



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0814613-6 B1



(22) Data do Depósito: 30/06/2008

(45) Data de Concessão: 26/12/2018

(54) Título: COMPOSTO DERIVADO DE NISTATINA, SUA COMPOSIÇÃO E SEUS USOS

(51) Int.Cl.: C07H 17/08; A61K 31/7034; A61P 31/04.

(30) Prioridade Unionista: 03/07/2007 GB 0712881.2.

(73) Titular(es): BIOSERGEN AS.

(72) Inventor(es): SERGEY BORISOVICH ZOTCHEV; SVEN EVEN BORGOS; TRYGVE BRAUTASET; TRON ERLING ELLINGSEN; EVGENIA NIKOLAEVNA OLSUFYEVA; MARIA NIKOLAEVNA PREOBRAZHenskAYA; HAVARD SLETTA.

(86) Pedido PCT: PCT GB2008002238 de 30/06/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/004322 de 08/01/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/01/2010

(57) Resumo: "COMPOSTOS". A presente invenção refere-se a um composto o qual é um derivado de nistatina tendo uma ligação dupla adicional presente entre C28 e 5 C29 e o qual é ainda modificado com relação à nistatina em uma ou mais das posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no grupo amino da micosamina.

Esforços de pesquisa sobre antibióticos de poliketídeo de macrolídeo têm, portanto, se focalizado sobre a anfotericina e, em particular, sobre a identificação de novos análogos de anfotericina com menor toxicidade. Duas abordagens distintas têm sido geralmente adotadas. Em uma primeira
5 abordagem, os pesquisadores têm usado modificações químicas para tentar reduzir a toxicidade e/ou aprimorar a atividade antifúngica da anfotericina. Uma vez que a síntese total da anfotericina não é economicamente viável, contudo, o material de iniciação é usualmente anfotericina B obtida de culturas de *Streptomyces nodosus*. Como um resultado, modificações químicas
10 têm se concentrado sobre a derivatização dos grupos funcionais presentes sobre o anel de anfotericina B.

Muito mais recentemente, os pesquisadores têm adotado uma abordagem diferente que objetiva a via biossintética da anfotericina, a qual é compreendida de uma linha de montagem de diferentes enzimas. A cadeia
15 de carbono da anfotericina é montada a partir de unidades de acetato e propionato através de sintases de poliketídeo modulares (tipo 1) e o macrolídeo resultante é subsequentemente modificado por outras enzimas as quais causam oxidação, glicosilação e hidroxilação. Os genes que codificam as enzimas envolvidas nessa biossíntese foram identificados e, assim, os pes-
20 quisadores foram capazes de introduzir alterações na via de biossintética, por exemplo, através de remoção, adição ou modificação de um gene e, desse modo, removendo, adicionando ou modificando uma enzima envolvida na síntese. O resultado líquido é moléculas de anfotericina modificadas.

Um grande número de moléculas de anfotericina modificadas, portanto, foi feito e testado, especialmente derivados quimicamente modifi-
25 cados. Apesar desses esforços contudo, poucos candidatos a fármaco promissores foram identificados tendo um equilíbrio apropriado de propriedades farmacológicas, isto é, alta atividade antifúngica, baixa toxicidade e solubilidade em água. Consequentemente, ainda permanece uma necessi-
30 dade por novos antibióticos para tratar doenças infecciosas e, em particular, infecções fúngicas sistêmicas agudas, as quais estão aumentando de incidência. Esse requisito vem se tornando progressivamente urgente à medida

que resistência aos agentes antifúngicos existentes se desenvolve.

Comparado com a anfotericina, muito pouca pesquisa tem sido realizada sobre a modificação de nistatina presumivelmente porque ela tem menor atividade do que a anfotericina, ainda que sofra das mesmas desvantagens de toxicidade de insolubilidade em água. Como um resultado, ela não tem sido considerada uma molécula inicial atraente para tal trabalho.

Em um estudo recente (Organic Letters, 2006, 8 (9), 1807-1809), dois derivados de nistatina foram preparados através de alquilação redutiva do grupo amina de micosamina. Descobriu-se que os derivados resultantes têm maior atividade antifúngica do que a nistatina, mas eram menos ativos do que derivados de anfotericina B preparados da mesma forma. A modificação de anfotericina B, portanto, foi considerada mais promissora e a toxicidade desses derivados testados foi mostrada como sendo consideravelmente menor comparado com a molécula precursora.

No WO01/59126, a clonagem e sequenciamento do agrupamento gênico que codifica a sintase de policetídeo e outras enzimas responsáveis pela síntese de nistatina são descritos. O WO01/59126 também sugere uma plethora de manipulações potenciais que poderiam, em tese, ser realizadas sobre o agrupamento gênico para proporcionar estruturas de nistatina modificadas. Essas incluem modificações para remover ou adicionar ligações duplas a partir do fragmento de polieno da nistatina, modificações para remover ou reposicionar o grupo C16 carboxila, modificações para adicionar outros grupos hidroxila e modificações para truncar o anel de macrolactona.

Será imediatamente evidente a partir do precedente que um grande número (aproximadamente 10^{17}) de diferentes estruturas de nistatina modificadas poderia ser preparado realizando uma ou mais das modificações sugeridas no WO01/59126. A possibilidade de, então, modificação adicional de qualquer um dos compostos produzidos através de manipulação genética com outras modificações químicas significa quintilhões de compostos que são teoricamente possíveis. Uma vez que pouco trabalho foi realizado sobre a nistatina, contudo, nenhum dado está disponível para sugerir qual desses vastos números de compostos poderia exibir menor toxicidade com-

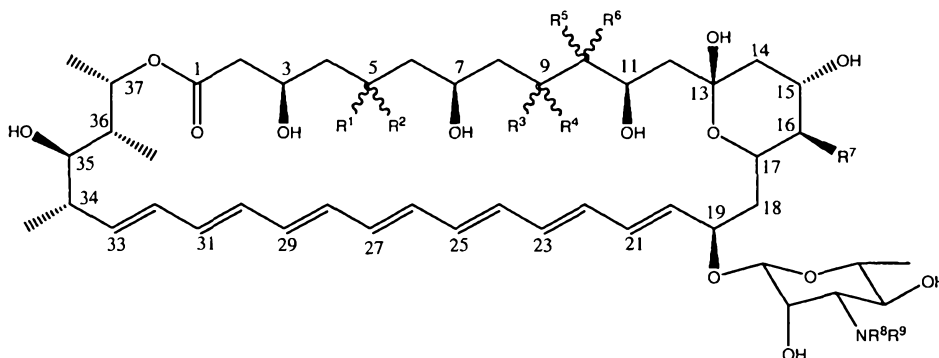
parado com a nistatina e/ou anfotericina (isto é, aqueles agentes ativos atualmente usados).

5

15

20

Compostos preferidos da invenção são compostos de fórmula I,



(1)

25

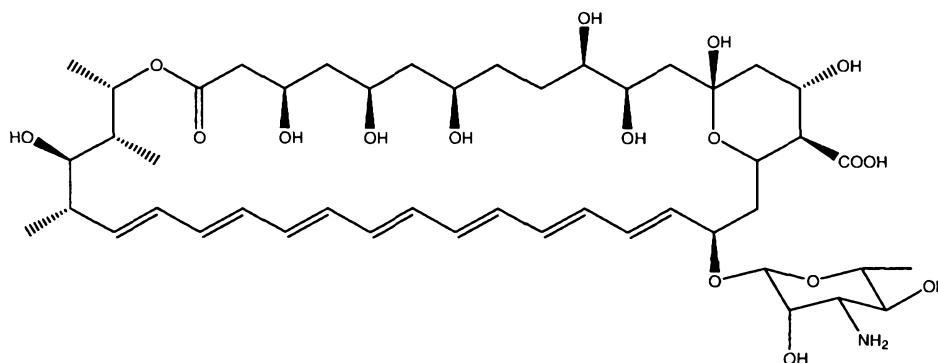
R^1 e R^2 representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila, um grupo alcóxi, um grupo acilóxi ou um grupo alquila ou juntos formam um grupo carbonila (por exemplo, R^1 e R^2 representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila ou juntos formam um grupo carbonila;

R^3 e R^4 representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila, um grupo alcóxi, um grupo acilóxi ou um grupo alquila ou juntos formam um grupo carbonila (por exemplo, R^3 e R^4 representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila ou juntos formam um grupo carbonila;

R^5 e R^6 representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila, um grupo alcóxi, um grupo acilóxi ou um grupo alquila (por exemplo, um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila);

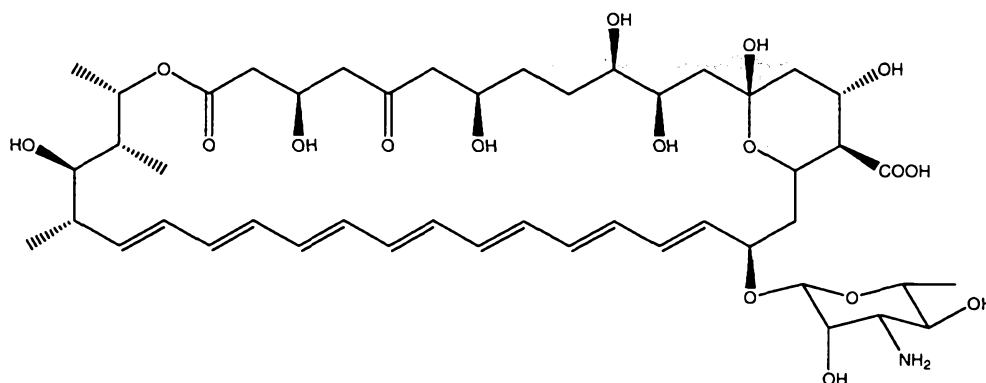
R^7 representa um átomo de hidrogênio, COOH , um grupo alquila, um grupo alcóxi, um grupo éster de ácido carboxílico ou um grupo amida (por exemplo, COOH , um grupo alquila, um grupo éster de ácido carboxílico ou um grupo amida);

R^8 e R^9 representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio, um grupo alquilamino, um grupo açúcar ou um grupo acila; ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, contanto que o composto não seja o composto (II)

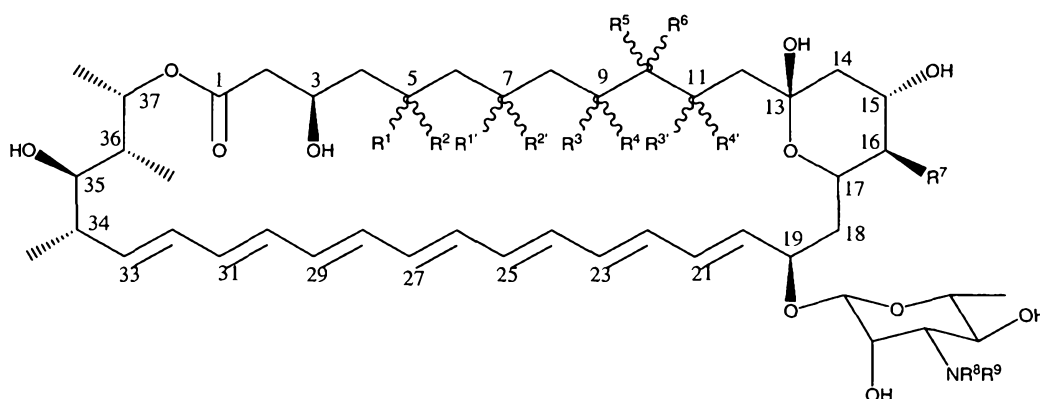


(II)

ou o composto micoheptina (representado abaixo)



