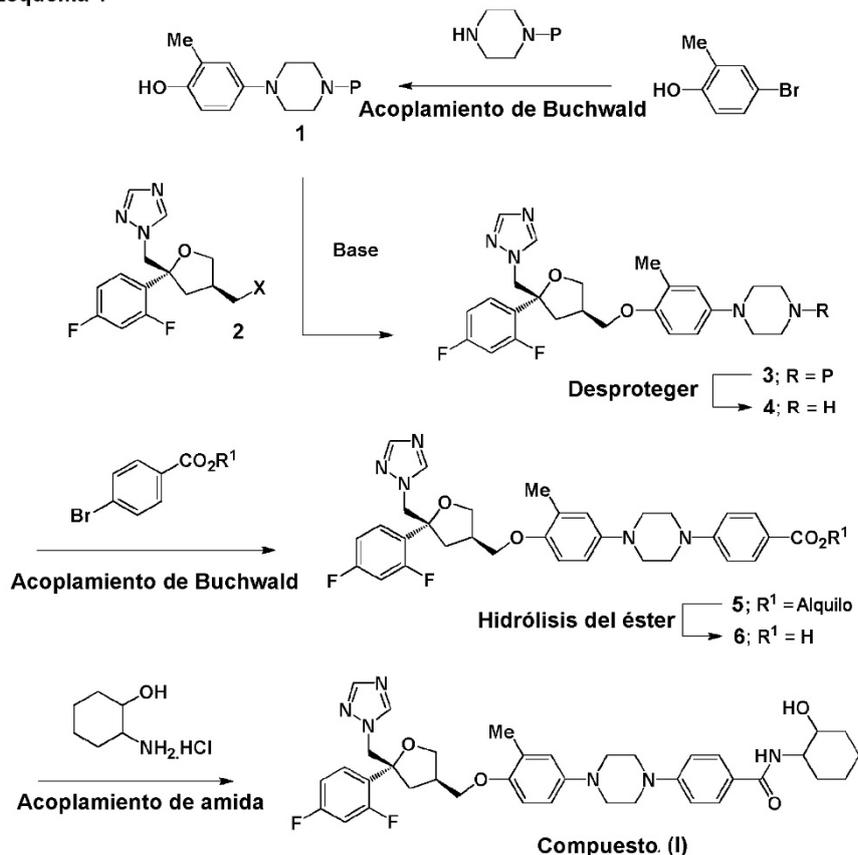
25

Descripción detallada de la invención

30 El compuesto de la invención se puede preparar a partir de materiales de partida comercializados mediante la metodología sintética representada a continuación (**Esquema 1**). El acoplamiento de Buchwald de un derivado de piperazina adecuadamente protegido con 4-bromo-2-metilfenol en condiciones típicamente empleadas para tales reacciones proporciona el producto *N*-arilado **1**. Un grupo protector amino adecuado (P) para tales transformaciones es un uretano, tal como un grupo Boc (**P** = CO₂^tBu). Los expertos en la materia entenderán que se puede usar una amplia variedad de condiciones para influir en las transformaciones de este tipo. En particular, los catalizadores de paladio y los ligandos de fosfina tales como RuPhosG3 y RuPhos se emplean rutinariamente en presencia de una base, por ejemplo, carbonato de cesio o hexametildisilazida de litio.

35

Esquema 1



La reacción del fenol resultante (1) con un derivado electrofílico apropiado de ((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metanol (2, X = OH) en condiciones básicas genera el éter (3). Un ejemplo de tal compuesto es el correspondiente tosilato (2, X = OTs) que se puede obtener fácilmente, con alta pureza enantiomérica, de fuentes comerciales. Si bien el tosilato es ejemplar, X puede ser también un grupo saliente alternativo, tal como un halógeno, típicamente cloro. La eliminación selectiva del grupo protector amino revela la piperazina monosustituida (4). En el caso de un derivado de Boc (R = CO₂^tBu), la etapa de desprotección se efectúa típicamente mediante la exposición del carbamato al ácido mineral fuerte o a un ácido orgánico fuerte, tal como TFA, ya sea puro o en presencia de un solvente, como DCM.

Un segundo acoplamiento de Buchwald de la amina (4) con un 4-bromobenzoato de alquilo, en condiciones básicas y con la actuación de un catalizador, da origen al producto N,N'-bisarilado (5) en el que R' representa un alquilo enor, como el alquilo C₁₋₅, por ejemplo, metilo o etilo. La saponificación del éster (5) se realiza convenientemente mediante un tratamiento con una base, tal como un hidróxido metálico alcalino, en una mezcla de agua y un solvente acuoso miscible adecuado. La reacción del producto ácido (6), con 2-aminociclohexanol, en condiciones estándar de acoplamiento de amida, ampliamente disponibles en la técnica, proporciona el Compuesto (I). Cada uno de los cuatro estereoisómeros separados del Compuesto (I) se puede producir utilizando el correspondiente estereoisómero singular de 2-aminociclohexanol. Los correspondientes estereoisómeros de 2-aminociclohexanol se comercializan con una alta pureza estereoisomérica.

Los grupos protectores y los medios para su retirada se describen en "Protective Groups in Organic Synthesis", de Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, publicado por John Wiley & Sons Inc; 4ta Edición Rev., 2006, ISBN-10: 0471697540. Un análisis de las metodologías para la preparación de amidas se describe en: "Amide bond formation and peptide coupling", Montalbetti, C.A.G.N. y Falque, V. Tetrahedron, 2005, 61, 10827-10852.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) incluyen en particular sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos. Con sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) se pretende comprender las sales de adición de ácido no tóxicas terapéuticamente activas que son capaces de formar los compuestos de fórmula (I). Estas sales de adición de ácido

farmacéuticamente aceptables se pueden obtener convenientemente tratando la forma de base libre con tales ácidos apropiados en un solvente o una mezcla de solventes adecuados. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrohálicos, p. ej., ácido clorhídrico o bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, propanoico, hidroxiaacético, láctico, 5 pirúvico, malónico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y similares.

Por otro lado, dichas formas salinas se pueden convertir mediante tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

10

La definición del Compuesto (I) está destinada a incluir todos los tautómeros de dicho compuesto.

Como se usa en esta solicitud, el término un "estereoisómero singular" del Compuesto (I) es un estereoisómero proporcionado en forma de alta pureza diastereomérica y enantiomérica, que está sustancialmente libre de los otros 15 tres estereoisómeros del Compuesto (I) que surgen en virtud de la presencia en el mismo del radical 2-aminociclohexanol. Típicamente, el estereoisómero singular constituye al menos el 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % p/p del contenido del Compuesto (I) (es decir, los demás estereoisómeros constituyen menos del 2 %, 1 %, 0,5 %, o 0,1 % p/p del contenido del Compuesto (I)).

20 La definición del Compuesto (I) está destinada a incluir todos los solvatos de dicho compuesto (lo que incluye solvatos de sales de dicho compuesto) a menos que el contexto lo indique específicamente de otro modo. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos.

El compuesto de la descripción incluye realizaciones donde uno o más átomos especificados son isótopos de origen 25 natural o no natural. En una realización, el isótopo es un isótopo estable. Por tanto, los compuestos de la descripción incluyen, por ejemplo, compuestos que contienen deuterio y similares.

La descripción también abarca todas las formas polimórficas del compuesto definido en esta invención.

30 Los productos intermedios se describen en esta solicitud como compuestos de la fórmula (3), (4), (5) y (6) y sales de la misma. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables (tales como las mencionadas anteriormente) y sales no farmacéuticamente aceptables. Las sales de ácidos (por ejemplo, ácidos carboxílicos) incluyen sales de metales del primer y segundo grupo que incluyen sales de sodio, potasio, magnesio y calcio.

35 En una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Adecuadamente, el compuesto de la invención se administra tópicamente al pulmón o la nariz, particularmente, tópicamente al pulmón. Por tanto, en una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende el 40 compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos tópicamente aceptables.

Las composiciones adecuadas para administración pulmonar o intranasal incluyen polvos, soluciones líquidas, suspensiones líquidas, gotas nasales, que comprenden soluciones o suspensiones, o aerosoles presurizados o no 45 presurizados.

Las composiciones se pueden administrar convenientemente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a edición, Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Las 50 composiciones también se pueden administrar convenientemente en forma farmacéutica unitaria múltiple.

La administración tópica a la nariz o el pulmón se puede conseguir mediante el uso de una formulación no presurizada tal como una solución o suspensión acuosa. Tales formulaciones se pueden administrar por medio de un nebulizador, por ejemplo, uno que puede ser manual y portátil o para uso doméstico u hospitalario (es decir, no portátil). Un 55 dispositivo de ejemplo es un inhalador RESPIMAT. La formulación puede comprender excipientes tales como agua, tampones, agentes ajustadores de la tonicidad, agentes ajustadores del pH, modificadores de la viscosidad, tensioactivos y cosolventes (tales como etanol). Las formulaciones de líquido de suspensión y aerosol (ya sea presurizado o no presurizado) contendrán típicamente el compuesto de la invención en forma finamente dividida, por ejemplo, con un D_{50} de 0,5 a 10 μm , por ejemplo, alrededor de 1 a 5 μm . Las distribuciones del tamaño de partícula 60 se pueden representar usando los valores D_{10} , D_{50} y D_{90} . El valor de mediana D_{50} de las distribuciones del tamaño de partícula se define como el tamaño de partícula en micras que divide la distribución por la mitad. La medición obtenida a partir de difracción láser se describe con mayor exactitud como una distribución de volumen y, por consiguiente, el

valor D_{50} obtenido usando este procedimiento se denomina más convenientemente valor D_{V50} (mediana para una distribución de volumen). Como se emplea en esta invención, los valores D_v se refieren a distribuciones del tamaño de partícula medidas usando difracción láser. De manera similar, los valores D_{10} y D_{90} , usados en el contexto de la difracción láser, se toman para indicar los valores D_{V10} y D_{V90} y se refieren al tamaño de partícula mediante el cual el 10 % de la distribución se encuentra por debajo del valor D_{10} y el 90% de la distribución se encuentra por debajo del valor D_{90} , respectivamente.

Según un aspecto específico de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención en forma de partículas suspendidas en un medio acuoso. El medio acuoso comprende típicamente agua y uno o más excipientes seleccionados entre tampones, agentes ajustadores de la tonicidad, agentes ajustadores del pH, modificadores de la viscosidad y tensioactivos.

La administración tópica a la nariz o el pulmón también se puede conseguir mediante el uso de una formulación de aerosol. Las formulaciones de aerosol comprenden típicamente el principio activo suspendido o disuelto en un propelente de aerosol adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC) o un hidrofluorocarbono (HFC). Los propelentes de CFC adecuados incluyen tricloromonofluorometano (propelente 11), diclorotetrafluorometano (propelente 114) y diclorodifluorometano (propelente 12). Los propelentes de HFC adecuados incluyen tetrafluoroetano (HFC-134a) y heptafluoropropano (HFC-227). El propelente comprende típicamente 40 %-99,5 %, por ejemplo, 40 %-90 % en peso de la composición de inhalación total. La formulación puede comprender excipientes que incluyen cosolventes (por ejemplo, etanol) y tensioactivos (por ejemplo, lecitina, trioleato de sorbitán y similares). Otros excipientes posibles incluyen polietilenglicol, polivinilpirrolidona, glicerina y similares. Las formulaciones de aerosol se envasan en recipientes metálicos herméticos y se administra una dosis adecuada por medio de una válvula dosificadora (por ejemplo, como las suministradas por Bepak, Valois o 3M o alternativamente por Aptom, Coster o Vari).

La administración tópica al pulmón también se puede conseguir mediante el uso de una formulación de polvo seco. Una formulación de polvo seco contendrá el compuesto de la descripción en forma finamente dividida, típicamente con un MMD de 1 a 10 μm o un D_{50} de 0,5 a 10 μm , por ejemplo, alrededor de 1 a 5 μm . Los polvos del compuesto de la invención en forma finamente dividida se pueden preparar mediante un procedimiento de micronización o un procedimiento de reducción de tamaño similar. La micronización se puede realizar usando un molino de chorro tal como los fabricados por Hosokawa Alpine. La distribución del tamaño de partícula resultante se puede medir usando difracción láser (por ejemplo, con un instrumento Mastersizer 2000S de Malvern). La formulación contendrá típicamente un diluyente típicamente aceptable tal como lactosa, glucosa o manitol (preferiblemente lactosa), por lo general de tamaño de partícula comparativamente grande, por ejemplo, un MMD de 50 μm o más, por ejemplo, 100 μm o más o un D_{50} de 40 a 150 μm . Como se emplea en esta invención, el término "lactosa" se refiere a un componente que contiene lactosa, lo que incluye α -lactosa monohidratada, β -lactosa monohidratada, α -lactosa anhidra, β -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Los componentes de lactosa se pueden procesar mediante micronización, tamizado, molienda, compresión, aglomeración o secado por pulverización. También están abarcadas formas de lactosa comercializadas en diversas formas, por ejemplo, Lactohale® (lactosa de grado inhalatorio; DFE Pharma), InhaLac®70 (lactosa tamizada para inhalador de polvo seco; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) y Respitose® (lactosa de grado inhalatorio tamizada; DFE Pharma). En una realización, el componente de lactosa se selecciona del grupo que consiste en α -lactosa monohidratada, α -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Preferiblemente, la lactosa es α -lactosa monohidratada.

Las formulaciones de polvo seco también pueden contener otros excipientes tales como estearato de sodio, estearato de calcio o estearato de magnesio.

Una formulación de polvo seco se administra típicamente usando un dispositivo inhalador de polvo seco (DPI). Los ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, SKYEHALER, ACCUHALER y CLICKHALER. Otros ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, inhalador de polvo seco ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR y PROHALER.

El compuesto de la invención es útil como producto farmacéutico. Por ejemplo, el compuesto de la invención es útil en el tratamiento de micosis y para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a la micosis.

La micosis puede, en particular, ser causada por *Aspergillus spp.*, Tal como *Aspergillus fumigatus*.

Una enfermedad asociada a una micosis es, por ejemplo, la aspergilosis pulmonar.

El compuesto de la invención se puede usar en un contexto profiláctico administrando dicho compuesto antes del comienzo de la micosis.

Los sujetos incluyen sujetos humanos y animales, especialmente sujetos humanos.

5

El compuesto de la invención es especialmente útil para el tratamiento de micosis tales como infección por *Aspergillus fumigatus* y para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a la micosis tales como infección por *Aspergillus fumigatus* en sujetos de riesgo. Los sujetos de riesgo incluyen lactantes prematuros, niños con defectos congénitos del pulmón o el corazón, sujetos inmunocomprometidos (por ejemplo, los que padecen infección por VIH), asmáticos, sujetos con fibrosis quística, sujetos ancianos y sujetos que padecen una afección médica crónica que afecta al corazón o al pulmón (por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

10

El compuesto de la invención también es útil en el tratamiento de otras micosis (y en la prevención o el tratamiento de las enfermedades asociadas a estas), incluidas las causadas por *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Cladosporium herbarum*, *Trichophyton rubrum*, *Candida* spp., por ejemplo, *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei* and other *Aspergillus* spp., por ejemplo, *Aspergillus flavus*.

15

Se espera que el compuesto de la invención sea también útil en el tratamiento de las micosis resistentes a los azoles (y en la prevención o el tratamiento de las enfermedades asociadas a estas), por ejemplo, las causadas por *Aspergillus* spp., por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*.

20

El compuesto de la invención se puede administrar en combinación con un segundo principio activo o más. El segundo o más principios activos se pueden seleccionar, por ejemplo, entre otros agentes antifúngicos, incluidos los agentes antifúngicos azólicos (tales como voriconazol o posaconazol), anfotericina B, una equinocandina (tal como caspofungina) y un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (tal como lovastatina, pravastatina o fluvastatina). Otros ejemplos de agentes antifúngicos azólicos adecuados incluyen itraconazol e isavuconazol.

25

El segundo o más principios activos se pueden seleccionar, por ejemplo, entre voriconazol, posaconazol, itraconazol y caspofungina.

30

El segundo o más principios activos incluyen principios activos adecuados para el tratamiento o la prevención de una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus* o una enfermedad asociada a una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus* o afecciones comórbidas con una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus*.

35

El compuesto de la invención se puede coformular con un segundo principio activo o más, o el segundo o más principios activos se pueden formular para ser administrados independientemente por la misma vía o una diferente.

40

Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden administrar a pacientes que ya están siendo tratados sistémicamente con un antifúngico, tal como voriconazol o posaconazol o alternativamente, itraconazol o isavuconazol.

45

Por ejemplo, el compuesto de la invención se puede coformular con uno o más agentes seleccionados entre anfotericina B, una equinocandina, tal como caspofungina, y un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, tal como lovastatina, pravastatina o fluvastatina.

Según un aspecto de la invención se proporciona un kit de partes que comprende (a) una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; (b) una composición farmacéutica que comprende un segundo principio activo opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; (c) opcionalmente una o más composiciones farmacéuticas adicionales que comprenden cada una un tercer principio activo o más opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; y (d) instrucciones para la administración de las composiciones farmacéuticas a un sujeto con necesidad de las mismas. El sujeto con necesidad de las mismas puede padecer, o ser susceptible de, una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus*.

50

El compuesto de la invención se puede administrar en un intervalo adecuado, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

55

Una cantidad de dosis adecuada para un humano de peso promedio (50-70 kg) se espera que sea de alrededor de 50 µg a 10 mg/día, por ejemplo, 500 µg a 5 mg/día, aunque la dosis exacta que se va a administrar puede ser determinada por un experto en la técnica.

60

Se espera que el compuesto de la invención tenga uno o más de los siguientes atributos favorables:

potente actividad antimicótica, en particular actividad contra *Aspergillus spp.*, tales como *Aspergillus fumigatus*, especialmente después de la administración tópica al pulmón o la nariz;

5

duración larga de la acción en los pulmones, preferentemente consistente con la administración una vez al día;

exposición sistémica baja después de la administración tópica al pulmón o la nariz; y

10 perfil de seguridad aceptable, especialmente después de la administración tópica al pulmón o la nariz.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Las abreviaturas usadas en esta invención se definen a continuación (**Tabla 1**). Cualquier abreviatura no definida está

15 destinada a expresar su significado generalmente aceptado.

Tabla 1: Abreviaturas

ABPA	aspergilosis broncopulmonar alérgica
ac.	Acuosa
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BALF	fluido de lavado broncoalveolar
BEAS2B	epitelio bronquial + adenovirus 12-SV40 híbrido, línea 2B
Boc	<i>terc-butiloxicarbonilo</i>
br	Amplia
BSA	albúmina sérica bovina
CC ₅₀	concentración de citotoxicidad celular de 50 %
UFC	unidad(es) formadora(s) de colonias
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
COI	índice de corte
conc.	Concentración
d	Doblete
DCM	Diclorometano
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N-dimetilformamida</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
ADN	ácido desoxirribonucleico
DSS	sulfato sódico de dextrano
EBM	medio basal de células endoteliales
MEC	matriz extracelular
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ee	exceso enantiomérico
EGM	medio de crecimiento celular endotelial
EUCAST	Comité Europeo de Antibiogramas
(ES ⁺)	ionización por electroespray, modo positivo
EtOAc	acetato de etilo
FAM	6-fluoresceína amidita
FBS	suero fetal bovino

ES 2 790 723 T3

GM	Galactomanano
h	hora(s)
HPAEC	células endoteliales de arteria pulmonar humana primaria
AI	aspergilosis invasiva
i.n.	Intranasal
i.t.	intratraqueal
LC-MS/MS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
Li Hep	heparina de litio
LiHMDS	bis(trimetilsilil)amida de litio
(M+H) ⁺	ion molecular protonado
MDA	Malondialdehído
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MHz	Megahercio
CMI ₅₀	50 % de concentración mínima inhibitoria
CMI ₇₅	75% de concentración mínima inhibitoria
CMI ₉₀	90% de concentración mínima inhibitoria
min	minuto(s)
MMD	diámetro medio másico
MOI	multiplicidad de infección
MOPS	ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfónico
m/z:	relación masa/carga
NCPF	Colección Nacional de Hongos Patógenos
RMN	(espectroscopía de) resonancia magnética nuclear
NE	no ensayado
DO	densidad óptica
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
P	grupo protector
q	Cuarteto
TA	temperatura ambiente
RP HPLC	cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute
RuPhos	2-diciclohexilfosfino-2',6'-diisopropoxibifenilo
RuPhosG3	metanosulfonato de (2-diciclohexilfosfino-2',6'-diisopropoxibifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio (II)
s	Singlete
sat.	Saturado(a)
sc.	subcutáneo(a)
SDS	dodecilsulfato sódico
t	Triplete
TAMRA	tetrametil-6-carboxirodamina

TE	tris-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
TFA	ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TR34/L98H	Una cepa <i>A. fumigatus</i> que contiene una sustitución de leucina a histidina en el codón 98 y una repetición en tándem de 34 pb
TR46/Y121F/ T289A	Una cepa de <i>A. fumigatus</i> que contiene una sustitución de tirosina a fenilalanina en el codón 121, una sustitución de treonina a alanina en el codón 289 y una repetición en tándem de 46 pb
vol	volumen(es)

Procedimientos generales

- 5 Todos los reactivos y solventes se obtuvieron indistintamente de fuentes comerciales o se prepararon según la cita bibliográfica. A menos que se indique de otro modo, se agitaron todas las reacciones. Las soluciones orgánicas se secaron rutinariamente sobre sulfato de magnesio anhidro.