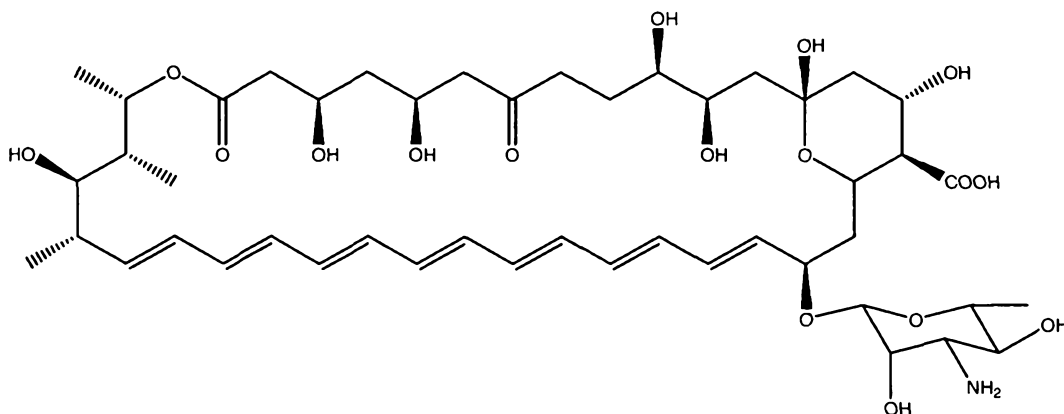
Um outro composto preferido da invenção, também sujeito às exceções acima, é de fórmula (I), mas em que o grupo -OH no carbono 7 e/ou no carbono 11 é convertido, por exemplo, a um grupo oxo. Esse é de fórmula (I'), isto é:



5

(I')

onde todos os substituintes são conforme definidos para a fórmula (I) e R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são, cada um independentemente, conforme definidos para R^1 - R^4 , respectivamente, e com a exceção adicional de que o composto de fórmula (I') não seja candidina (representado abaixo)



Encarada a partir de um outro aspecto, a invenção proporciona um processo para fabricação de compostos conforme aqui antes descrito compreendendo:

- 5 (i) modificação de um agrupamento gênico que codifica o sistema de sintase de policetídeo responsável pela síntese de nistatina para produzir um derivado de nistatina tendo uma ligação dupla entre C28 e C29; e
- (ii) modificação adicional do referido agrupamento gênico para produzir um derivado de nistatina o qual é ainda modificado em uma ou mais das posições C5, C9, C10, C16 ou no grupo amino da micosamina, ou
- 10 (iii) modificação do derivado resultante em uma ou mais das posições C5, C9, C10, C16 ou no grupo amino da micosamina através de uma reação química.

Encarada a partir de um outro aspecto, a invenção proporciona um processo para fabricação de compostos conforme aqui antes descrito

15 compreendendo:

- (i) modificação de um agrupamento gênico que codifica o sistema de sintase de policetídeo responsável pela síntese de nistatina para produzir um derivado de nistatina tendo uma ligação dupla entre C28 e C29; e
- (ii) modificação adicional do referido agrupamento gênico para
- 20 produzir um derivado de nistatina o qual é ainda modificado em uma ou mais das posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no grupo amino da micosamina, OU
- (iii) modificação do derivado resultante em uma ou mais das posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no grupo amino da micosamina através de uma reação química.
- 25

Encarada a partir de um outro aspecto, a invenção proporciona uma composição compreendendo um composto conforme aqui antes descrito e um veículo, diluente ou excipiente. Composições preferidas são composições farmacêuticas.

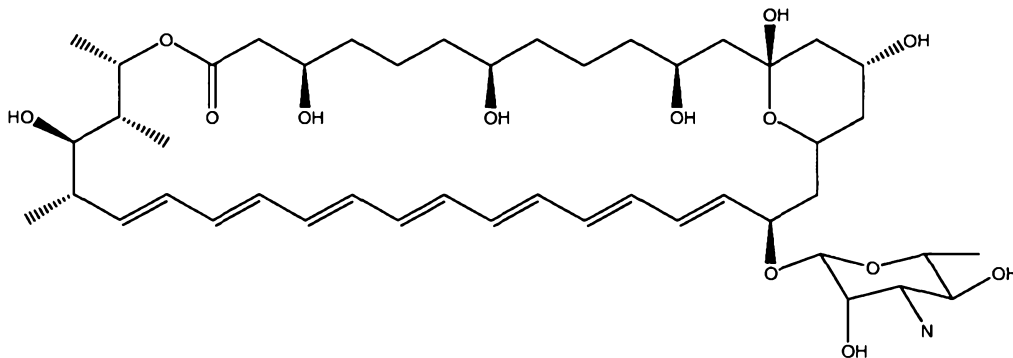
30 Encarada a partir de ainda um outro aspecto, a invenção proporciona um composto conforme aqui antes descrito para uso em terapia.

Uso de um composto conforme aqui antes descrito para a fabri-

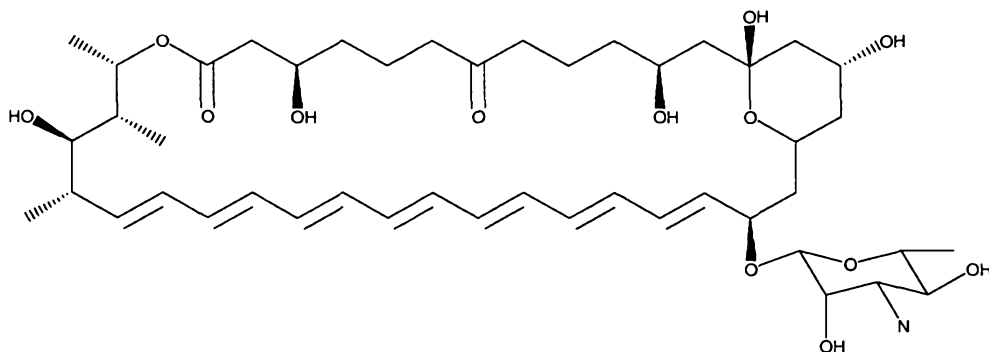
cação de uma composição para o tratamento de uma infecção fúngica forma um outro aspecto da invenção.

Um método de tratamento de uma infecção fúngica em um animal (por exemplo, um ser humano) compreendendo administração, ao referido animal, de um composto conforme aqui antes descrito forma ainda um outro aspecto.

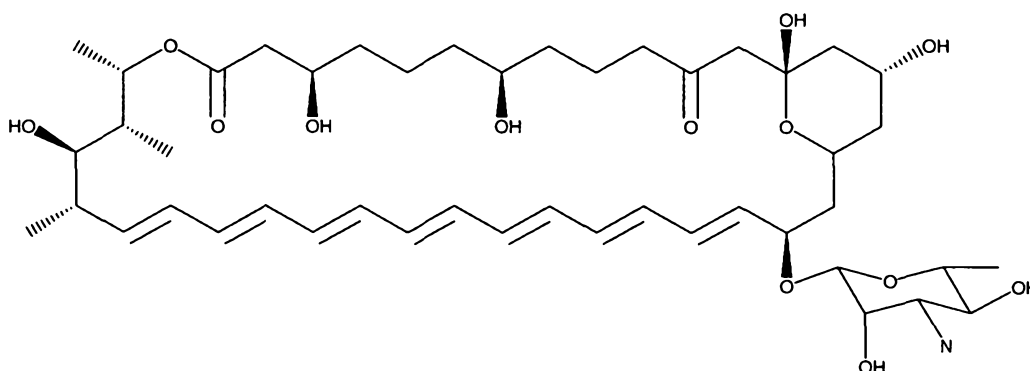
Conforme usado aqui, o termo "derivado de nistatina" destina-se a abranger compostos que têm uma estrutura idêntica à nistatina A₁, outra que não as modificações especificadas. Assim, derivados preferidos têm o mesmo anel de macrolactona que a nistatina, com a exceção da ligação dupla adicional em C28-C29 e têm os mesmos grupos funcionais que a nistatina, com a exceção de uma modificação em uma ou mais das posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no grupo amino da micosamina. Derivados preferidos, portanto, compreendem o esqueleto de anel de macrolactona mostrado abaixo:



ou



ou



Será apreciado que, nessas fórmulas, podem haver modificações em C5, C9, C10, C16 e sobre o N da micosamina. O que é mostrado, portanto, são apenas os átomos os quais devem estar presentes. Essas figuras mostram o esqueleto químico o qual pode estar presente.

Conforme usado aqui, o termo "sistema de sintase de policetídeo" denota a coleção de enzimas que são responsáveis pela síntese de policetídeo e modificações. Isso inclui sintases, mono-oxigenases, glicosil transferase e aminotransferase de policetídeo.

O termo "grupo alquila" é usado aqui para representar um grupo hidrocarboneto cíclico ou acíclico, de cadeia reta ou ramificada, saturado. Tais grupos podem conter até 20 átomos de carbono, mas grupos contendo 1 a 12 átomos de carbono, mais preferivelmente 1 a 6 átomos de carbono são preferidos.

Grupos alquila podem ser não-substituídos ou substituídos. Substituintes os quais podem estar presentes em grupos alquila substituídos incluem hidróxi, alcóxi, acilóxi e amino.

Grupos alquila podem também ser interrompidos por um ou mais grupos, por exemplo, -arila- (tal como Ph), -O-, -NR¹²- ou -S-, em que R¹² representa um átomo de hidrogênio ou um grupo C₁₋₆ alquila.

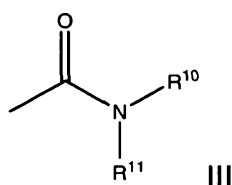
O termo "alcóxi" é usado aqui para representar um grupo -OR¹³, em que R¹³ é um grupo alquila conforme aqui antes definido. Em grupos alcóxi preferidos R¹³ contém 1 a 6 átomos de carbono, mais preferivelmente 1 a 4 átomos de carbono. Um grupo alcóxi preferido é -OC¹⁻⁶, por exemplo, -OCH₃.

O termos "acilóxi" é usado aqui para representar um grupo

$-\text{OCOR}^{14}$, em que R^{14} é um grupo alquila conforme definido aqui antes. Em grupos acilóxi preferidos, R^{14} contém 1 a 6 átomos de carbono, mais preferivelmente 1 a 4 átomos de carbono. Um grupo acilóxi preferido é $-\text{OCOC}_{1-6}$, por exemplo, $-\text{OCOCH}_3$.

5 O termo "grupo éster de ácido carboxílico" é usado aqui para representar um grupo $-\text{COOR}^{15}$, em que R^{15} é um grupo alquila conforme definido aqui antes. Em grupos éster de ácido carboxílico preferidos, R^{15} contém 1 a 6 átomos de carbono, mais preferivelmente 1 a 4 átomos de carbono. Um grupo éster de ácido carboxílico preferido é $-\text{COOC}_{1-6}$, por exemplo, $-\text{COOCH}_3$.

O termo "grupo amida" é usado aqui para representar um grupo de fórmula III:



em que R^{10} e R^{11} representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila opcionalmente substituído, conforme definido aqui antes, ou juntos formam um anel de alquila, conforme aqui antes definido.

O termo "grupo alquilamino" é usado aqui para representar um grupo $-(\text{CH}_2)_x\text{NR}^{16}\text{R}^{17}$, em que x é 1 a 10, de preferência 2 a 6 (por exemplo, 3) e R^{16} e R^{17} representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio ou um grupo C_{1-6} alquila.

O termo "açúcar" é usado aqui para representar sacarídeos, especialmente oligo- e monossacarídeos. O açúcar presente nos compostos da invenção pode compreender qualquer número de unidades de sacarídeo, mas compostos preferidos compreendem 1 a 10 unidades de sacarídeo, por exemplo, 1 ou 2 unidades de sacarídeo.