Procedimientos analíticos

10

Procedimientos de HPLC de fase inversa:

- Columna Waters Xselect CSH C18 XP, 2,5 μm (4,6 x 30 mm) a 40°C; velocidad de flujo 2,5-4,5 ml min⁻¹ eluida con un gradiente de H₂O-MeCN que contenía ya sea 0,1% v/v de ácido fórmico (**Procedimiento 1a**) o 10 mM NH₄HCO₃ en agua (**Procedimiento 1b**) a lo largo de 4 min que emplea una detección de UV a 254 nm. Información de gradiente: 0-3,00 min, aumentado de 95 % de H₂O-5 % de MeCN a 5 % de H₂O-95 % de MeCN; 3,00-3,01 min, mantenido a 5 % de H₂O-95 % de MeCN, caudal aumentado a 4,5 mL min⁻¹; 3,01-3,50 min, mantenido a 5 % de H₂O-95 % de MeCN; 3,50-3,60 min, devuelto a 95 % de H₂O-5 % de MeCN, caudal reducido a 3,50 mL min⁻¹; 3,60-3,90 min, mantenido a 95 % de H₂O-5 % de MeCN; 3,90-4,00 min, mantenido a 95 % de H₂O-5 % de MeCN, caudal reducido a 2,5 mL min⁻¹.

20

¹Espectroscopia de H RMN

- Los espectros de RMN ¹H se adquirieron en un espectrómetro Advance III de Bruker a 400 MHz usando disolvente residual no deuterado como referencia y, a menos que se especifique de otro modo, se realizaron en DMSO-d₆.

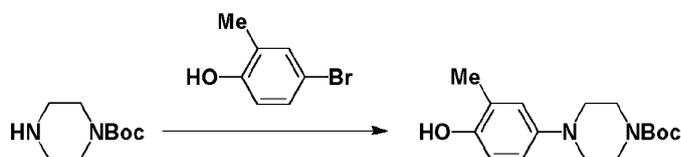
25

Preparación de compuestos (la-d): los estereoisómeros del Compuesto (I).

- Se han reseñado anteriormente las síntesis de hexanoles 2-amino *cis* y *trans* ópticamente puros (**Jacobsen y col.**, 1997). Estos materiales están disponibles con alta pureza enantiomérica de numerosas fuentes comerciales y se utilizaron tal como se suministraron.

30

tert-butil 4-(4-hidroxi-3-metilfenil)piperazina-1-carboxilato.



35

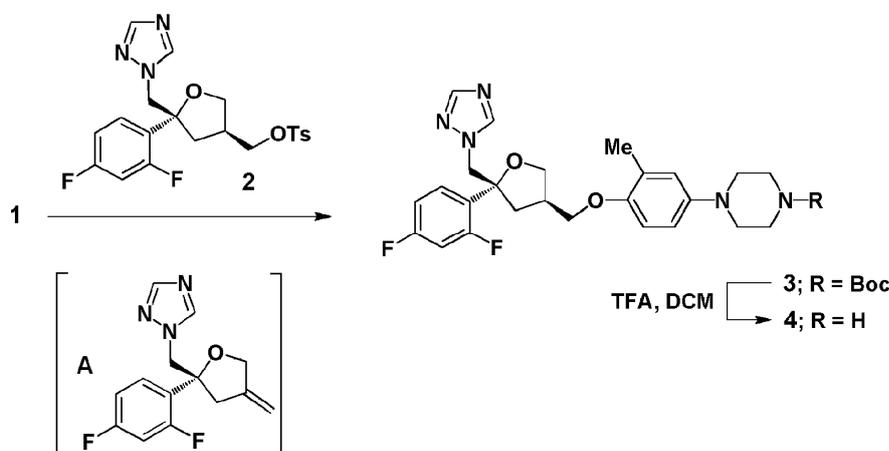
1

- Un matraz cargado con piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo (19,1 g, 103 mmol), 4-bromo-2-metil fenol (16,0 g, 86,0 mmol), RuPhos (798 mg, 1,71 mmol) y RuPhos G3 (1,43 g, 1,71 mmol) se evacuó y relleno con nitrógeno tres veces. Se adiciónó una solución de LiHMDS (1 M en THF, 257 mL, 257 mmol) mediante cánula y la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 3 h. Después de enfriar a TA, la mezcla se enfrió rápidamente mediante la adición de ácido clorhídrico ac. 1 M (400 mL) a 0°C y a continuación se neutralizó con NaHCO₃ sat. ac. (400 mL). La capa ac. se extrajo con EtOAc (1 x 400 mL y a continuación, 2 x 200 mL) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (500 mL) y se secaron. Los volátiles se eliminaron *in vacuo* para proporcionar un producto bruto que se trituró en éter dietílico:hexano (2:1) (750 mL) y se recogió por filtración para proporcionar el compuesto del título, el **Producto intermedio (1)**, como un sólido de color rosa, (20,7 g, 76 %); t_R 2,07 min (Procedimiento 1b); m/z 293 (M+H)⁺ (ES⁺);

45

^1H RMN δ : 1,41 (9H, s), 2,07 (3H, s), 2,86-2,88 (4H, m), 3,41-3,43 (4H, m), 6,58-6,66 (2H, m), 6,71 (1H, d) y 8,73 (1H, s).

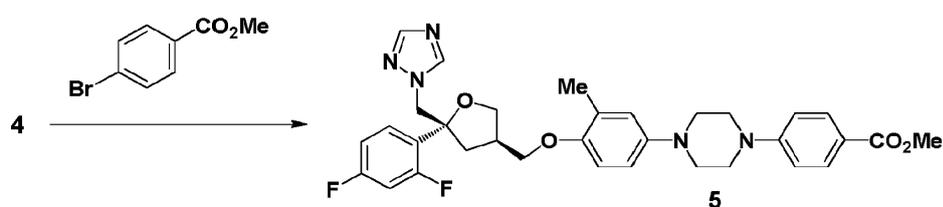
1-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-Triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina.



A una solución de producto intermedio (**1**) (21,5 g, 66,1 mmol) en DMSO (408 mL) se añadió hidróxido de sodio ac. (28,3 mL, 3,5 M, 99,0 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 30 min y, a continuación, se trató porción a porción con (3S,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metil4-metilbencenosulfonato (**2**) (ex APiChem, Número de catálogo: AC-8330, 32,7 g, 72,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30°C durante 18 h, se enfrió a TA y se adicionó agua (600 ml). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaHCO_3 sat. ac. (2 x 500 ml) y con salmuera (500 ml) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo* para proporcionar un aceite marrón (aprox. 41 g). El análisis del producto bruto protegido con *N*-Boc (**3**) mediante RMN ^1H indicó que contenía aproximadamente un 10 % molar del producto de la eliminación de alqueno: (R)-1-((2-(2,4-difluorofenil)-4-metilentetrahidrofurano-2-il)metil)-1H-1,2,4-triazol, [**A**], junto con algunos materiales de partida sin reaccionar. Este producto en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación.

El uretano bruto (**3**) se recogió en DCM (260 mL) y se trató con TFA (76,0 mL, 991 mmol). Después de 2 h a TA, la mezcla de reacción se concentró *in vacuo* para eliminar la mayoría de los volátiles y a continuación, se diluyó con DCM (200 mL) y se neutralizó cuidadosamente con NaHCO_3 sat. ac. (500 mL) hasta pH 7, con lo que se consiguió la formación de una emulsión. La mezcla se acidificó hasta pH 1 mediante la adición de ácido clorhídrico 1M (250 mL) y se adicionó DCM (350 mL) para formar una mezcla bifásica (de dos capas). Se separó y retuvo la fase ac. y la fase orgánica se extrajo con ácido clorhídrico 1M (800 ml). Las capas ac. combinadas se basificaron mediante la adición de hidróxido de sodio ac. 2M (500 mL) hasta pH 14 y a continuación, se extrajeron con EtOAc (3 x 500 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (2000 mL) y a continuación se secaron y evaporaron *in vacuo* para proporcionar el compuesto del título, (**4**), como un aceite marrón viscoso (24,6 g, 78 %); t^R 1,46 min (Procedimiento 1a); m/z 470 (M+H) $^+$ (ES $^+$); RMN ^1H δ : 2,07 (3H, s), 2,15 (1H, dd), 2,36-2,42 (1H, m), 2,52-2,56 (1H, m), 2,79-2,81 (4H, m), 2,87-2,90 (4H, m), 3,66 (1H, dd), 3,73-3,77 (2H, m), 4,04 (1H, t), 4,57 (2H, dd), 6,64 (1H, dd), 6,70-6,75 (2H, m), 6,99 (1H, td), 7,25-7,33 (2H, m), 7,76 (1H, s) y 8,34 (1H, s).

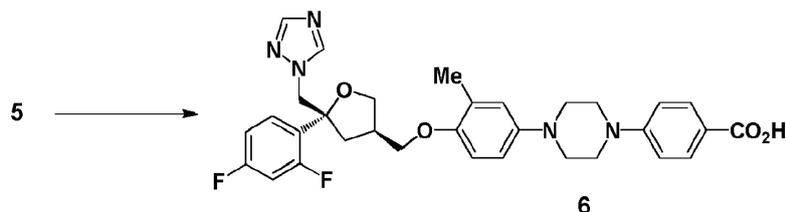
Metil 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)benzoato.



Un matraz cargado con producto intermedio (**4**) (19,1 g, 40,7 mmol), metil-4-bromobenzoato (10,5 g, 48,8 mmol), RuPhos (0,38 g, 0,81 mmol, 2 % molar), RuPhosG3 (0,68 g, 0,81 mmol, 2 % molar) y carbonato de cesio (21,2 g, 65,1 mmol) se evacuó y rellenó con nitrógeno tres veces antes de añadir DMF (500 mL). La mezcla se calentó a 90°C durante 18 h, se enfrió a TA, y se vertió en agua (300 mL). El sólido resultante se recolectó mediante filtración y se

lavó con agua (3 x 100 ml) y con éter dietílico (3 x 75 ml) y a continuación, se secó *in vacuo* a 50°C para obtener el compuesto del título, (5), como un sólido marrón claro (22,8 g, 89%); T_r 2,56 min (Procedimiento 1a); m/z 604 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H RMN δ : 2,09 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,36-2,42 (1H, m), 2,53-2,57 (1H, m), 3,11-3,13 (4H, m), 3,43-3,46 (4H, m), 3,67 (1H, dd), 3,74-3,79 (5H, s superponiéndose sobre m), 4,04 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br d), 7,00 (1H, td), 7,04 (2H, d), 7,27-7,34 (2H, m), 7,77 (1H, s), 7,81 (2H, d) y 8,35 (1H, s).

Ácido 4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-Triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)benzoico.



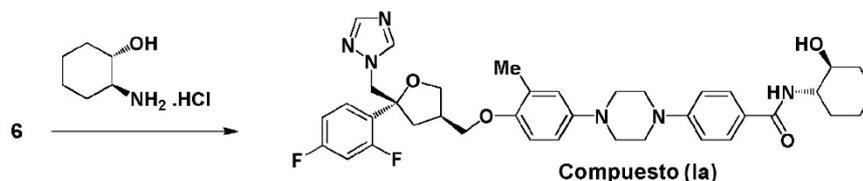
A una suspensión de producto intermedio (5) (22,8 g, 37,8 mmol) en DMSO (1000 mL) se añadió una solución de hidróxido de litio (4,52 g, 188 mmol) en agua (100 mL). La mezcla se calentó a 70°C durante 22 h y a continuación se enfrió a TA, se vertió en agua (1000 ml) y se acidificó a pH 2 mediante la adición de ácido clorhídrico 1 M (300 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo durante 2 h y el precipitado resultante se recolectó mediante filtración. La torta del filtro se lavó con agua (2 x 200 ml) y con éter dietílico (4 x 200 mL). El sólido bruto se trituró con THF (150 ml), se recolectó mediante filtración y a continuación, se lavó con éter dietílico (3 x 100 mL) y se secó *in vacuo* a 50°C para proporcionar el compuesto del título, (6), como un sólido blanquecino (19,7 g, 88%); T_r 2,28 min (Procedimiento 1a); m/z 590 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H RMN δ : 2,09 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,36-2,42 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,11-3,14 (4H, m), 3,41-3,44 (4H, m), 3,67 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,04 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br d), 6,97-7,03 (3H, m), 7,26-7,34 (2H, m), 7,77-7,80 (3H, m), 8,34 (1H, s) y 12,32 (1H, s).