O termo "acila" é usado aqui para representar um grupo $-\text{COR}^{18}$, em que R^{18} é um grupo alquila conforme aqui antes definido. Em grupos acila preferidos, R^{18} é um grupo alquila substituído, por exemplo, um grupo al-

quila substituído por amino. Grupos acila particularmente preferidos são grupos amino acila.

Conforme aqui antes descrito, os compostos da presente invenção são derivados de nistatina tendo uma ligação dupla adicional presente entre C28 e C29 e os quais são ainda modificados, com relação à nistatina, em uma ou mais das posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no grupo amino da micosamina.

Compostos preferidos da presente invenção são modificados em C5 com relação à nistatina. Na nistatina, C5 é substituído por um grupo hidroxila e um átomo de hidrogênio e é um estereocentro R. Assim, em compostos preferidos da invenção, C5 é substituído por outros grupos que não um grupo hidroxila e um átomo de hidrogênio e/ou C5 é um estereocentro S. Em compostos preferidos, diferentes grupos estão presentes em C5, por exemplo, C5 pode ser substituído por dois grupos hidroxila ou por dois átomos de hidrogênio. Em compostos particularmente preferidos, C5 é substituído por um grupo carbonila.

Outros compostos preferidos da invenção são modificados em C16 com relação à nistatina. Na nistatina, C16 é substituído por um ácido carboxílico e um átomo de hidrogênio e é um estereocentro R. Consequentemente, em compostos preferidos da invenção, C16 é substituído por outros grupos que não um grupo ácido carboxílico e um átomo de hidrogênio e/ou C16 é um estereocentro S. Em compostos preferidos, diferentes grupos estão presentes, por exemplo, um grupo alquila (por exemplo, metila) e um átomo de hidrogênio ou um grupo amida e um átomo de hidrogênio. Em compostos particularmente preferidos, C16 é substituído por um grupo metila e um átomo de hidrogênio. Em compostos preferidos, R16 é um estereocentro R.

Outros compostos preferidos da invenção são modificados em C9 com relação à nistatina. Na nistatina, C9 é substituído por dois átomos de hidrogênio. Consequentemente, em compostos preferidos da invenção, C9 é substituído por outros grupos que não dois átomos de hidrogênio. Em compostos preferidos, diferentes grupos estão presentes, por exemplo, um grupo hidroxila e um átomo de hidrogênio ou um grupo carbonila.

Outros compostos preferidos da invenção podem ser modificados em C7 com relação à nistatina. Na nistatina, C7 é substituído por hidroxila. Consequentemente, em alguns compostos da invenção, C7 é substituído por outros grupos que não hidroxila. Em compostos preferidos, um grupo carbonila está presente. Onde uma carbonila está presente, será também necessário uma outra modificação do composto em C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no N da micosamina com relação à nistatina estando presente para excluir o composto candidina representado acima.

Outros compostos preferidos da invenção podem ser modificados em C11 com relação à nistatina. Na nistatina, C11 é substituído por hidroxila. Consequentemente, em algumas modalidades da invenção, C11 é substituído por outros grupos que não hidroxila. Em compostos preferidos, um grupo carbonila está presente.

Ainda outros compostos preferidos da invenção são modificados em C10 com relação à nistatina. Na nistatina, C10 é substituído por um grupo hidroxila e um átomo de hidrogênio e é um estereocentro R. Consequentemente, em compostos preferidos da invenção, C10 é substituído por outros grupos que não um grupo hidroxila e um átomo de hidrogênio e/ou C10 é um estereocentro S. Em compostos preferidos, diferentes grupos estão presentes, por exemplo, dois átomos de hidrogênio ou um grupo carbonila. Em compostos particularmente preferidos, C10 é substituído por dois átomos de hidrogênio.

Ainda outros compostos preferidos da invenção são modificados no grupo amino da micosamina com relação à nistatina. Na nistatina, o grupo amino da micosamina é não-substituído, isto é, ele é -NH_2 . Consequentemente, em compostos preferidos da invenção, o grupo amino da micosamina é substituído, por exemplo, por um ou mais grupos alquilamino ou açúcar.

Onde compostos da invenção têm uma carbonila em C5 ou C7, é especialmente preferido se outras modificações do composto em C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no N da micosamina com relação à nistatina também estão presentes. Por exemplo, a amina da micosamina poderia ser funciona-

lizada para trazer pelo menos um substituinte R^8/R^9 o qual é outro que não hidrogênio.

Embora os compostos da invenção possam conter apenas uma alteração com relação a materiais conhecidos, tal como S44HP, idealmente, em qualquer composto da invenção, ele compreenderá duas alterações em C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no N da micosamina com relação à nistatina. Compostos preferidos podem compreender três alterações em C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou do N da micosamina com relação à nistatina. Compostos preferidos podem compreender alterações em C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou do N da micosamina com relação ao S44HP. Outros compostos preferidos compreenderão pelo menos duas alterações em C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no N da micosamina com relação à micoheptina. Outros compostos preferidos compreenderão pelo menos duas alterações em C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no N da micosamina com relação à nistatina, S44HP, microheptina e candidina.

Compostos particularmente preferidos da invenção são aqueles de fórmula (I) ou (I') conforme apresentado acima.

Em compostos preferidos de fórmula (I), R^1 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila, um grupo alcóxi, um grupo acilóxi ou um grupo alquila. Ainda mais preferivelmente, R^1 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi (por exemplo, um grupo $-OC_{1-6}$), especialmente um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila (por exemplo, um grupo hidroxila). Em compostos preferidos, R^2 é um átomo de hidrogênio. Em compostos preferidos alternativos, R^1 e R^2 juntos formam um grupo carbonila. Quando C5 é um estereocentro, ele é, de preferência, um centro R.

Compostos preferidos de fórmula (I) são também aqueles em que R^3 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila, um grupo alcóxi, um grupo acilóxi ou um grupo alquila. Ainda mais preferivelmente, R^3 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi (por exemplo, um grupo $-OC_{1-6}$), especialmente um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila (por exemplo, um átomo de hidrogênio). Em compostos

preferidos, R^4 é um átomo de hidrogênio. Em compostos alternativos preferidos, R^3 e R^4 juntos formam um grupo carbonila. Quando C9 é um estereocentro, ele é, de preferência, um centro R.

Outros compostos preferidos de fórmula (I) são aqueles em que

5 R^5 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila, um grupo alcóxi, um grupo acilóxi ou um grupo alquila. Ainda mais preferivelmente, R^5 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxila ou um grupo alcóxi (por exemplo, um grupo $-OC_{1-6}$), especialmente um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila (por exemplo, um grupo hidroxila). Em compostos preferidos

10 R^6 é um átomo de hidrogênio. Quando C10 é um estereocentro, ele é, de preferência, um centro R.

Ainda outros compostos preferidos de fórmula (I) são aqueles em que R^7 representa $COOH$, um grupo alquila, um grupo éster de ácido carboxílico ou um grupo amida. Um grupo éster de ácido carboxílico preferido é $-COOC_{1-6}$, mais preferivelmente $-COOC_{1-4}$, por exemplo, $-COOCH_3$.

15

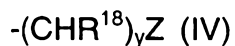
Compostos particularmente preferidos de fórmula (I) são aqueles em que R^7 é um grupo alquila ou um grupo amida. Grupos alquila preferidos são C_{1-6} alquila, por exemplo, metila, etila, propila ou butila, especialmente metila.

20 Amidas preferidas são aquelas de fórmula II conforme aqui antes definido. Amidas particularmente preferidas são aquelas em que R^{10} e R^{11} representam, cada um independentemente, um átomo de hidrogênio ou um grupo C_{1-10} alquila ramificado ou C_{1-10} alquila não-ramificado opcionalmente substituído por grupos hidroxila, éster de ácido carboxílico ou amino e opcionalmente interrompidos por átomos de nitrogênio ou oxigênio ou R^{10} e R^{11}

25 juntos formam um grupo C_{1-8} alquila cíclico opcionalmente substituído por grupos hidróxi, acilóxi ou amino e opcionalmente interrompidos por átomos de oxigênio ou nitrogênio.

Em algumas amidas preferidas, R^{10} é hidrogênio. Em outras amidas preferidas, R^{11} é um grupo de fórmula IV:

30



em que:

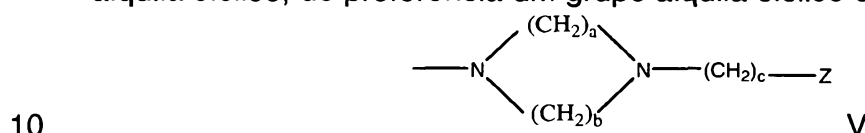
R^{18} é hidrogênio ou um grupo alquila contendo até 6 átomos de carbono (por exemplo, metila ou $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

y é 1 a 6, de preferência 2-4, por exemplo, 3; e

5 Z é OH , $\text{NR}^{19}\text{R}^{20}$ ou COOR^{21} em que R^{18} , R^{19} e R^{21} são, cada um independentemente, hidrogênio ou uma C_{1-6} alquila (por exemplo, metila).

Em amidas especialmente preferidas, R^{18} é hidrogênio.

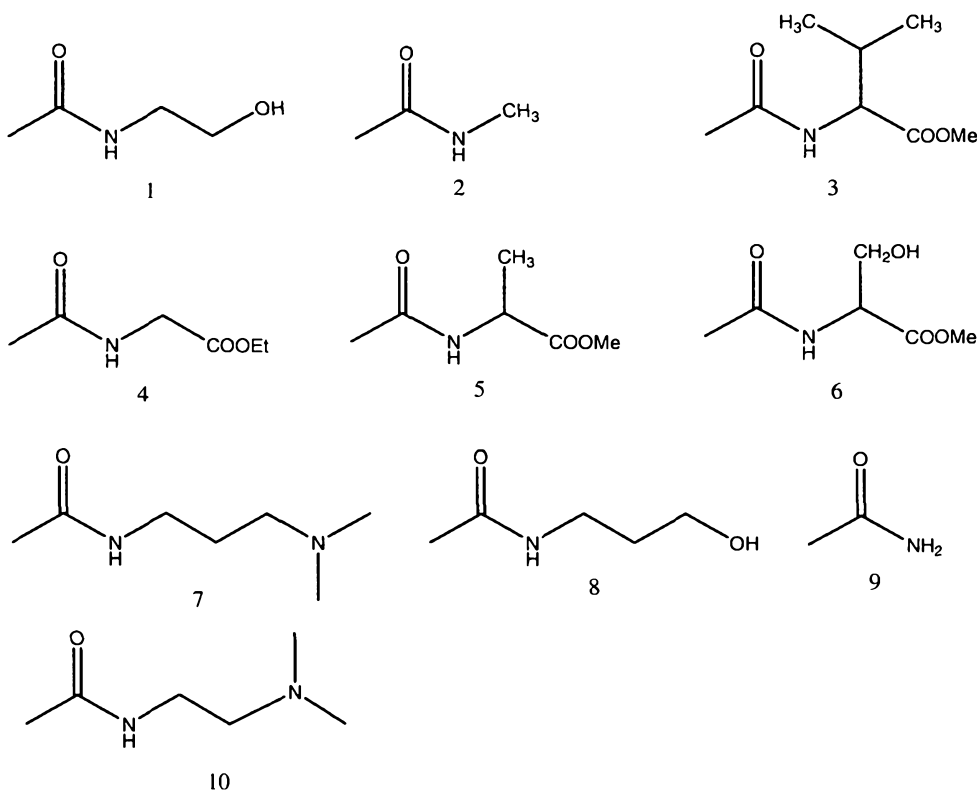
Em outras amidas preferidas, R^{10} e R^{11} juntos formam um grupo alquila cíclico, de preferência um grupo alquila cíclico de fórmula V:

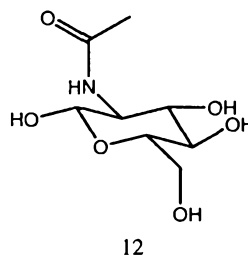
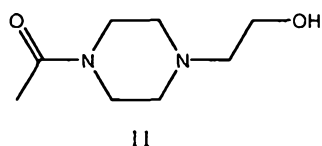


em que a, b e c representam, cada um independentemente, 1 a 6, de preferência 2-4, por exemplo, 2; e

Z é conforme aqui antes definido em relação à fórmula IV.

15 Exemplos representativos de grupos amida particularmente preferidos de fórmula III são aqueles mostrados abaixo:





Grupos amida 4, 6, 7, 8 e 10 são especialmente preferidos, especialmente os grupos amida 7 e 10.

Outros compostos preferidos de fórmula (I) são aqueles em que R^8 representa um átomo de hidrogênio, um grupo alquilamino, um grupo açúcar ou um grupo acila. Em compostos preferidos R^9 é idêntico a R^8 ou é um átomo de hidrogênio, por exemplo, R^9 é um átomo de hidrogênio.

Grupos alquilamino preferidos são aqueles da fórmula $-(CH_2)_x NH_2$ em que x é 2 a 6 (por exemplo, 3) ou análogos alquilados dos mesmos $-(CH_2)_x NC_{1-6} alquila_2$, por exemplo, $-(CH_2)_x NMe_2$. Outro grupo preferido é um resíduo de lisina $COCH[(CH_2)_4 NH_2]NH_2$.

Grupos açúcar preferidos compreendem 1 a 5 unidades de sacarídeo, mais preferivelmente 2 ou 3 unidades de sacarídeo.

Onde o grupo açúcar é um grupo monossacarídeo, ele pode ser representado como um confômero linear, cíclico ou uma mistura de confômeros lineares e cíclicos. Quando o grupo açúcar compreende mais de uma unidade de sacarídeo, cada monossacarídeo pode ser um confômero cíclico, linear ou uma mistura de confômeros lineares e cíclicos. Além disso, as unidades de sacarídeo podem ser as mesmas ou diferentes.

Em compostos de fórmula (I), monossacarídeos preferidos são pentoses e hexoses, por exemplo, glicose, galactose, glicopiranose, manopiranose, galactopiranose, frutopiranose e tagotopiranose. Di- e oligossacarídeos preferidos incluem lactose, melibiose, sacarose, maltose e celobiose. D-glicose, D-galactose e lactose são especialmente preferidos.

Outros grupos acila preferidos (para R^8) incluem $-(CH_2)Ph$ $(CH_2)_x NH_2$ ou $-(CH_2)Ph(CH_2)_x NMe_2$, onde x é 0/1.

Compostos particularmente preferidos da invenção são aqueles de fórmula I em que R^1 e R^2 juntos formam um grupo carbonila. Mais preferi-

velmente, quando R^1 e R^2 formam um grupo carbonila, R^3 , R^4 e R^6 são átomos de hidrogênio e R^5 é um grupo hidroxila. Em tais compostos, de preferência, pelo menos um de R^8 e R^9 (por exemplo, R^8 e R^9) são átomos de hidrogênio. Especialmente de preferência, C10 é um estereocentro R.

5 Outros compostos particularmente preferidos da invenção são aqueles de fórmula I em que R^7 é C_{1-6} alquila (por exemplo, metila). Mais preferivelmente, quando R^7 é C_{1-6} alquila (por exemplo, metila), pelo menos um de R^8 e R^9 (por exemplo, R^8 e R^9) são átomos de hidrogênio. Em tais compostos, R^5 é, de preferência, um grupo hidroxila e R^6 um átomo de hidrogênio. Ainda mais preferivelmente, R^3 e R^4 são átomos de hidrogênio. Especialmente de preferência, C10 é um estereocentro R.

Ainda outros compostos preferidos da invenção são aqueles de fórmula I em que R^7 é um grupo amida, de preferência um grupo amida de fórmula III conforme aqui antes definido. Mais preferivelmente, quando R^7 é um grupo amida, pelo menos um de R^8 e R^9 (por exemplo, R^8 e R^9) são átomos de hidrogênio. Em tais compostos, R^5 é, de preferência, um grupo hidroxila e R^6 um átomo de hidrogênio. Ainda mais preferivelmente, R^3 e R^4 são átomos de hidrogênio. Especialmente de preferência, C10 é um estereocentro R.

20 Ainda outros compostos preferidos da invenção são aqueles de fórmula I em que R^8 é um grupo açúcar ou um grupo alquilamino conforme aqui antes definido. Mais preferivelmente, quando R^8 é um grupo açúcar ou um grupo alquilamino, R^9 é um átomo de hidrogênio. Em tais compostos, R^7 é de preferência COOH. Ainda mais preferivelmente, R^5 é um grupo hidroxila e R^6 é um átomo de hidrogênio e/ou R^3 e R^4 são átomos de hidrogênio. Especialmente de preferência, C10 é um estereocentro R.

30 Para compostos de fórmula (I'), opções preferidas são aquelas apresentadas acima com relação à fórmula (I). Além disso, em compostos preferidos de fórmula (I'), $R^{1'}$ representa uma hidroxila e $R^{2'}$ é um átomo de hidrogênio ou $R^{1'}$ e $R^{2'}$ juntos formam um grupo carbonila. Quando C7 é um estereocentro, ele é, de preferência, um centro R.

Compostos preferidos de fórmula (I') são também aqueles em

que R^{3'} representa um grupo hidroxila e R^{4'} um átomo de hidrogênio ou R^{3'} e R^{4'} representam um grupo carbonila. Quando C11 é um estereocentro, ele é, de preferência, um centro R.

De preferência, apenas um de R^{1'}/R^{2'} juntos ou R^{3'}/R^{4'} juntos representam carbonila.

Exemplos representativos de compostos preferidos da invenção são mostrados na figura 1. Compostos particularmente preferidos são os compostos números 1, 2, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21 e 22, especialmente os compostos números 1, 2, 9, 11, 12, 13, 14, 21 e 22, por exemplo, compostos números 1 e 11.

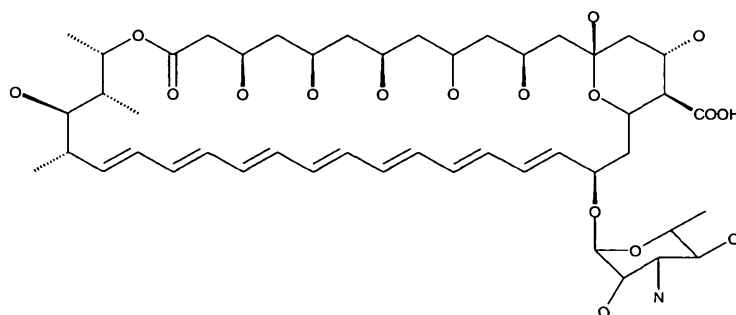
Outros compostos preferidos são aqueles nos quais o grupo C16 carbóxi é convertido em dimetiletilamida. Compostos nos quais o mesmo grupo carbóxi é convertido em um grupo metila são também preferidos. Compostos especialmente preferidos incluem aqueles com uma das alterações em C16 acima, bem como alterações na região de polioliol (C5-C11).

Conforme mencionado acima, os compostos da invenção podem tomar a forma de sais farmaceuticamente aceitáveis. Tais sais incluem sais de adição de ácido com ácidos orgânicos ou inorgânicos fisiologicamente aceitáveis. Exemplos de ácidos adequados para a formação de tais sais incluem acético, aspártico, benzenossulfônico, benzoico, bicarbônico, bissulfúrico, bitartárico, butírico, edetato de cálcio, cansilaico, carbônico, clorobenzoico, cítrico, edético, edisilaico, estólico, esila, esilaico, fórmico, fumárico, glucéptico, glucônico, glutâmico, glicolilarsanílico, hexâmico, hexil-resorcinólico, hidrabâmico, bromídrico, clorídrico, iodídrico, hidroxinaftóico, isetiônico, láctico, lactobiônico, maleico, málico, malônico, mandélico, metanossulfônico, metilnítrico, metil-sulfúrico, mícico, mucônico, napsilaico, nítrico, oxálico, p-nitrometano-sulfônico, pamoico, pantotênico, fosfórico, monohidrogeno fosfórico, di-hidrogeno fosfórico, ftálico, poligalacturônico, propiônico, salicílico, esteárico, succínico, sulfâmico, sulfanílico, sulfônico, sulfúrico, tânico, tartárico, teóclico e toluenossulfônico. Sais de glutamato são especialmente preferidos. Alternativamente, sais podem ser formados com bases. Exemplos de bases adequadas para a formação de tais sais incluem aminas pri-

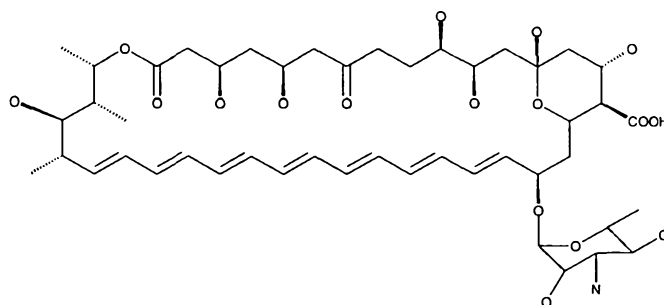
márias, secundárias e terciárias, amins substituídas, incluindo amins substituídas que ocorrem naturalmente, amins cíclicas, arginina, betaína, cafeína, colina, N,N-dibenziletlenodiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilenodiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glicosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromo, trietilamina, trimetilamina e tripropilamina. Os sais farmacologicamente aceitáveis podem estar na forma hidratada. Procedimentos para conversão de compostos da fórmula I em tais sais são convencionais na técnica.