15

20

Compuesto (1a): 4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-Triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-N-((1S,2S)-2-hidroxiclohexil)benzamida.

25



A una mezcla de producto intermedio (6) (100 mg, 0,17 mmol), EDCI (65 mg, 0,34 mmol) y DMAP (2,07 mg, 0,017 mmol) en piridina (1,0 mL) se añadió (1S,2S)-2-clorhidrato de aminociclohexanol (51,4 mg, 0,34 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 16 h y a continuación se diluyó con DCM (8,0 ml) y se lavó con ácido clorhídrico 1 M (2,0 ml). La mezcla se pasó a través de un separador de fases y los orgánicos se evaporaron *in vacuo*. El producto bruto así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de desorción súbita (SiO₂, 12 g, 0-5% de MeOH en EtOAc, elución por gradiente) para proporcionar el compuesto del título, (1a), como un sólido blanco (75 mg, 64%).

30

35 Preparación de Compuestos (1b-1d)

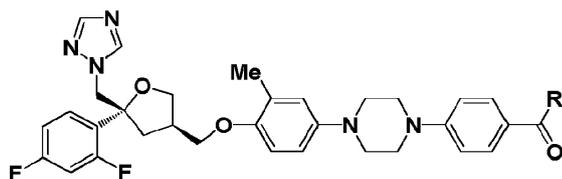
Los restantes ejemplos de compuestos de la invención se prepararon de manera similar acoplado el producto intermedio de ácido benzoico (6) con el estereoisómero singular de 2-aminociclohexanol adecuado. Estos compuestos se pueden obtener fácilmente de fuentes comerciales. Los materiales obtenidos de Sigma Aldrich se suministraron como las sales de hidrocloreto para las que se especificaron las siguientes enantiopuridades: (1S,2S) isómero *trans*, >98% ee; (1R, 2R) isómero *trans*, >98% ee; (1R, 2S) isómero *cis* >97% ee; (1S, 2R) isómero *cis*, >97% ee.

40

Los datos de LCMS y espectros de RMN ¹H para los ejemplos de compuestos (1a-1d) se presentan a continuación (Tabla 2).

45

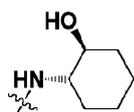
Tabla 2: Datos analíticos y espectrales de los Compuestos de la invención

**R N.º de ejemplo, Nombre, Datos de LCMS y RMN**

1a 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-Triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)

tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-*N*-((1*S*,2*S*)-2-hidroxiciclohexil) benzamida.

t^R 2,15 min (Procedimiento 1a); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺);

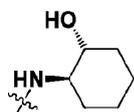


RMN ¹H δ: 1,15-1,28 (4H, m), 1,61-1,65 (2H, m), 1,82-1,92 (2H, m), 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,15 (4H, m), 3,36-3,43 (5H, m), 3,55-3,62 (1H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,53-4,62 (3H, m), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br s), 6,97-7,02 (3H, m), 7,25-7,34 (2H, m), 7,76-7,82 (4H, m), 8,34 (1H, s).

1b: 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)

tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-*N*-((1*R*,2*R*)-2-hidroxiciclohexil)benzamida.

t^R 2,14 min (Procedimiento 1a); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺);

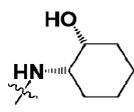


RMN ¹H δ: 1,15-1,28 (4H, m), 1,61-1,65 (2H, m), 1,82-1,92 (2H, m), 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,15 (4H, m), 3,36-3,43 (5H, m), 3,55-3,62 (1H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,53-4,62 (3H, m), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br s), 6,97-7,02 (3H, m), 7,25-7,34 (2H, m), 7,76-7,82 (4H, m), 8,34 (1H, s).

1c: 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)

tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-*N*-((1*S*,2*R*)-2-hidroxiciclohexil)benzamida.

t^R 2,46 min (Procedimiento 1b); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺);

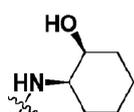


RMN ¹H δ: 1,23-1,34 (2H, m), 1,41-1,74 (6H, m), 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,42 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,14 (4H, m), 3,36-3,38 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,82 (4H, m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 4,68 (1H, d), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br s), 6,98-7,02 (3H, m), 7,26-7,34 (2H, m), 7,51 (1H, d), 7,75-7,77 (3H, m), 8,34 (1H, s).

1d: 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)

tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-*N*-((1*R*,2*S*)-2-hidroxiciclohexil)benzamida.

t^R 2,46 min (Procedimiento 1b); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺);



RMN ¹H δ: 1,23-1,34 (2H, m), 1,41-1,74 (6H, m), 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,42 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,14 (4H, m), 3,36-3,38 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,82 (4H, m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 4,68 (1H, d), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, brs), 6,97-7,02 (3H, m), 7,25-7,34 (2H, m), 7,50 (1H, d), 7,75-7,77 (3H, m), 8,34 (1H, s).

Ensayos biológicos: procedimientos experimentales**5 Evaluación del crecimiento fúngico planctónico: Ensayo de microdilución en caldo**

Este ensayo se efectuó usando un procedimiento modificado publicado por EUCAST (**Rodríguez-Tudela y col.**, 2008).

Se cultivaron esporas de *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010, NCPF7010 [mutación 220 de metionina], NCPF7099 [mutación G54 de glicina] de Public Health England, Wiltshire; mutantes TR34/L98H del St Louis Hospital, París,

- 10 Francia; mutantes TR46/Y121F/T289A de la Universidad de Delhi, Delhi, India) en agar dextrosa Sabouraud durante 3 días. Se preparó una suspensión madre de esporas a partir de un cultivo de agar dextrosa Sabouraud lavando con PBS-tween (10 ml; solución salina tamponada con fosfato que contiene 0,05 % de Tween-20, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina). El recuento de esporas se evaluó usando un hemocitómetro Neubauer y a continuación se ajustó a 10⁶ esporas/ml con PBS.
- 15 MOPS RPMI-1640 (50 mL; RPMI-1640 que contiene L-glutamina 2 mM, 0,5 % de BSA, 2 % de glucosa, MOPS 0,165 M, tamponado a pH 7 con NaOH) esterilizado con filtro.

Para el ensayo, primero se adicionó BSA MOPS RPMI-1640 (50 µl/pocillo) en toda la placa de 384 pocillos (número de catálogo 353962, BD Falcon, Oxford, Reino Unido). Los compuestos de prueba (solución de DMSO de 0,5 µl) se

- adicionaron, a continuación, por cuadruplicado usando un VIAFLO 96 de Integra (Integra, Zizers, Suiza) y se mezclaron bien usando un mezclador de placas. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de la suspensión de trabajo de esporas preparada anteriormente a todos los pocillos excepto a los pocillos de control sin esporas. Para los pocillos de control sin esporas, se adicionó en su lugar solución de BSA MOPS-RPMI (50 µl/pocillo). La placa se cubrió con una tapa de plástico y se incubó (35°C con aire ambiente) durante 48 h. La DO de cada pocillo a 530 nm se determinó usando un multiescáner (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, Reino Unido). Se calculó el porcentaje de inhibición para cada pocillo y se calcularon los valores CMI₅₀, CMI₇₅ y CMI₉₀ a partir de la curva de concentración-respuesta generada para cada compuesto de ensayo.
- 10 El cribado del panel de hongos fue realizado por Eurofins Panlabs Inc. Los valores CMI y CMI₅₀ de los artículos de ensayo se determinaron siguiendo las directrices del CLSI: procedimientos de microdilución en caldo para levaduras (CLSI M27-A2), (CLSI, 2002) y para hongos filamentosos (CLSI M38-A), (CLSI, 2008).

Infección con Aspergillus fumigatus de células epiteliales bronquiales

- 15 Se sembraron células BEAS2B en placas de 96 pocillos (100 µl; 3 x 10⁴ células/pocillo; No. de catálogo 3596, Sigma Aldrich, Dorset, Reino Unido) en 10 % de FBS RPMI-1640 y a continuación se incubaron (37°C, 5 % de CO₂) durante un día antes de la experimentación. Se adicionaron los compuestos de ensayo (solución de DMSO de 0,5 µl) o vehículo (DMSO) a cada pocillo para proporcionar una concentración final de DMSO de 0,5%. Las células BEAS2B se incubaron con los compuestos de ensayo durante 1 h (35°C, 5% de CO₂) antes de la infección con suspensión de conidios (0,5 x 10⁵/ml en 10% de FBS RPMI-1640) de *Aspergillus fumigatus* (20 µl; Public Health England). La placa se incubó durante 24 h (35°C, 5% de CO₂). El sobrenadante (50 µl) se recolectó y se transfirió a una placa de PCR (No. de catálogo L1402-9700, Starlab, Milton Keynes, Reino Unido), que se congeló (-20°C) hasta su uso. Después de descongelar, el sobrenadante (5 µl) se diluyó 1:20 adicionando solución de R7-PBS (95 µl; R7 a PBS 1:4; Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EE.UU.). Los niveles de galactomanano en estas muestras (50 µl) se midieron usando kits de Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EE.UU.). Se calculó el porcentaje de inhibición para cada pocillo y se calculó el valor CI₅₀ a partir de la curva de concentración-respuesta generada para cada compuesto de ensayo.

30 Infección con Aspergillus fumigatus de bicapas de alvéolos humanos

- Los modelos *in vitro* de alvéolos humanos, que consisten en una bicapa de células epiteliales y células endoteliales alveolares humanas, como se describió anteriormente (Hope y col., 2007). Este sistema permite la administración de un compuesto de ensayo a los compartimentos superior (espacio "aire") y/o inferior (espacio "sistémico"). Esta flexibilidad se ha aprovechado para explorar los efectos del tratamiento combinado administrando el Compuesto (I) de compuesto a la cámara superior y posaconazol u otros agentes antifúngicos a la cámara inferior. Se cosecharon células endoteliales de arteria pulmonar humana primarias (HPAEC) y se diluyeron a 10⁶ células/ml en medio EGM-2 (Lonza, Basilea, Suiza). Se invirtieron los transpocillos y se aplicó la suspensión de células (100 µl/pocillo) a la base de cada transpocillo. Los transpocillos invertidos se incubaron a TA dentro de una campana de flujo durante 2 h, después de lo cual se giraron a la posición vertical. Se adicionó medio EGM-2 a los compartimentos inferior (700 µl/pocillo) y superior (100 µl/pocillo) y se incubaron los transpocillos durante 48 h (37°C, 5% de CO₂). El medio EGM-2 del compartimento inferior se sustituyó a continuación por medio EGM-2 fresco. Las células A549 se cosecharon y diluyeron a 5 x 10⁵ células/ml en 10 % de EBM, a continuación, se adicionaron al compartimento superior (100 µl/pocillo) de todos los transpocillos y se incubaron las placas durante 72 h (37°C, 5 % de CO₂). Se cultivaron conidios de cepas de *Aspergillus fumigatus* sensibles al itraconazol (NCPF2010) y resistentes al itraconazol (TR34-L98H) por separado en agar dextrosa Sabouraud durante 3 días. Se preparó una suspensión madre de conidios de cualquiera de las cepas a partir de un cultivo de agar dextrosa Sabouraud lavando con PBS-tween (10 ml; PBS que contiene 0,05 % de Tween-20, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin). El recuento de conidios se evaluó utilizando un hemocitómetro Neubauer y se ajustó a 10⁶ conidios/ml con PBS. Se preparó una solución madre de trabajo de conidios en EBM (10⁵ conidios/ml) inmediatamente antes de su uso.