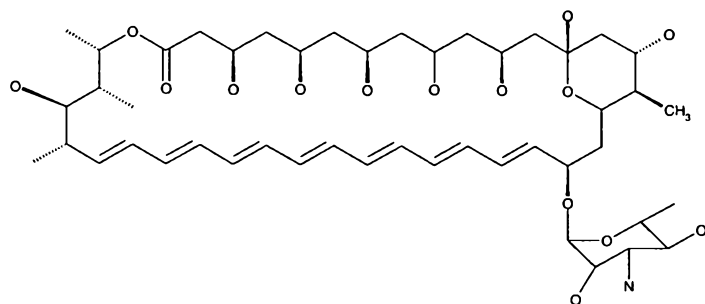
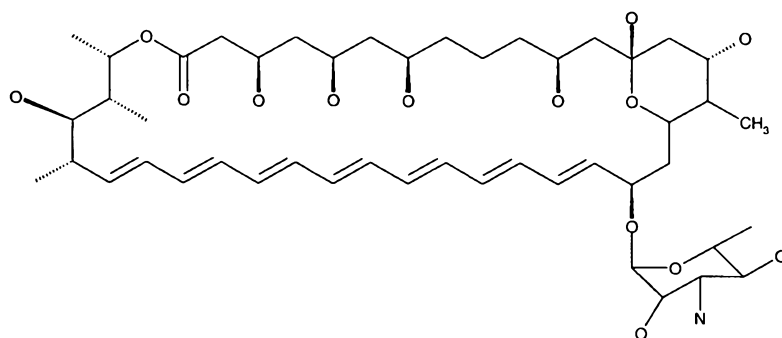
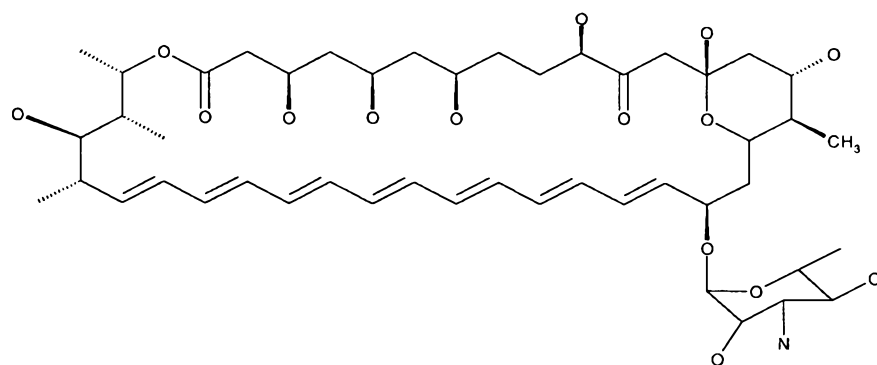
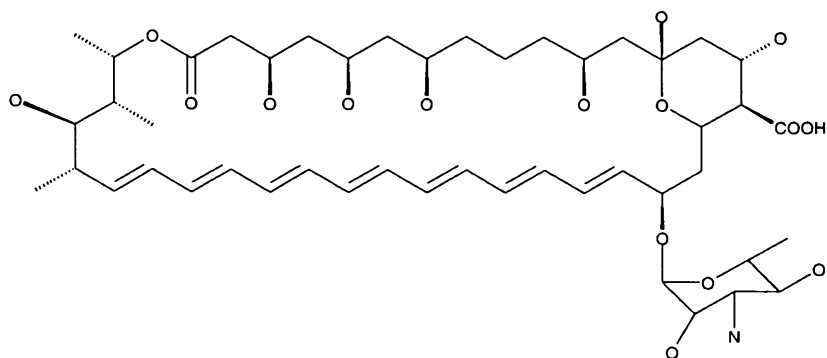
Compostos altamente preferidos da invenção podem ser derivados dos seguintes esqueletos (onde o grupo COOH sobre a posição 16 ou o grupo amino é funcionalizado conforme desejado, por exemplo, onde COOH é substituído por R7). Note que, em geral, átomos de hidrogênio não são extraídos desses esqueletos. Será apreciado que esses ainda estão presentes (isto é, para formar grupos hidroxila sobre os átomos -O):

B1

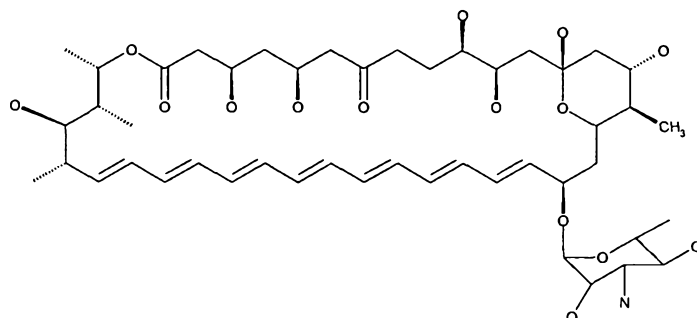


B2 (onde o grupo COOH sobre a posição 16 ou grupo N é funcionalizado)

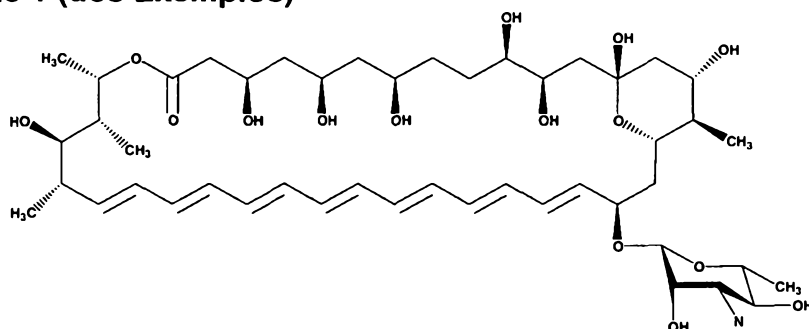


B3**B4****B5****B6**

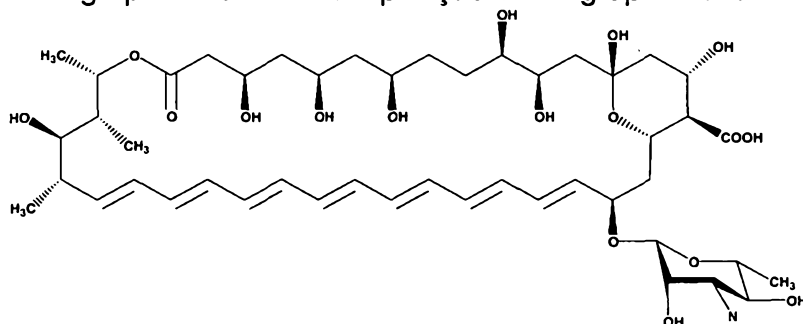
B7



Composto 1 (dos Exemplos)



S44HP (onde o grupo COOH sobre a posição 16 ou grupo N é funcionalizado)



5

Será apreciado que existe uma série de variáveis nos compostos da invenção. Para evitar dúvida, espera-se que cada definição de uma variável seja considerada divulgada em relação a todas as definições de outras variáveis no pedido. Em particular, portanto, opções preferidas para cada variável podem ser combinadas com opções menos preferidas e preferidas para qualquer outra variável.

Os compostos da invenção podem ser preparados usando procedimentos conhecidos na técnica, incluindo química sintética convencional, manipulação genética ou uma combinação dos mesmos.

Conforme mencionado acima, um aspecto da presente invenção proporciona um processo para fabricação de compostos conforme aqui an-

tes descrito compreendendo:

(i) modificação de um agrupamento gênico que codifica o sistema de sintase de policetídeo responsável pela síntese de nistatina para produzir um derivado de nistatina tendo uma ligação dupla entre C28 e C29; e

5 (ii) adicionalmente, modificação do referido agrupamento gênico para produzir um derivado de nistatina o qual é ainda modificado em uma ou mais das posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no grupo amino da micosamina ou

10 (iii) modificação do derivado resultante em uma ou mais das posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou ao grupo amino da micosamina através de uma reação química.

Um processo preferido da invenção compreende as etapas (i) e (ii), isto é, modificação de um agrupamento gênico que codifica o sistema de sintase de policetídeo responsável pela síntese de nistatina para produzir um
15 derivado de nistatina tendo uma ligação dupla entre C28 e C29 e uma outra modificação, com relação à nistatina, em uma ou mais das posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no grupo amino da micosamina (por exemplo, em uma ou mais das posições C5, C9, C10 ou C16).

20 Um segundo processo preferido da invenção compreende as etapas (i) e (iii).

Modificação de um agrupamento gênico que codifica o sistema de sintase de policetídeo responsável pela síntese de nistatina pode ser realizada de acordo com procedimentos convencionais, por exemplo, conforme descrito no WO01/59126. O agrupamento gênico de sintase de policetídeo
25 de nistatina codifica uma série de unidades repetidas (módulos), cada uma das quais é responsável por um dos ciclos de condensação na síntese de uma cadeia de policetídeo. Há um módulo de carregamento (*nysA*) o qual determina a natureza da unidade "unidade" inicial (ácido carboxílico) para início da síntese de cadeia de policetídeo e 18 módulos de "extensão" os
30 quais incorporam (condensam sobre a cadeia) outras unidades "extensoras" (os próximos ácidos carboxílicos os quais são adicionados à cadeia). Cada um de tais módulos, assim, codifica uma série de atividades enzimáticas (por

exemplo, enzimas) as quais resultam na síntese da molécula; o módulo contém domínios os quais codificam separadamente tais atividades. Assim, um módulo pode, tipicamente, compreender um domínio de acetiltransferase (AT), um domínio de proteína transportadora de acila (ACP) e um domínio de sintase de β -cetoacila (KS) para síntese e extensão (domínios de ceto-reductase (KR), de-hidratase (DH) e reductase de enoíla (ER) os quais determinam o estado reduzido da unidade inicial/extensora incorporada. O agrupamento gênico ainda contém genes (ou redes de leitura aberta, ORFs) que codificam outras enzimas (ou atividades enzimáticas) envolvidas na biossíntese de nistatina. Assim, uma tioesterase (TE) pode permitir a liberação do policetídeo da PKS. Ainda, os genes ou sequências gênicas no agrupamento gênico podem codificar enzimas ou atividades enzimáticas as quais podem modificar a molécula sintetizada (cadeia de policetídeo) adicionalmente, por exemplo, através de hidroxilação, por exemplo, mono-oxigenases (por exemplo, *nysN* ou *nysL*) ou através de glicosilação (por exemplo, atividade de glucuronosil transferase, por exemplo, *nys DI*).

Assim, módulos e/ou domínios do agrupamento gênico PKS podem ser modificados, por exemplo, através de inserção, deleção ou inativação ou através de substituição de um domínio ou módulo ou através de mutação de um domínio ou módulo para alterar sua atividade. Assim, o número de módulos e/ou domínios pode ser modificado ou eles podem ser alterados para mudar sua atividade. Outros genes ou sequências gênicas que codificam outras atividades enzimáticas, por exemplo, mono-oxigenase ou glicosil transferase, também podem ser modificadas. Tipicamente, os domínios "reduativos" (por exemplo, ER, DH e/ou KR) podem ser modificados (por exemplo, inativados) em um ou mais módulos ou sequências gênicas que codificam as atividades de mono-oxigenase (por exemplo, *NysL*, *NysN*) podem ser modificadas (por exemplo, inativadas).

A ligação dupla entre C28 e C29 pode, por exemplo, ser introduzida através de inativação dos domínios de ER no módulo 5 da sintase de policetídeo, conforme descrito no Exemplo 2 do WO01/59126.

Outras modificações com relação à nistatina, por exemplo, em

uma ou mais posições C5, C9, C10 ou C16, podem ser introduzidas através de outras modificações no agrupamento gênico que codifica o sistema de sintase de policetídeo. Quando outras modificações no agrupamento gênico são feitas, elas produzem, de preferência, uma modificação com relação a

5 uma ou mais das posições C5, C9, C10 ou C16.

Modificação da estrutura de nistatina em C5 pode ser feita através de inativação do domínio de ceto-reductase no módulo 17 da sintase de policetídeo de nistatina, por exemplo, através do método descrito nos exemplos.

Modificação da estrutura de nistatina em C9 pode ser feita através

10 de inativação do domínio de ceto-reductase no módulo 15 da sintase de policetídeo de nistatina, por exemplo, através do método descrito nos exemplos.

Modificação da estrutura de nistatina em C10 pode ser feita através de inativação do gene para mono-oxigenase de NysL responsável pela hidroxilação em C10, por exemplo, através do método descrito nos e-

15 xemplos.

Modificação da estrutura de nistatina em C7 pode ser feita através de inativação de domínios KR16.

Modificação da estrutura de nistatina em C11 pode ser feita através de inativação de domínios KR14.

Modificação da estrutura de nistatina em C16 pode ser feita através de inativação de genes que codificam mono-oxigenase P540 *nysN*, por exemplo, através do método descrito nos exemplos.

20

Outra modificação dos compostos resultante da etapa (i) e opcionalmente da etapa (ii) em uma ou mais posições C5, C7, C9, C10, C11, C16 ou no grupo amino da micosamina através de reação química pode ser realizada através de qualquer procedimento conhecido. Química com grupo de proteção convencional pode também ser empregada, sempre que necessário. Quando outras modificações são introduzidas através de reação química, elas produzem, de preferência, uma modificação com relação à nistatina na posição C16 e/ou no grupo amino da micosamina.

25

30

Uma reação química preferida é a formação de amida em C16. Conversão do grupo COOH da nistatina a uma amida pode ser realizada

através de reação do derivado de nistatina com a amina apropriada, opcionalmente na presença de agente de ativação (por exemplo, PyBOP).

Outra reação química preferida é a alquilação redutiva no grupo amino da micosamina. Alquilação redutiva pode ser realizada através de reação do derivado de nistatina com um aldeído apropriado para formar uma imina e redução da imina, de preferência *in situ*, através da adição de um agente de redução. Um agente de redução preferido é NaBH_3CN .

Uma outra reação química preferida é a reação de Amadori no grupo amino da micosamina. A reação de Amadori pode ser realizada através de reação do derivado de nistatina com (um) açúcar(es) de redução apropriado.

Um processo preferido da invenção proporciona compostos de fórmula (I), conforme aqui antes descrito. Em tais processos, modificações na posição C5 modificam R^1 e/ou R^2 com relação à nistatina, modificações em C9 modificam R^3 e/ou R^4 com relação à nistatina, modificações em C10 modificam R^5 e/ou R^6 com relação à nistatina e modificações em C16 modificam R^7 com relação à nistatina. Modificações no grupo amino da micosamina modificam R^8 e R^9 com relação à nistatina. Processos preferidos são aqueles que proporcionam R^1 - R^9 especificado aqui como sendo preferidos com relação aos compostos de fórmula I.

Os compostos podem ainda ser purificados através de qualquer técnica convencional, por exemplo, cristalização, cromatografia, etc. Os compostos de fórmula I da invenção contêm uma série de centros quirais e, como tal, existem em diferentes formas estereoisoméricas. Compostos particularmente preferidos são mostrados na figura 1.

Os compostos da invenção podem ser usados em uma ampla variedade de aplicações para inibir o crescimento ou matar fungos. Por exemplo, os compostos da invenção podem ser usados como desinfetantes ou como conservantes (por exemplo, em gêneros alimentícios e cosméticos). Uso dos compostos da invenção como um desinfetante ou como um conservante forma um outro aspecto da invenção.

Para uso como um desinfetante ou conservante, os compostos da

invenção podem ser usados isoladamente ou em combinação com outros agentes antifúngicos e/ou anti-bacterianos. Os compostos podem ser usados *per se* ou, mais preferivelmente, em mistura com um veículo, diluente ou excipiente.

Os compostos da invenção são particularmente adequados ao
5 tratamento ou prevenção de infecções fúngicas. Os compostos e composições farmacêuticas da invenção são especialmente adequados para o tratamento ou prevenção de infecções fúngicas de áreas internas e externas do corpo. Exemplos de áreas do corpo que podem ser tratadas incluem a pele, boca, vagina e trato gastrointestinal. Os compostos e composições são particularmente adequados para o tratamento de infecções fúngicas invasivas
10 (por exemplo, sistêmicas).

Os compostos da invenção têm, idealmente, um amplo espectro de atividade, mas são especialmente adequados ao tratamento de infecções fúngicas causadas por espécies *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Hormonema*, *Lecythophora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Fusarium*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Trichophyton* e *Scopulariopsis*, especialmente espécies *Candida* e *Cryptococcus* (por exemplo, espécies *Candida*).

Para uso em tal tratamento, os compostos podem ser formulados
20 como composições farmacêuticas de qualquer maneira convencional com um ou mais veículos, excipientes e/ou diluentes. A formulação farmacêutica específica dependerá do modo desejado de administração e será prontamente determinada por aqueles habilitados na técnica. Exemplos de veículos, excipientes e diluentes adequados incluem água, etanol, glicerol, polietileno glicol, cloreto de sódio, deoxicolato de sódio, açúcares (por exemplo, glicose, sacarose ou lactose), amidos (por exemplo, amido de milho ou amido de batata), celulose microcristalina, gomas (por exemplo, goma tragacanto), sorbitol, manitol, xilitol, estearato de magnésio, polivinilpirrolidona, ácidos graxos (por exemplo, ácido esteárico), gorduras, ceras, carbonato de cálcio,
25 cloreto de cálcio e ácido cítrico.
30

Tais composições farmacêuticas podem, adicionalmente, compreender um ou mais agentes de umedecimento, agentes adoçantes (por

exemplo, um açúcar, aspartame ou sacarina), agentes de lubrificação, agentes de estabilização, agentes de emulsificação, agentes de suspensão, agentes conservantes, agentes flavorizantes (por exemplo, baunilha, óleo de hortelã-pimenta ou um aroma de frutas) e/ou intensificadores de absorção.

5 Os compostos da invenção podem, se desejado, ser coadministrados com outras substâncias farmacologicamente ativas (por exemplo, uma, duas ou três). Uma vantagem associada ao uso de uma combinação dos compostos da invenção e outra(s) substância(s) ativa(s) é que ela pode aumentar o espectro de doenças para as quais a composição é adequada para
10 uso como um medicamento. Adicional ou alternativamente, uma diminuição da dose do composto da invenção e/ou da(s) outra(s) substância(s) ativa(s) podem, vantajosamente, ser obtida. Isso é particularmente vantajoso quando essa outra substância ativa está associada a efeitos colaterais conhecidos.

Substâncias ativas adicionais as quais podem ser usadas em
15 composições da invenção incluem outros agentes antifúngicos e antibióticos. Agentes antifúngicos representativos são azóis e equinocandinas. Antibióticos representativos incluem demeclociclina, acetonida de triamcinolona, sulfato de neomicina, gramicidina, oxotetraciclina e eritromicina.

Composições farmacêuticas usadas de acordo com a invenção
20 podem ser administradas oralmente, retalmente (por exemplo, usando um supositório), topicamente ou sistemicamente. A via escolhida dependerá, por exemplo, da doença e/ou do indivíduo a ser tratado, embora composições para administração oral e sistêmica sejam preferidas. Composições para administração sistêmica são particularmente preferidas.

25 As composições podem ser apresentadas em qualquer forma adaptada para uso na via de administração selecionada. Formas adequadas para administração oral incluem, por exemplo, comprimidos planos ou revestidos, comprimidos com liberação sustentada, comprimidos mastigáveis, cápsulas macias, suspensões e xaropes. Formas preferidas para uso de acordo
30 com a invenção são comprimidos, suspensões e xaropes, particularmente comprimidos.

Formas adequadas para administração sistêmica podem, por

exemplo, ser formulações para injeção intradérmica, intraperitoneal ou intravenosa. Formulações para injeção intravenosa são particularmente preferidas.

Formas adaptadas para administração tópica incluem composições para administração à pele e mucosa (por exemplo, géis, creme, sprays, loções, pomadas e aerossóis). Os compostos também podem ser formulados em composições retais ou vaginais, tais como supositórios ou enemas de retenção.

A quantidade do composto da invenção a ser usado em qualquer aplicação será prontamente determinada por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, para uso como um desinfetante ou conservante, a quantidade de composto que é requerida é aquela que inibe o crescimento ou é letal para um fungo-alvo. Embora a quantidade real dependa de um fungo-alvo e aplicação particular, para uso como um desinfetante ou conservante, os compostos da invenção são, tipicamente, usados em quantidades de 0,5 a 5% em peso, mais preferivelmente 1 a 3% em peso da solução ou material desinfetante a ser conservado.

Para uso para tratar infecções fúngicas, a quantidade do composto da invenção, bem como qualquer outra substância ativa opcional presente em mistura com o mesmo, pode ser prontamente determinada por aqueles habilitados na técnica e dependerá de vários fatores, incluído a natureza de qualquer outra substância ativa opcional, o método de administração, a doença a ser tratada e o peso do indivíduo. Geralmente, contudo, os compostos da invenção podem ser usados em quantidades de 0,01-50% em peso da composição, de preferência 1-20% em peso.

A invenção agora será descrita com referência aos exemplos não-limitativos a seguir e figuras, em que:

A figura 1 mostra a estrutura de uma série de compostos da invenção;

a figura 2 mostra UV-isoplotagens de S44HP e do extrato de DMSO de mutantes com ER5 e NysN inativados que produzem o composto 1;

a figura 3 mostra o espectro por TOF do principal pico de polieno a partir do extrato de DMSO de mutantes com ER5 e NysN inativados. Picos

com $m/z = 980$ e 1034 são referências internas;

a figura 4 mostra UV-isoplotagens de extratos de DMSO da cepa GG5073SP (cepa de referência) que produz S44HP e o mutante com ER5 e KR17 inativados que produz o composto 2;

5 a figura 5 mostra o espectro por TOF do principal pico de polieno a partir do extrato de DMSO do mutante com ER5 e KR17 inativados;

a figura 6 mostra UV-isoplotagens de extratos de DMSO da cepa GG5073SP (cepa de referência) que produz S44HP e o mutante ER5, KR17 e NysN inativados, que produz o composto 3;

10 a figura 7 mostra o espectro por TOF do principal pico de polieno a partir do extrato de DMSO do mutante com ER5, KR17 e NysN inativados. Picos com $m/z = 980$ e 1034 são referências internas;

a figura 8 mostra UV-isoplotagens de extratos de DMSO da cepa GG5073SP (cepa de referência) que produz S44HP e o mutante com ER5 e KR15 inativados que produz o composto 4; e

a figura 9 mostra os resultados de uma testagem de atividade antifúngica sobre os compostos 1 e 11.

As figuras 10-16 são esquemas para o preparo dos vários compostos da invenção.

20 A figura 17 mostra os resultados de testagem *in vivo* de novos compostos da invenção em um modelo com camundongo neutropênico de candidíase disseminada.

EXEMPLOS

PREPARO DE COMPOSTOS

25 Os compostos listados na Tabela 1 foram preparados. A estereoquímica precisa de cada um desses compostos é mostrada na figura 1.

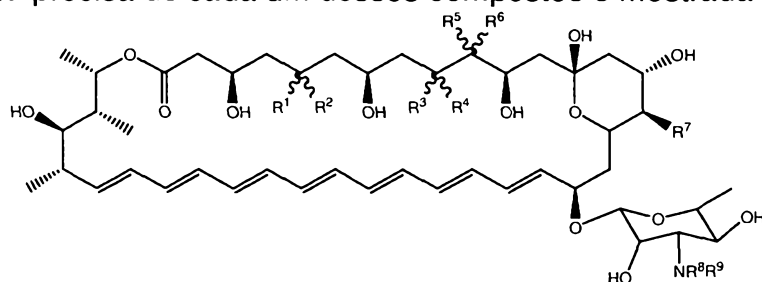


Tabela 1.

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

Tabela 1. –continuação-

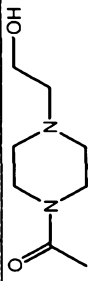
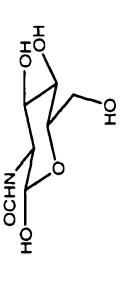
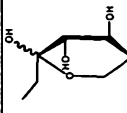
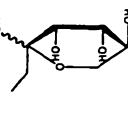
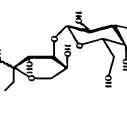
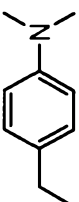
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
14	OH	H	H	H	OH	H	CONHCH(CH ₂ OH)COOCH ₃ (DL)	H	H
15	OH	H	H	H	OH	H		H	H
16	OH	H	H	H	OH	H		H	H
17	OH	H	H	H	OH	H	COOH		H
18	OH	H	H	H	OH	H	COOH		H
19	OH	H	H	H	OH	H	COOH		H

Tabela 1. –continuação-

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
20	OH	H	H	H	OH	H	COOH		=R ⁸
21	OH	H	H	H	OH	H	COOH	(CH ₂) ₃ NH ₂	H
22	OH	H	H	H	OH	H	COOH	(CH ₂) ₃ NH ₂	(CH ₂) ₃ NH ₂
23	OH	H	H	H	OH	H	COOH	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]-NH ₂ (L)	H
24	OH	H	OH	H	H	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
25	OH	H	H	H	H	H	CH ₃	H	H*
26	OH	H	OH	H	H	H	CH ₃	H	H*
27	OH	H	H	H	H	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
28	OH	H	H	H	OH	H	CONH(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	H	H*
29	OH	H	H	H	OH	H	CH ₃	H	H*

*como sal de glutamato

Síntese de S44HP

Esse composto foi preparado conforme descrito em Borgos S.E. e outros, *Arch Microbiol.* Abril de 2006; 185(3): 165-71.