- Se adicionaron los compuestos de ensayo y de referencia (o DMSO puro como vehículo) a los pocillos apropiados de placas de 24 pocillos (3 µl/pocillo que contenían 600 µl de FBS EBM a 2%) para el tratamiento del compartimento inferior y a placas de 96 pocillos (1 µl/pocillo que contenía 200 µl de FBS EBM a 2%) para el tratamiento del compartimento superior, para proporcionar una concentración final de DMSO de 0,5%. Se aspiró el medio del compartimento superior y se adicionaron los que contenían los compuestos de ensayo y de referencia apropiados, o vehículo, (100 µl/pocillo). Los transpocillos se transfirieron a continuación a la placa de 24 pocillos que contenía los compuestos de ensayo y de referencia o vehículo de DMSO. Después de la incubación durante 1 h (35°C, 5 % de CO₂), se adicionó la suspensión de conidios (10 µl/pocillo) al compartimento superior de cada transpocillo. Las placas se incubaron a continuación durante 24 h (35°C, 5% de CO₂). Los sobrenadantes de cada compartimento (5 µl/compartimento) se recolectaron y almacenaron (-20°C). El medio se sustituyó diariamente después de recolectar los sobrenadantes y se trataron todos los pocillos con los compuestos de ensayo y de referencia o con DMSO, como

se describió anteriormente, durante 3 días. Se siguieron recolectando muestras hasta que el crecimiento fúngico fue visible a simple vista en todos los transpocillos. Los niveles de GM en el sobrenadante del compartimiento inferior se midieron a continuación mediante ELISA (BioRad, CA, EE.UU.) como un índice de la invasión de *Aspergillus fumigatus*.

5 Viabilidad celular: ensayo de resazurina

Las células BEAS2B se sembraron en placas de 384 pocillos (100 µl; 3000/pocillo; BD Falcon, No. de catálogo 353962) en RPMI-LHC8 (medio RPMI-1640 y LHC8 combinado en proporciones iguales) un día antes de la experimentación. Para los pocillos de control exentos de células, se adicionó RPMI-LHC8 (100 µl). Se adicionaron los compuestos de ensayo (0,5 µl de una solución de DMSO) para proporcionar una concentración final de DMSO de 0,5 % usando un VIAFLO 96 de Integra (Integra, Zizers, Suiza). Se incubaron células BEAS2B con cada compuesto de ensayo durante 1 día (37°C/5% de CO₂ en RPMI-LHC8). Después de la adición de solución madre de resazurina (5 µl, 0,04 %), las placas se incubaron durante 4 h adicionales ((37°C/5% de CO₂). La fluorescencia de cada pocillo a 545 nm (excitación) y 590 nm (emisión) se determinó usando un multiescáner (Clariostar; BMG Labtech). El porcentaje de pérdida de viabilidad celular se calculó para cada pocillo con respecto al tratamiento con vehículo (0,5 % de DMSO). Cuando procedía, se calculó un valor CC₅₀ a partir de la curva de concentración-respuesta generada a partir de la curva de concentración-respuesta para cada compuesto de ensayo.

Actividad antifúngica in vivo

Aspergillus fumigatus (ATCC 13073 [cepa: NIH 5233], American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.) en placas de agar de Malta (Nissui Pharmaceutical, Tokio, Japón) durante 6-7 días a TA (24 ± 1°C). Las esporas se desprendieron asépticamente de las placas de agar y se suspendieron en agua destilada estéril con 0,05 % de Tween 80 y 0,1 % de agar. El día de la infección, se evaluaron los recuentos de esporas mediante hemocitómetro y se ajustó el inóculo para obtener una concentración de 1,67 × 10⁸ esporas ml⁻¹ de solución salina fisiológica. Para inducir la inmunosupresión y neutropenia, se administró a ratones A/J (machos, 5 semanas de edad) hidrocortisona (Sigma H4881; 125 mg/kg, sc.) en los días 3, 2 y 1 antes de la infección, y ciclofosfamida (Sigma C0768; 250 mg/kg, i.p.) 2 días antes de la infección. El día 0, los animales se infectaron con la suspensión de esporas (30 µl intranasalmente).

Las sustancias de ensayo se administraron por vía intranasal (35 µl de una suspensión (0,0032-10,0 mg/mL de sustancia farmacológica en solución salina fisiológica) una vez al día, sólo los días 1, 2 y 3 (lo que representa un régimen de tratamiento terapéutico). Para un tratamiento profiláctico prolongado, se administraron compuestos de ensayo (35 µl de una suspensión de 0,0032 o 0,016 mg/mL en solución salina fisiológica) por vía intranasal una vez al día durante siete días. Un grupo recibió la dosis 30 minutos antes de la infección el día 0, pero no posteriormente, mientras que un segundo grupo recibió una dosis adicional los días 1, 2 y 3 después de la infección. Los efectos de estos paradigmas de tratamiento se compararon con los obtenidos cuando el tratamiento se limitó, en otros grupos, a un día o a 30 minutos antes de la inoculación y a continuación, a los días 1, 2 y 3 después de la infección en ambos casos. En un último grupo, la dosificación se limitó aún más con animales a los que se les administró dos veces, sólo un día y 30 min. antes de la infección.

El peso corporal de los animales se monitorizó diariamente y a las 6 horas después de haber administrado la última dosis del fármaco el día 3, se anestesió a los animales, se les introdujo una cánula en la tráquea y se recolectaron sangre y tejido pulmonar en BALF. Los niveles de IL-6 y TNFα en suero se determinaron usando el kit de ELISA de IL-6 o TNF-α de ratón Quantikine® (R&D systems, Inc., Mineápolis, MN, EE.UU.), respectivamente. El GM de *Aspergillus* en suero se determinó usando kits de Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EE.UU.). El índice de corte (COI) se calculó mediante la fórmula: Índice de corte = DO en la muestra /DO en el control de corte proporcionado en el kit. Para los ensayos de carga fúngica tisular, se eliminaron asépticamente 100 mg de tejido pulmonar y se homogeneizaron en 0,2 ml de agar a 0,1 % en agua destilada estéril. Los homogenatos pulmonares diluidos en serie se emplacaron en placas de agar de malta (50 µL/placa) y se incubaron a 24±1°C durante 72 a 96 h. Se contaron las colonias de *A. fumigatus* en cada placa y la concentración fúngica se presenta en esta solicitud como UFC por gramo de tejido pulmonar.

Para determinar el contenido de ADN de *Aspergillus fumigatus*, se extrajo ADN o bien, de pulmones infectados o de *Aspergillus fumigatus* con el Isoplant (Nippon Gene) según las instrucciones del fabricante. Los tejidos cortados a <3 mm de cualquier longitud se mezclaron con la solución I (tampón de extracción: 300 µL). A continuación, se añadió solución II (tampón de lisis; cloruro de bencilo:150 µL) a las mezclas y se mezclaron con un mezclador de vórtice durante 5 segundos. Después de incubar a 50°C durante 15 min, se añadió la solución III (acetato de sodio, pH5,2: 150 µL) a las mezclas, que se agitaron enérgicamente durante 1-3 segundos y a continuación, se incubaron en hielo durante 15 min. Después de la incubación, las mezclas se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4°C. El ADN en las fases ac. superiores de los sobrenadantes se precipitó con etanol al 100% (x 2,5 vol), se lavó con etanol al 70% y se disolvió en 5-10 µL de tampón TE.

La amplificación de ADN se realizó con Premix Ex Taq™ (Takara Bio) en la placa de reacción óptica de 96 pocillos. Los fragmentos genéticos de ARNr de *Aspergillus fumigatus* 18S se amplificaron con el par de cebadores; 5'-GGCCCTTAA ATAGCCCGGT-3' (SEQ ID N.º 1) y 5'-TGAGCCGATAGTCCCCCTAA-3' (SEQ ID N.º 2), y la sonda de hibridación; 5'-FAM-AGCCAGCGCCCGCAAATG-TAMRA-3' (SEQ ID N.º 3). Se realizó una PCR en tiempo real en un 5 (25 µL contenían 50 ng de ADN de ratón con 200 nM de sonda) en las siguientes condiciones: incubación inicial durante 2 min a 50°C, desnaturalización inicial durante 10 min a 95°C, seguida de 55 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min a 65°C. Las cantidades de ADN de *Aspergillus fumigatus* en 50 ng de ADN de pulmón de ratón se evaluaron a partir de la curva estándar con 0,05-50.000 pg de ADN de *Aspergillus fumigatus*.

10 Resumen de los resultados del cribado

El Compuesto (I) presenta una actividad inhibitora potente contra el crecimiento fúngico planctónico como se evalúa en un ensayo de microdilución en caldo (**Tabla 3**).

15 **Tabla 3** Efectos del tratamiento con voriconazol, posaconazol, anfotericina B y los Compuestos (**la-d**) sobre el crecimiento fúngico planctónico de aislados de *Aspergillus fumigatus*.

Tratamiento (compuesto de prueba)	Valores CMI ₇₅ (nM) contra las cepas clínicas de <i>Aspergillus fumigatus</i> indicadas ¹				
	NCPF2010	L98H	TR46	NCPF7099	NCPF7100
Voriconazol	511	2585	> 2860	113	543
Posaconazol	10,9	98,3	414	167	59,7
Anfotericina B	407	195	187	248	523
Compuesto (Ia)	2,81	12,7	93	10,0	12,7
Compuesto (Ib)	8,02	303	334	86,2	87,3
Compuesto (Ia)	2,27	54,9	164	11,5	10,9
Compuesto (Id)	8,51	70,0	316	11,7	25,2

Notas al pie de la tabla: 1. Ensayo de microdilución en caldo, n = 2-3

En estos ensayos, el Compuesto (**Ia**) en particular mostró una potencia significativamente mayor frente a las cepas resistentes al posaconazol (NCPF7099, NCPF7100, TR34/L98H y TR46/Y121F/T289A) y a una cepa sensible al posaconazol (NCPF2010), que el posaconazol, el voriconazol y la anfotericina B.