Síntese de Compostos 1-4

- 5 Os compostos 1-4 foram preparados através de manipulação genética usando as seguintes combinações de mutações sítio-específicas no agrupamento gênico biossintético de nistatina (sequência – em Brautaset, T. e outros, *Chem Biol.* Junho de 2000; 7(6): 395-403:

Composto 1 mutações em ER5 + NysN;

- 10 **Composto 2** mutações em ER5 + KR17;

Composto 3 mutações em ER5 + KR17 + NysN;

Composto 4 mutações em ER5 + KR15.

O vetor de inativação de ER5, conforme descrito em Borgos S.E. e outros, *Arch Microbiol.* Abril de 2006; 185(3): 165-71, foi usado.

- 15 Os seguintes construtos foram criados e preparados pelo requerente:

NysN:

Vetores pSOK201nysN4.1-CL346ST e pSOK201nysN4.1-CL346AS para introdução de mutações CL346ST e CL346AS, respectivamente, em nysN

- 20 O fragmento NcoI/XbaI de 4,1 kb do clone lambda N95 recombinante (Brautaset, T. e outros, *Chem Biol.* Junho de 2000; 7(6): 395-403) foi clonado nos sítios correspondentes do plasmídeo pLITMUS28. A partir do construto resultante, todo o inserto de 4,1 kb foi excisado com EcoRI/HindIII e clonado nos sítios correspondentes do pGEM11zf(+). A partir do plasmídeo resultante, denotado pGEM11nysN4.1, a região de 1,5 kb, incluindo o
- 25 sítio ativo NysN, foi amplificada através de PCR usando os seguintes iniciadores:

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

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

- 30 Os iniciadores introduziram sítios EcoRI e HindIII (sublinhados), os quais foram usados para clonar o fragmento de PCR obtido nos sítios correspondentes do pGEM11zf(+), proporcionando o plasmídeo pGEM11nysN1.5.

O último plasmídeo foi usado como um *modelo* para mutagênese sítio-dirigida (usando o kit QuickChange, Stratagene), usando os seguintes oligonucleotídeos mutagênicos:

Mutação CL346ST:

- 5 CL346ST-F: 5'-CTACGGTGTCCACCA**GT****CGAC**GGGCCAGAACCTGGTGC-3'
CL346ST-R: 5'-GCACCAGGTTCTGGCCC**GTCGAC**TGGTGGACACCGTAG-3'

Mutação CL346AS:

- CL346AS-F: 5'-TCGGCTACGGTGTCCAC**GCTAGC**TGGGCCAGAACCTGG-3'
CL346AS-R: 5'-CCAGGTTCTGGCCCAG**GCTAGC**TGGGACACCGTAGCCGA-3'
- 10 Os nucleotídeos com mutação são indicados em negrito, enquanto que o novo sítio de restrição introduzido (Sall para a mutação CL346ST; NheI para a mutação CL346AS) estão sublinhados nas sequências. As mutações foram identificadas através de análise por restrição com Sall ou NheI e os insetos completos de vetores com mutação correta foram verificados
- 15 através de sequenciamento de DNA. Os fragmentos FspAI/Bpu1102I de 1,3 kb com mutação dos plasmídeos resultantes foram usados para substituir o fragmento correspondente do plasmídeo pGM11nysN4.1, proporcionando os plasmídeos pGM11nysN4.1-CL346ST e pGM11nysN4.1-CL346AS. A partir dos últimos construtos, os insertos de 4,1 kb contendo genes *nysN* com mu-
- 20 tação foram excisados com EcoRI/HindIII e ligados na parte principal EcoRI/HindIII de 3,1 kb do pSOK201, proporcionando os plasmídeos de inativação de *nysN* pSOK201nysN4.1-CL346ST e pSOK201nysN4.1-CL346AS.

- Para inativação de *nysN* na cepa que produz o composto 1, o construto pSOK201nysN4.1-CL346ST foi usado. Para inativação de *nysN* na
- 25 cepa que produz o composto 3, o construto pSOK201nysN4.1-CL346AS foi usado.

KR17:

Vetor pKR17m para introdução da mutação YA5145FE em KR17 de NysJ

- O fragmento PmlI/BamHI de 4,0 kb do plasmídeo pL98E (Brautaset, T. e outros, *Chem Biol.* Junho de 2000; 7(6): 395-403) foi excisado e
- 30 ligado nos sítios HincII/BamHI do vetor pGEM3zf(+), proporcionando o plasmídeo pBB4.0. Um fragmento de DNA de 1,5 kb, incluindo a região do sítio

ativo KR17, foi amplificado por PCR a partir do pBB4.0 usando os seguintes iniciadores:

KR17-F: 5'-tttctgCAGGCCGCGGTGCGCGC-3' (sentido) e

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

5 O construto de PCR foi digerido terminalmente com PstI (sítio de reconhecimento sublinhado no iniciador) e SacI (sítio de reconhecimento no fragmento de DNA amplificado) e o fragmento de 1,4 kb foi ligado nos sítios correspondentes do pLITMUS28. O plasmídeo resultante, pLIT1.4, foi usado como um *modelo* para mutagênese sítio-dirigida com os seguintes oligonucleotídeos mutagênicos:

KR17-mut1:

5'-GCCCCGGCCAGGGCAACT**TCGA**AGCCGGCAACACGTTCC-3'

KR17-mut2:

5'-GGAACGTGTTGCCGGCT**TCGA**AAGTTGCCCTGGCCGGGGC-3'.

15 Nucleotídeos com mutação são indicados em negrito, enquanto que o novo sítio de restrição BstBI introduzido está sublinhado nas sequências. Mutação correta foi verificada através de digestão com BstBI e todo o inserto do plasmídeo com mutação foi verificado através de sequenciamento de DNA. A partir do plasmídeo resultante, pLIT1.4m, o fragmento BclI/AccII de 1072 bp foi excisado e usado para substituir o fragmento correspondente do plasmídeo pBB4.0, proporcionando o plasmídeo pBB4.0m. Todo o inserto de 4,0 kb do pBB4.0m foi excisado com EcoRI + HindIII e ligado junto com a parte principal EcoRI/HindIII de 3,0 kb do plasmídeo pSOK201, proporcionando o vetor de inativação de KR17, pKR17m.

25 KR15:

Vetor pKR15m para introdução de mutação YA1888FE em KR15 de NysJ

O fragmento KpnI/PmlI de 3,6 kb do pL20X (Brautaset, T. e outros, *Chem Biol.* Junho de 2000; 7(6): 395-403) foi excisado e ligado nos sítios KpnI/HincII do pGEM3zf(+), proporcionando o pKP3.6. O último plasmídeo foi usado como um *modelo* para a amplificação por PCR de um fragmento de DNA de 1,1 kb usando os seguintes iniciadores:

KR15-F1: 5'-ttttgaaTTCCCGACGGCCTCTCCTACC-3' (sentido) e

KR15-R1: 5'-ttttaagCTTGCCGAGTCGGTTGCGC-3' (antissentido)

O produto de PCR resultante foi terminalmente digerido com EcoRI/HindIII (os sítios de restrição estão sublinhados nos iniciadores) e ligado nos sítios correspondentes do pLITMUS28, proporcionando o pLIEH1.1.

- 5 O último plasmídeo serviu como um *modelo* para mutagênese sítio-dirigida usando os seguintes oligonucleotídeos mutagênicos:

mutKR15-1F: 5'-CCGGGCCAGGCCAACT**TCGAAG**CCGGCAACACCTTCCTCG-3'

mutKR15-1R: 5'-CGAGGAAGGTGTTGCCGGC**TTCGAAG**TTGGCCTGGCCCGG-3'

- Nucleotídeos com mutação são mostrados em negrito e está sublinhado o novo sítio BstBI introduzido. Mutação correta foi verificada através de digestão com BstBI e todo o inserto do plasmídeo com mutação foi verificado através de sequenciamento de DNA. A partir do plasmídeo com mutação, o fragmento FspA1/AccIII de 1045 bp foi excisado e usado para substituir a região correspondente do pKP3.6, proporcionando o pKP3.6mut.
- 15 Todo o inserto de 3,6 kb do pKP3.6mut foi, então, excisado com EcoRI/HindIII e ligado com o fragmento EcoRI/HindIII de 3,2 kb do pSOK201, proporcionando o vetor de inativação de KR15, pKR15m.

Introdução de vetores de substituição em cepas de *S. noursei*:

- Todos os vetores de inativação construídos foram transformados em *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002) e as cepas recombinantes resultantes foram usadas para conjugação de vetores de inativação em cepas de *S. noursei*, conforme descrito previamente (Brautaset, T. e outros, *Chem Biol.* Junho de 2000; 7(6): 395-403):
- 20 em *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002) e as cepas recombinantes resultantes foram usadas para conjugação de vetores de inativação em cepas de *S. noursei*, conforme descrito previamente (Brautaset, T. e outros, *Chem Biol.* Junho de 2000; 7(6): 395-403):

- Verificação do 1° crossover através de Southern Blot + PCR
- 25 - Seleção de 2° candidatos de crossover (apramicina-sensível)
- Caracterização genética de 2° candidatos de crossover através de Southern blot + PCR
- Complementação dos 2° mutantes de crossover com pNA0 (Brautaset e outros, 2000, *Chem. Biol.*, 7: 395-403).

- 30 As cepas recombinantes complementadas foram submetidas à fermentação e a produção de moléculas correspondentes foi confirmada via análise por HPLC e MS-TOF.

Composto 1Isoplotagens por UV

Padrão S44HP e o extrato de DMSO do mutante de *S. noursei* com ER5 e NysN inativados são mostrados nas isoplotagens na figura 2.

5 Isoplotagens por LC-MS

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

Fase móvel A: acetato de amônio a 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH não ajustado

10 Fase móvel B: acetonitrilo a 100% (Rathburn, grau para HPLC)

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

15 7,40 27

12,00 27

Fluxo: 0,22 mL/min

Temperatura da coluna: Ambiente

Parâmetros TOF-MS:

20 Ionização API-ES negativa

Gás de secagem: 10 l/min

pressão do nebulizador: 275,79 KPa manométrica 40 psig

Temp. do gás de secagem: 350 °C

Tensão do capilar: 3000 V

25 Fragmentador: 200 V

Espectro por TOF-MS

O espectro por TOF-MS é mostrado na figura 3, em que os picos de $m/z = 966$, 980 e 1034 são referências de massa interna. O m/z teórico (íons negativos) do composto 1 ($C_{47}H_{75}NO_{15}$) é de $892,5063$. Esse m/z é observado com alta precisão e se correlaciona ao pico-UV de heptano. A perda de água (1 e 2 moléculas) durante ionização do composto 1 também proporciona picos de massa com $\Delta m/z = -18$ e $\Delta m/z = -36$, respectivamente.

Purificação através de LC preparativa

Purificação foi realizada sobre uma coluna preparativa de fase reversa.