Los compuestos (**Ia** y **Ic**) también demuestran una actividad inhibitora potente contra la infección fúngica de las células epiteliales bronquiales (**Tabla 4**). En estos sistemas de ensayo, los Compuestos (**Ia** y **Ic**) mostraron una potencia significativamente mayor que el voriconazol y una potencia mayor que el posaconazol. La incubación con los 25 compuestos (**Ia**, **Ib**, **Ic** y **Id**) tuvo poco o ningún efecto sobre la viabilidad de las células epiteliales bronquiales BEAS2B en las concentraciones que se indican a continuación.

30 **Tabla 4:** Efectos del tratamiento con voriconazol, posaconazol, anfotericina B y los Compuestos (**la-d**) sobre el crecimiento fúngico planctónico de *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010), sobre la infección fúngica de células epiteliales bronquiales BEAS2B y sobre la viabilidad de las células BEAS2B.

Tratamiento (compuesto de prueba)	Valores CMI ₅₀ / CC ₅₀ para el tratamiento indicado (nM)	
	Infeción de células BEAS2B ¹	Viabilidad celular de BEAS2B ²
	CMI ₅₀	CC ₅₀
Voriconazol	154	> 28600
Posaconazol	11,6	> 14300
Anfotericina B	ne	2343
Compuesto (Ia)	6,35	>14600
Compuesto (Ib)	ne	> 14600
Compuesto (Ic)	1,86	>14600

Tratamiento (compuesto de prueba)	Valores CMI ₅₀ / CC ₅₀ para el tratamiento indicado (nM)	
	Infeción de células BEAS2B ¹	Viabilidad celular de BEAS2B ²
	CMI ₅₀	CC ₅₀
Compuesto (Id)	ne	>14600

Notas al pie de la tabla: 1. Células epiteliales bronquiales; n = 1-3; 2. n = 3; ne: no ensayadas.

Los efectos del Compuesto (I) sobre el crecimiento de un amplio abanico de patógenos fúngicos se evaluaron usando los procedimientos de microdilución en caldo del CLSI. Se halló que el compuesto (Ia) era un potente inhibidor del crecimiento de *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Cladosporium herbarum* y *Trichophyton rubrum* así como de algunas especies de *Candida* spp. (notablemente *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*) y algunas especies de *Aspergillus* spp. (notablemente *Aspergillus flavus*) (Tabla 5).

10 **Tabla 5** Efectos inhibidores del Compuesto (Ia) sobre el crecimiento de un intervalo de especies fúngicas.

Agente fúngico	Cepa	Compuesto (Ia)		Voriconazol		Posaconazol	
		CMI ₅₀	CMI ₁₀₀	CMI ₅₀	CMI ₁₀₀	CMI ₅₀	CMI ₁₀₀
		(µg/ml)		(µg/ml)		(µg/ml)	
<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC204304	0,13	0,13	1,0	2,0	0,063	0,13
<i>Aureobasidium pullulans</i>	ATCC9348	0,25	1,0	>8,0	>8,0	0,25	1,0
	20240,047	0,016	>2,0	0,031	>8,0	0,031	>8,0
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	0,25	>2,0	0,25	>8,0	0,13	>8,0
	20183,073	0,125	>2,0	4,0	>8,0	0,25	>8,0
<i>Candida glabrata</i>	ATCC36583	0,25	>2,0	0,25	>8,0	0,5	>8,0
	20197,1	0,0078	>2,0	0,031	>8,0	0,031	>8,0
<i>Candida krusei</i>	ATCC6258	0,25	0,25	0,25	1,0	0,13	0,25
<i>Rhizopus oryzae</i>	ATCC11145	0,25	0,5	8,0	>8,0	0,13	>8,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC24067	0,016	0,063	0,016	1,0	0,016	0,25
<i>Chaetomium globosum</i>	ATCC44699	0,031	0,13	0,5	1,0	0,13	0,25
<i>Fusarium graminearum</i>	ATCC16106	0,13	0,5	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ATCC9480	0,063	0,13	1,0	2,0	0,063	0,13
<i>Cladosporium herbarum</i>	NCPF2564	0,016	0,016	SD	SD	SD	SD
<i>Trichophyton rubrum</i>	ATCC10218	SD	0,031	< 0,008	0,063	< 0,008	0,031

Notas al pie de la tabla: CMI₅₀ / CMI₁₀₀= concentración requerida para la inhibición de 50% y 100% del crecimiento fúngico mediante inspección visual (CLSI). SD = sin determinar

Las actividades inhibitoras de la invasión alveolar de *Aspergillus fumigatus* (cepa sensible a los azoles: NCPF2010; y cepa resistente a los azoles TR34/L98H) se determinaron midiendo el galactomanano (GM) en la cámara inferior en 15 bicapas de alvéolos humanos 1 día después de la infección. La administración del Compuesto (Ia) a la cámara apical produjo una inhibición dependiente de la concentración de los niveles de GM en la cámara inferior, con efectos máximos superiores al 90% para ambas cepas (Tablas 6 y 7).

20 **Tabla 6** Efectos del Compuesto (Ia) y posaconazol sobre la invasión de *Aspergillus fumigatus* (cepa susceptible a los azoles: NCPF2010) en la cámara inferior en bicapas de alvéolos humanos (transpocillos).

Tratamiento (compuesto de prueba)	Valores CMI para el tratamiento indicado (nM)	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Posaconazol	155	212

Valores CMI para el tratamiento indicado (nM)		
Compuesto (Ia)	154	185
Nota al pie de la tabla: n = 3.		

Tabla 7 Efectos del Compuesto (Ia) y posaconazol sobre la invasión de *Aspergillus fumigatus* (cepa resistente a los azoles: TR34/L98H) en la cámara inferior en bicapas de alvéolos humanos (transpocillos).

Tratamiento	Valores CMI para el tratamiento indicado (nM)	
Compuesto de ensayo	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Posaconazol	315	793
Compuesto (Ia)	261	417

Nota al pie de la tabla: n = 1

5

Cuando las actividades inhibitoras se monitorizaron durante varios días después de la infección, se halló que los efectos inhibitorios tempranos de la monoterapia con el Compuesto (Ia) (0,1 µg/mL en la cámara superior) o posaconazol (0,01 µg/mL en la cámara inferior) desaparecían rápidamente (Tabla 8). Por el contrario, el tratamiento combinado con el Compuesto (Ia) en la cámara superior y posaconazol en la cámara inferior (como anteriormente) produjo una inhibición sostenida de la invasión después de la infección. Por consiguiente, DFB₅₀ para el tratamiento combinado fue 3,63 días, mucho más largo que los valores para cualquiera de los compuestos por sí solos (Tabla 8). Este efecto sinérgico o al menos aditivo de la terapia combinada también se dio cuando el tratamiento con el Compuesto (Ia) se combinó con el de intraconazol, voriconazol o caspofungina (resultados no presentados).

10

15 **Tabla 8** Efectos del Compuesto (Ia), el posaconazol y el tratamiento combinado sobre la invasión de *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010) en la cámara inferior en bicapas de alvéolos humanos (transpocillos).

Niveles de GM en la cámara inferior para los tratamientos indicados Valor de DO (% de inhibición frente al control)

Día de tratamiento	Vehículo	Compuesto (Ia) ¹ Cámara superior	Posaconazol ² Cámara inferior	Tratamiento combinado
0	0	0	0	0
1	0,73	0,24 (66)	0,074 (89)	0,019 (97)
2	1,73	1,71 (1,5)	1,71 (1,5)	0,11 (94)
3	1,82	1,67 (8,6)	1,70 (7,1)	0,18 (90)
4	1,65	1,68 (-1,6)	1,70 (-3,0)	1,34 (19)
5	1,64	1,63 (0,2)	1,69 (-3,6)	1,72 (-5,3)
6	1,55	1,57 (-1,8)	1,59 (-3,0)	1,62 (-4,6)
7	1,66	1,54 (7,1)	1,62 (2,5)	1,59 (4,4)
Valores DFB₅₀ para los tratamientos indicados		1,04	1,16	3,63

Notas al pie de la tabla: 1. Administrado a 0,1 µg/ml; 2. Administrado a 0,01 µg/ml; DFB₅₀:: días necesarios para alcanzar una carga fúngica de 50 % del control

Además, este tratamiento combinado ha sido probado en bicapas infectadas con la cepa resistente al azol de *Aspergillus fumigatus*: TR34-L98H (Tabla 9) La monoterapia con el Compuesto (Ia) (0,3 µg/ml) en la cámara superior o con posaconazol (0,1 µg/ml) en la cámara inferior mostró un beneficio limitado. Por el contrario, la combinación del Compuesto (Ia) y posaconazol presentó efectos inhibitorios notables sobre la invasión fúngica en la cámara inferior.

20

25 **Tabla 9** Efectos del Compuesto (Ia), el posaconazol y el tratamiento combinado sobre la invasión de *Aspergillus fumigatus* (cepa resistente a los azoles: TR34-L98H) en la cámara inferior en el sistema celular de bicapa alveolar (transpocillos)

Niveles de GM en la cámara inferior para los tratamientos indicados Valor de DO (% de inhibición frente al control con vehículo)				
Día de tratamiento	Vehículo	Compuesto (I) ¹ Cámara superior	Posaconazol ² Cámara inferior	Tratamiento combinado
0	0	0	0	0
1	0,63	0,016 (98)	0,016 (98)	0,014 (98)
2	1,11	0,84 (24)	0,73 (35)	0,015 (99)
3	1,06	1,01 (4,6)	1,16 (-10)	0,020 (98)
Valores DFB₅₀ para los tratamientos indicados		1,53	1,94	> 3

Notas al pie de la tabla: 1. Administrado a 0,3 µg/ml; 2. Administrado a 0,1 µg/ml; DFB₅₀: días necesarios para alcanzar una carga fúngica de 50 % del control

5 Cuando se administró por vía intranasal a ratones neutropénicos inmunocomprometidos, en los días 1, 2 y 3 después de la inoculación (tratamiento terapéutico), el Compuesto (Ia) mostró cierta protección contra la pérdida de peso corporal, medida a lo largo de 3 días, causada por la infección con *Aspergillus fumigatus* en dosis más bajas que las requeridas de posaconazol. (Tabla 10).

Tabla 10: Efectos del tratamiento con el Compuesto (Ia) o posaconazol sobre la pérdida de peso corporal de ratones neutropénicos inmunocomprometidos causada por infección con *A. fumigatus*.

Régimen de tratamiento ²	Conc. de fármaco (mg/ml)	Pérdida de peso corporal ^{1,2} (Porcentaje de inhibición de la pérdida de peso)	
		Día 2	Día 3
Vehículo más esporas	ninguna	5,5 ± 1,5	10,7 ± 1,8
	0,0032	4,2 ± 1,2 (24)	9,7 ± 2,1 (9)
Compuesto (Ia)	0,016	3,6 ± 1,2 (35)	9,7 ± 3,2 (9)
	0,08	2,8 ± 2,4 (49)	8,3 ± 6,7 (22)
Vehículo más esporas	ninguna	4,7 ± 2,1	9,3 ± 2,7
	0,4	5,4 ± 0,4 (-15)	9,2 ± 4,0 (1)
Posaconazol	2	3,9 ± 1,3 (17)	7,1 ± 1,9 (24)
	10	3,9 ± 1,3 (17)	4,3 ± 1,8(54)

Notas al pie de la tabla: 1. Porcentaje de pérdida de peso causada por la infección con *A. fumigatus* en comparación con el peso del animal el día 1 cuando se inició el tratamiento; 2. Se realizaron dos estudios separados.

10

Además, el tratamiento terapéutico con el compuesto (Ia) mostró efectos superiores al posaconazol en la carga fúngica en el pulmón, en las concentraciones de galactomanano en el suero y en el contenido de ADN de *Aspergillus fumigatus* en los pulmones. Estos datos sobre el Compuesto (I) se muestran en la Tabla 11 y en las figs. 1, 2 y 3.

15

Tabla 11: Efectos del tratamiento profiláctico y terapéutico con el Compuesto (Ia) sobre las UFC en el pulmón, las concentraciones de galactomanano en suero y en el ADN de *Aspergillus* en los pulmones de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*

Régimen de tratamiento	Conc. de fármaco (µg/ml)	% de inhibición de la respuesta		
		UFC (/mg de pulmón)	GM en suero (COI)	ADN en el pulmón (pg/50ng de ADN de ratón)
Vehículo más esporas	Ninguna	31,7 ± 17,4	3,38 ± 2,02	70,7 ± 41,3
Compuesto (Ia)	3,2	25,8 ± 20,8 (19)	2,85 ± 2,76 (16)	41,7 ± 29,0 (41)

Régimen de tratamiento	Conc. de fármaco (µg/ml)	% de inhibición de la respuesta		
		UFC (/mg de pulmón)	GM en suero (COI)	ADN en el pulmón (pg/50ng de ADN de ratón)
	16	24,2 ± 15,8 (24)	3,01 ± 2,14 (11)	56,1 ± 53,4 (21)
	80	9,30 ± 5,20 (71)	0,53 ± 0,38 (84)	4,10 ± 4,60 (94)

Notas al pie de la tabla: los datos para la carga fúngica se presentan como la media ± error estándar de la media (EEM; n = 6).

También se presentan a continuación los valores DI₅₀ para posaconazol y el Compuesto (Ia), administrados con fines terapéuticos en experimentos independientes (**Tabla 12**).

5

Tabla 12: Valores DI₅₀ para el tratamiento terapéutico con posaconazol y el Compuesto (Ia) sobre la carga fúngica en el pulmón, sobre las concentraciones de galactomanano en suero y sobre el contenido de ADN de *Aspergillus fumigatus* en el tejido pulmonar de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Sustancia del fármaco (régimen terapéutico)	Valores DI ₅₀ para la respuesta indicada (mg/ml)		
	Carga fúngica en el pulmón	GM en suero	ADN de <i>A. fumigatus</i> en el pulmón
Compuesto (Ia)	0,051	0,047	0,050
Posaconazol	0,39	0,59	ne

Notas al pie de la tabla: ne: no ensayado

10

También se halló que el tratamiento terapéutico con el Compuesto (Ia) inhibe las concentraciones de citoquinas séricas en ratones neutropénicos e inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*. (**Tablas 13 y 14; Figuras 1, 2 y 3**). Los valores DI₅₀ calculados para la inhibición de los niveles de citoquinas séricas (**Tabla 14**) son muy similares a los observados para la carga fúngica pulmonar, las concentraciones séricas de galactomanano y el contenido de

15 ADN de *Aspergillus fumigatus* pulmonar (arriba).

Tabla 13: Efectos del tratamiento terapéutico con el Compuesto (Ia) sobre los niveles de IL-6 y TNFα en el suero de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Régimen de tratamiento	Conc. de fármaco (µg/ml)	Conc. de los biomarcadores (pg/ml) (% de inhibición)	
		IL-6	TNFα
Vehículo más esporas	ninguna	298 ± 142	35,3 ± 10,1
	3,2	247 ± 185 (17)	28,1 ± 13,8 (20)
Compuesto (Ia)	16	262 ± 185 (12)	21,8 ± 14,6 (38)
	80	66,5 ± 32,9 (78)	4,7 ± 1,0 (87)

Notas al pie de la tabla: los datos para las concentraciones de biomarcador se presentan como la media ± error estándar de la media (EEM), N = 6.

20 **Tabla 14:** Valores de DI₅₀ para el tratamiento terapéutico con el Compuesto (Ia) sobre los niveles de IL-6 y TNFα en el suero de ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Sustancia del fármaco (régimen profiláctico)	Valores de DI ₅₀ para los biomarcadores indicados (mg/ml)	
	IL-6	TNFα
Compuesto (Ia)	0,050	0,027

25 También se evaluaron los efectos de la administración profiláctica prolongada del Compuesto (Ia) en ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*. Se halló que la profilaxis prolongada con el Compuesto (Ia) inhibía la carga fúngica en el pulmón, así como las concentraciones de GM, tanto en BALF como en suero, a dosis 25 veces inferiores que las usadas en un estudio anterior (**Tabla 15**). Además, los datos sugieren

una acumulación de efectos antifúngicos en el pulmón en la administración repetida, ya que siete días de profilaxis produjeron efectos antifúngicos mayores que el tratamiento profiláctico durante un solo día. La persistencia de acción del compuesto en el pulmón es sugerida por el hallazgo de que el tratamiento en los días -7 al día 0 generó efectos antifúngicos superiores en el día 3 que los resultantes del tratamiento solo en los días -1 y 0.

5

Tabla 15 Efectos de la administración profiláctica prolongada del Compuesto (**Ia**) sobre la carga fúngica (UFC) en el pulmón y las concentraciones de GM en el BALF y suero en ratones neutropénicos inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*.

Régimen de tratamiento ¹ (días de administración)	Dosis del compuesto (Ia) (µg/mL)	Valores UFC, valores COI de GM en BALF y en suero y porcentaje de inhibición de respuestas ²		
		UFC (/mg de pulmón)	GM en BALF (COI)	GM en suero (COI)
Vehículo más esporas	Ninguna	9,2 ± 4,9	4,1 ± 0,7	3,9 ± 0,7
-7 a +3	0,64	2,0 ± 3,6 (78)	3,1 ± 0,85 (24)	2,6 ± 0,82 (33)
-1 a +3	0,64	4,0 ± 5,2 (57)	3,9 ± 0,59 (5)	3,6 ± 0,52 (8)
-7 a +3	3,2	0,04 ± 0,08 (99,6)	1,5 ± 0,59 (63)	1,5 ± 0,85 (62)
-1 a +3	3,2	1,0 ± 1,4 (89)	3,4 ± 0,46 (17)	2,8 ± 0,24 (28)
-7 a 0	3,2	0,9 ± 1,1 (90)	2,9 ± 0,97 (29)	2,6 ± 0,48 (33)
-1,0	3,2	20,4 ± 15,7 (-222)	4,5 ± 0,63 (-10)	4,7 ± 0,65 (-21)

Notas al pie de la tabla: 1. El valor de N fue cinco para todos los grupos tratados con vehículo y con fármaco; 2. Los datos para la carga fúngica y los niveles de GM se presentan como la media ± error estándar de la media, y el porcentaje de inhibición, con respecto al vehículo.

10

Farmacocinética in vivo

Es un procedimiento usado habitualmente para agentes terapéuticos pulmonares que se van a administrar a los pulmones de animales, por ejemplo, ratones, y plasma recolectado en diversos momentos después de la administración con el fin de caracterizar la exposición sistémica resultante al compuesto administrado.

15

El compuesto de la invención se puede ensayar en tales sistemas *in vivo* como los anteriormente mencionados.

Resumen del perfil biológico del Compuesto (I)

20

Se halló que el Compuesto (I), en forma de los cuatro estereoisómeros, es un potente inhibidor del crecimiento planctónico de *Aspergillus fumigatus* y de la infección celular epitelial bronquial. El Compuesto (**Ia**) inhibió el crecimiento de los aislados de *Aspergillus fumigatus* resistentes al posaconazol y al voriconazol, demostrando una mayor potencia que el posaconazol, el voriconazol y la anfotericina B contra estas cepas. También se halló que un amplio abanico de otros hongos patógenos eran sensibles al Compuesto (**Ia**). Se han demostrado efectos sinérgicos o al menos aditivos para el Compuesto (**Ia**) en combinación con posaconazol, itraconazol, voriconazol y caspofungina. *In vivo*, en ratones neutropénicos e inmunocomprometidos infectados con *Aspergillus fumigatus*, el Compuesto (**Ia**) demostró una potente inhibición de la infección con *Aspergillus fumigatus*, así como también la respuesta inmune pulmonar asociada en administración terapéutica o profiláctica. El Compuesto (**Ia**) también fue eficaz para reducir la pérdida de peso corporal dependiente de la infección. Estos efectos inhibidores fueron superiores a los del posaconazol. Resulta clínicamente significativo que los efectos antifúngicos beneficiosos del Compuesto (**I**) se observan en el escenario terapéutico.

30

Bibliografía

35

Agbetile, J., Fairs, A., Desai, D., Hargadon, B., Bourne, M., Mutalithas, K., Edwards, R., Morley, J.P., Monteiro, W.R., Kulkarni, N.S., Green, R.H., Pavord, I.D., Bradding, P., Brightling, C.E., Wardlaw, A.J. y Pashley, C.H. Isolation of filamentous fungi from sputum in asthma is associated with reduced post-bronchodilator FEV1. Clin. Exp. Allergy, 2012, 42, 782-91.

40

Bafadhel M., McKenna S., Aqbetile J., Fairs A., Desai D., Mistry V., Morley J.P., Pancholi M., Pavord I.D., Wardlaw A.J., Pashley C.H. y Brightling C.E. *Aspergillus fumigatus* during stable state and exacerbations of COPD. Eur. Respir. J., 2014, 43, 64-71.

- Bowyer P. y Denning D.W. Environmental fungicides and triazole resistance in *Aspergillus*. *Pest Management Science*, 2014, 70, 173-178.
- 5 Chishimba L., Niven R.M., Fom M., Cooley J. y Denning D.W. Voriconazole and Posaconazole Improve Asthma Severity in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and Severe Asthma with Fungal Sensitization. *Pharmacotherapy*, 2012, 49, 423-433.
- Chotirmall S.H., O'Donoghue E., Bennett K., Gunaratnam C., O'Neill S.J. y McElvaney N.G. Sputum *Candida albicans* presages FEV₁ decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest*, 2010, 138, 1186-95.
- CLSI M27-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Estándar aprobado, 2da edición, documento NCCLS M27-A2, Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Wayne, PA, 2002.
- 15 CLSI M38-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Estándar aprobado, 2da edición, documento CLSI M38-A2, Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Wayne, PA, 2008.
- Denning D.W., Pleuvry A. y Cole D.C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*, 2011a, 89, 864-872.
- 20 Denning D.W., Park S., Lass-Flöric C., Fraczek M.G., Kirwan M., Gore R., Smith J., Bueid A., Moore C.B., Bowyer P. y Perlin D.S. High frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin. Infect. Dis.*, 2011b, 52, 1123-1129.
- 25 Dimopoulos G., Frantzeskaki F., Poulakou G. y Armaganidis A. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2012, 1272, 31-39.
- Geist M.J.P., Egerer G., Burhenne J., Riedel K-D. y Mikus G. Induction of voriconazole metabolism by rifampin in a patient with acute myeloid leukemia: importance of interdisciplinary communication to prevent treatment errors with complex medications. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 3455-3456.
- 30 Hope W.W., Kruhlak M.J., Lyman C.A., Petraitiene R., Petraitis V., Francesconi A., Kasai M., Mickiene D., Sein T., Peter J., Kelaher A.M., Hughes J.E., Cotton M.P., Cotten C.J., Bacher J., Tripathi S., Bermudez L., Maugel T.K., Zervas P.M., Wingard J.R., Drusano G.L. y Walsh T.J. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J. Infect. Dis.*, 2007, 195(3), 455-466.
- Jeong S., Nguyen P.D. y Desta Z. Comprehensive in vitro analysis of voriconazole inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes: major effect on CYPs 2B6, 2C9, 2C19, and 3A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, 53, 541-551.
- 40 Kaur S. y Singh S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.*, 2014, 52, 2-9.
- Kimura G., Ueda K., Eto S., Watanabe Y., Masuko T., Kusama T., Barnes P.J., Ito K. y Kizawa Y. Toll-like receptor 3 stimulation causes corticosteroid-refractory airway neutrophilia and hyper-responsiveness in mice. *Chest*. 2013, 144, 99-105.
- 45 Lat A. y Thompson G.R. Update on the optimal use of voriconazole for invasive fungal infections. *Infect. Drug Resist.*, 2011, 4, 43-53.
- 50 Limper A.H., Knox K.S., Sarosi G.A., Ampel N.M., Bennett J.E., Catanzaro A., Davies S.F., Dismukes W.E., Hage C.A., Marr K.A., Mody C.H., Perfect J.R. y Stevens D.A. An Official American Thoracic Society Statement: Treatment of Fungal Infections in Adult Pulmonary and Critical Care Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, 183, 96-128.
- Levin M-D., den Hollander J.G., van der Holt B., Rijnders B.J., van Vliet M., Sonneveld P. y van Schaik R.H. Hepatotoxicity of oral and intravenous voriconazole in relation to cytochrome P450 polymorphisms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, 60, 1104-1107.
- 55 Lin S-J, Scranz J and Teutsch S.M. *Aspergillus* case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 32, 358-366.
- 60 Monteiro M.C., de la Cruz M, Cantizani J., Moreno C., Tormo J.R., Mellado E, De Lucas J.R., Asensio F., Valiente V., Brakhage A.A., Latgé JP, Genilloud O., Vicente F. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of

microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *J. Biomol. Screen.* 2012, 17, 542-549.

Pasqualotto A.C., Powell G., Niven R. y Denning D.W. The effects of antifungal therapy on severe asthma with fungal sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respirology*, 2009, 14, 1121-127.

5

Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr., Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.*, 2008, 3, 1494-500.

10 Rankin, N. Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with granulocytosis and antibiotic therapy. *Br. Med. J.*, 1953, 183, 918-9.

Rodriguez-Tudela J.L., Arendrup M.C., Arkan S., Barchiesi F., Bille J., Chyssanthou E., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Denning D.W., Donnelly J.P., Fegeler W., Lass-Flörl C., Moore C., Richardson M., Gaustad P., Schmalreck A.,

15 Velegaki A. y Verweij P. Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad Antifúngica (AFST) del Comité Europeo de la ESCMID para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobianos (EUCAST). DOCUMENTO DEFINITIVO DE EUCAST E.DEF. 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. E. DEF 9.1 2008, 1-13.

20 Salmeron G., Porcher R., Bergeron A., Robin M., Peffault de Latour R., Ferry C., Rocha V., Petropoulou A., Xhaard A., Lacroix C., Sulahian A., Socié G., y Ribaud P. Persistent poor long-term prognosis of allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients surviving invasive aspergillosis. *Haematologica*, 2012, 97, 1357-1363.

Shaus S.E., Larrow J.F. and Jacobsen E.N. Practical Synthesis of Enantiopure Cyclic 1,2-Amino Alcohols via Catalytic

25 Asymmetric Ring Opening of Meso Epoxides. *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 4197-4199.

Thompson G.R. y Patterson T.F. Pulmonary aspergillosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008, 29, 103-110.

30 Wexler D., Courtney R., Richards W., Banfield C., Lim J. y Laughlin M. Effect of posaconazole on cytochrome P450 enzymes: a randomized, open-label two-way crossover study. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, 21, 65-653.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pulmocide Limited

5 <120> COMPUESTOS

<130> PUL-P1873PCT

<140> EP15168637.5

10 <141> 2015-05-21

<160> 3

15 <170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Primer cebador

25 <400> 1

ggcccttaa tagcccggt 19

<210> 2

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Segundo cebador

<400> 2

tgagccgata gtcccctaa 20

40 <210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

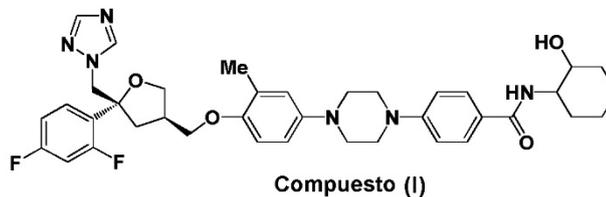
<223> Sonda de hibridación de la región de ADN

<400> 3

50 agccagcggc ccgcaaatg 19

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I):



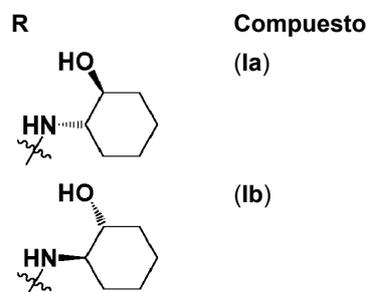
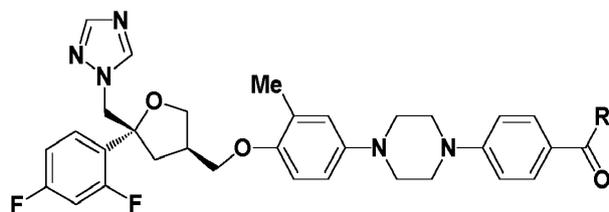
5

que es:

4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-N-(2-hidroxiciclohexil)benzamida; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

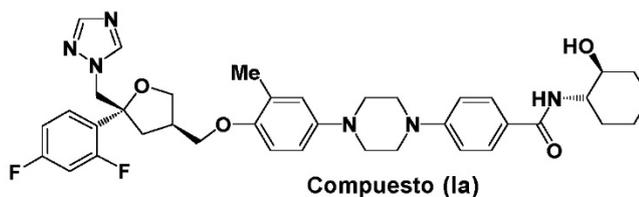
2. Un compuesto según la reivindicación 1 en forma de un estereoisómero seleccionado entre los Compuestos (Ia) y (Ib):



o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mismos.

15

3. Un compuesto según la reivindicación 2 que es Compuesto (Ia):



20 que es:

4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofurano-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazina-1-il)-N-((1S,2S)-2-hidroxiciclohexil)benzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25

4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 proporcionado como un estereoisómero singular.

5.

Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como un producto farmacéutico.

30

6. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de micosis o para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a micosis.

7.

Un compuesto para su uso según la reivindicación 6, donde la micosis está causada por *Aspergillus spp.*, tal como *Aspergillus fumigatus* o *Aspergillus flavus*, especialmente *Aspergillus fumigatus*.

35

8. Un compuesto para su uso según la reivindicación 6, donde la micosis está causada por *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Cladosporium herbarum*, *Trichophyton rubrum* o *Candida* spp., por ejemplo, *Candida albicans*, *Candida glabrata* o *Candida krusei*.

5

9. Un compuesto para su uso según la reivindicación 6, donde la micosis es una micosis resistente al azol.

10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como un producto farmacéutico en combinación con un segundo principio activo o más.

10

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

12.
15 más.

Una composición farmacéutica según la alegación 11 que comprende un segundo ingrediente activo o

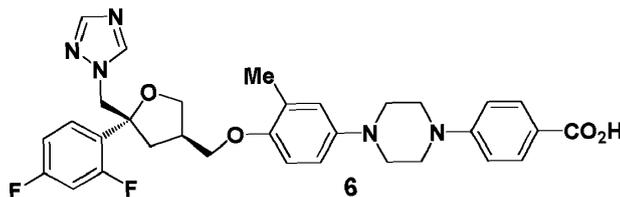
13. Un compuesto para su uso según la reivindicación 10 o una composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde el segundo ingrediente activo o más se selecciona de entre agentes antifúngicos, incluidos los agentes antifúngicos azólicos (tales como voriconazol, posaconazol, itraconazol o isavuconazol), anfotericina B, una equinocandina (tal como caspofungina) y un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (tal como lovastatina, pravastatina o fluvastatina).

20

14. Un compuesto para su uso según la reivindicación 10 o una composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde el segundo ingrediente activo o más se selecciona de voriconazol, posaconazol, itraconazol y caspofungina.

25

15. Un procedimiento para preparar el compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéutica aceptable del mismo, que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (6):



30

o una sal del mismo;
con 2-aminociclohexanol, o una sal hidroclicórica del mismo.

Figura 1

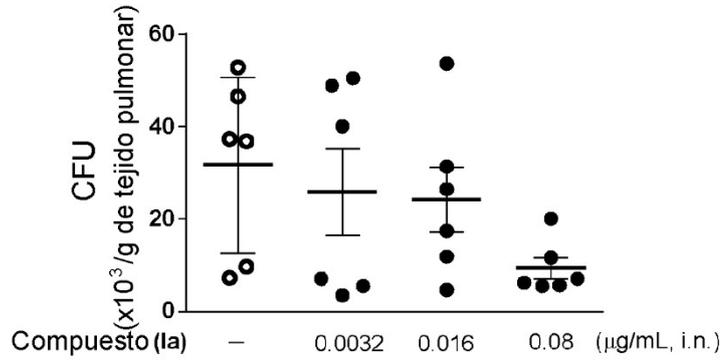


Figura 2

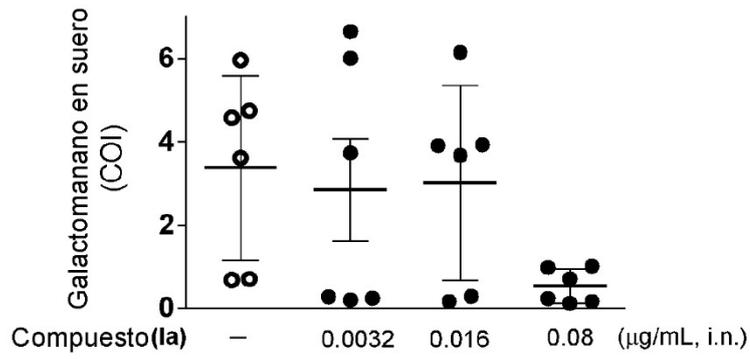


Figura 3