Método preparativo:

5 Coluna: Agilent Prep-C18 de 50 x 250 mm, 10 μ m (Agilent Technologies).

Fase móvel A: acetato de amônio a 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH ajustado para 4,0 com ácido acético (JT Baker #6002)

Fase Móvel B: metanol a 100% (Lab-Scan, grau para HPLC)

10	Tempo	% B
	0,00	78
	6,00	78
	6,20	100
	11,00	100

15 11,20 78

Fluxo: 85 mL/min

Temperatura da coluna: Ambiente

Após purificação através de LC preparativa, foi mostrado que o composto 1 constitui > 97 % dos macrolídeos de polieno na amostra, conforme determinado através dos dados de UV e MS.

20

Método de LC-MS

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

25 Fase móvel A: acetato de amônio a 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH ajustado para 4,0 com ácido acético (JT Baker #6002)

Fase móvel B: acetonitrilo a 100% (Rathburn, grau para HPLC)

	Tempo	% B
	0,00	27
	10,00	53
30	10,10	27
	15,00	27

Fluxo: 0,3 mL/min

Temperatura da coluna: Ambiente

Para polienos sem o grupo carboxila (principalmente composto 1), o método foi também realizado com bicarbonato de amônio a 20 mM (Fluka #09830), pH ajustado para 7,0 com ácido acético (JT Baker #6002) como fase móvel A, uma vez que o pH elevado proporcionou separação ligeiramente melhor entre polienos com e sem o grupo carboxila ionizável.

Parâmetros de MS:

Ionização API-ES negativa

gás de secagem: 12 l/min

10 pressão do nebulizador: 241,3 KPa manométrico (35 psig)

Temp. do gás de secagem: 350 °C

Tensão do capilar: 3000 V

Composto 2

Isoplotagens por UV

15 Os extratos de DMSO da cepa GG5073SP (que produz S44HP) e o mutante com domínios ER5 e KR17 inativados são mostrados nas isoplotagens na figura 4.

Método de LC-MS e parâmetros de TOF-MS: mesmo conforme para o composto 1.

20 Dados de TOF-MS

O espectro por TOF-MS é mostrado na figura 5. O m/z teórico (íons negativos) do composto 2 ($C_{47}H_{71}NO_{17}$) é de 920,4649. Esse m/z é observado com precisão aceitável (erro de < 3 ppm) e se correlaciona com o pico-UV de heptaeno.

25 Purificação através de LC preparativa

Purificação foi realizada sobre uma coluna preparativa de fase reversa.

Método Preparativo:

30 Coluna: Agilent Prep-C18 de 50 x 250 mm, 10 µm (Agilent Technologies).

Fase móvel A: acetato de amônio a 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH ajustado para 4,0 com ácido acético (JT Baker #6002)

Fase móvel B: metanol a 100% (Lab-Scan, grau para HPLC)

	Tempo	% B
	0,00	70
	15,00	70
5	15,20	100
	19,00	100
	19,20	70
	22,00	70
	Fluxo: 100 mL/min	

10 Temperatura da coluna: Ambiente

Após purificação através de LC preparativa, foi mostrado que o composto 2 constitui > 95,2 % de macrolídeos de polieno na amostra, conforme determinado através dos dados de UV e MS.

Método de LC-MS: mesmo conforme para o composto 1.

15 Composto 3

Isoplotagens por UV

Os extratos de DMSO da cepa GG5073SP (que produz S44HP) e do mutante com domínios ER5 e KR17 inativados e NysN inativado são mostrados nas isoplotagens na figura 6.

20 Método de LC-MS:

Coluna: Zorbax Bonus-RP de 2,1 x 50 mm, 3,5 µm (Agilent Technologies).

Fase móvel A: acetato de amônio a 10 mM (Riedel-de-Haën #25006), pH ajustado para 4,0 com ácido acético (JT Baker #6002)

25 Fase móvel B: acetonitrilo a 100% (Rathburn, grau para HPLC)

	Tempo	% B
	0,00	27
	6,50	65
	7,30	65
30	7,40	27
	12,0	27
	Fluxo: 0,3 mL/min	

Temperatura da coluna: Ambiente

Parâmetros de TOF-MS: mesmo conforme para o composto 1

O espectro por TOF-MS é mostrado na figura 7, em que os picos de $m/z = 980$ e 1034 são referências de massa interna. O m/z teórico (íons negativos) do composto 3 ($C_{47}H_{73}NO_{15}$) é de $890,4907$. Esse m/z é observado com alta precisão (veja espectro de massa) e se correlaciona bem com o pico-UV de heptaeno. A perda de água (1 e 2 moléculas) durante ionização do composto 3 também proporciona também picos de massa com $\Delta m/z = -18$ e $\Delta m/z = -36$, respectivamente. Também, o análogo carboxilado (com $m/z = 920,4644$ no espectro por MS mostrado) mostra um grau significativo de coeluição cromatográfica. Sabe-se que compostos carboxilados têm eficiência de ionização significativamente maior no modo de MS negativo, de modo que quantificação relativa não deverá ser baseada nas intensidades de sinal do espectro de MS mostrado.

15 Composto 4

Isoplotagens por UV

Os extratos de DMSO da cepa GG5073SP (que produz S44HP) e do mutante com domínios ER5 e KR15 inativados são mostrados nas isoplotagens na figura 8.

20 Método de LC-MS: mesmo conforme para o composto 3.

Síntese de Compostos 5-23

Geral

As reações foram monitoradas através de TLC sobre lâminas de Sílica-gel 60F254 da Merck em um sistema de solvente de $Cl_3:MeOH:H_2O:HCOOH$. (13:6:1:0,1). A pureza dos produtos resultantes foi determinada através de HPLC e era de 80-90%. HPLC de fase reversa analítica foi realizada sobre um instrumento de HPLC Shimadzu da série LC 10 sobre uma coluna Kromasil 100-C18 (4×250 mm, tamanho de partícula $6 \mu m$) em um volume de injeção de $20 \mu L$ e um comprimento de onda 408 nm. O sistema de solvente compreendia H_3PO_4 a $0,01M$ em um pH de $2,6$ e acetonitrilo. A proporção de acetonitrilo variava de 30 a 70% durante 30 min, com uma taxa de fluxo de $1,0$ mL/min.

Síntese de Compostos 5-16

A uma mistura de S44HP (18 mg, 0,02 mmol) e 0,06 mmol do cloridrato de amina apropriado dissolvido em 0,3 mL de DMSO foi adicionado, aos poucos, Et₃N para ajustar o pH para 8-8,5 e, após o que, durante 15 minutos, 0,03 mmol de reagente PyBOP. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora. Subsequente adição de éter dietílico (~3 mL) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (3 mL x 2). Após a adição de 5 mL de acetona a esse óleo, um precipitado amarelo de amida foi formado. O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e, então, seco *in vacuo*. Todas as amostras foram obtidas em rendimentos de mais de 90%. Os dados analíticos para esses compostos são resumidos na Tabela 2 abaixo.

Síntese de Compostos 17-19

O monossacarídeo (D-glicose ou D-galactose) ou dissacarídeo (lactose) apropriado (0,086 mmol) foi adicionado a uma solução de S44HP (40 mg, 0,043 mmol) em DMF (2 mL). A mistura de reação foi mantida a 37°C durante 20 horas e, então, a solução foi adicionada gota a gota a éter dietílico (50 mL). O precipitado resultante foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco. O precipitado amarelo obtido foi purificado através de cromatografia rápida (CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1)). Frações contendo o composto desejado foram coletadas e a solução foi concentrada. A adição de éter dietílico, então, proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. Todas as amostras foram obtidas em rendimentos de 40-45%. Os dados analíticos para esses compostos são resumidos na Tabela 2 abaixo.

Síntese de Composto 20

A uma solução de 4-N,N-dimetilaminobenzaldeído (0,065 mmol) e S44HP (20 mg, 0,022 mmol) em DMF (2 mL) foi adicionado NaBH₃CN (4,1 mg, 0,065 mmol). A mistura de reação foi mantida a 37°C durante 20 h. A adição de éter dietílico (10 mL) levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (10 mL x 2). Um precipitado amarelo foi formado após a adição de acetona (10 mL). O precipitado foi filtrado, lavado

com éter dietílico e seco. O sólido obtido foi purificado através de cromatografia rápida (CHCl_3 :MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1)) sobre sílica-gel da Merck para cromatografia em coluna (0,040 – 0,063 mm). Frações contendo o composto desejado foram coletadas, a solução foi concentrada e a adição de éter dietílico proporcionou um precipitado amarelo o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*.

Síntese de Compostos 21 e 22

A uma solução de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-3-aminopropionaldeído (160 mg, 0,054 mmol) e S44HP (100 mg, 0,011 mmol) em DMF (3 mL) foi adicionado NaBH_3CN (34 mg, 0,054 mmol). A mistura de reação foi mantida a 37°C durante 20 horas e, então, adicionada gota a gota a éter dietílico (200 mL). O precipitado amarelo da mistura de compostos foi filtrado e os compostos individuais foram separados e purificados através de cromatografia rápida sobre Sílica-gel da Merck para cromatografia em coluna (0,040 – 0,063 mm) em um sistema de gradiente linear CHCl_3 : MeOH:HCOOH (3:1:0,01) δ CHCl_3 :MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1) para proporcionar N-[N-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-3-aminopropil]-S44HP e N,N-di-[N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-3-aminopropil]-S44HP como sólidos amarelos.

A uma solução de N-[N-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-3-aminopropil]-S44HP ou N,N-di-[N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-3-aminopropil]-S44HP em DMSO (3 mL), piperidina (0,1 mL) foi adicionada. Após 2 h em temperatura ambiente, éter dietílico (~7 mL) foi adicionado e um resíduo oleoso se formou, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (7 mL x 2). Adição de acetona (10 mL) proporcionou um precipitado amarelo de composto 21 ou composto 22, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. Os dados analíticos para os compostos 21 e 22 resultantes são resumidos na Tabela 2 abaixo.

Síntese de Composto 23

A uma solução de S44HP (100 mg, 0,11 mmol) em DMF seca (2 mL), N-oxi-succinimida éster de N',N'-di-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-lisina (221 mg, 0,33 mmol) e Et_3N (15,3 μL , 0,11 mmol) foram adicionados. A mistura de reação foi mantida a 37°C durante 1 h, então, H₂O (5 mL) foi adiciona-

do. A mistura foi extraída com n-BuOH (3 x 5 mL). As frações orgânicas foram combinadas e lavadas com HCl a 0,01 N (1 x 5 mL) e H₂O (3 x 5 mL). A solução foi concentrada e a adição de éter dietílico proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e purificado através de cromatografia rápida sobre sílica-gel (CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:4:0,5:0,01)). Frações contendo o composto desejado foram coletadas, a solução foi concentrada e a adição de éter dietílico proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*.

Ao sólido amarelo isolado (30 mg) em DMSO (3 mL), piperidina (0,1 mL) foi adicionada. Após 2 h em temperatura ambiente, éter dietílico (~7 mL) foi adicionado, um resíduo oleoso se formou e foi agitado sucessivamente com éter dietílico (7 mL x 2). Adição de acetona (10 mL) proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*.

Tabela 2. TLC (R_f), HPLC (R_t), espectros de massa por MALDI e dados de solubilidade para os compostos 5-23

	Fórmula molecular	R _f *	R _t **	Massa exata por MALDI MS		Solubilidade em água
				Calculado	Encontrado [M+Na] ⁺	
5	C ₄₉ H ₇₈ N ₂ O ₁₇	0,30	10,71	966,15	989,70	+
6	C ₄₈ H ₇₆ N ₂ O ₁₆	0,38	11,60	936,52	959,69	+
7	C ₄₉ H ₇₈ N ₂ O ₁₇	0,27	11,52	922,50	923,07 ^{##}	-
8	C ₄₈ H ₇₆ N ₂ O ₁₆	0,62	16,83	1036,57	1058,15	-
9	C ₅₇ H ₈₈ N ₂ O ₁₆	0,47	14,33	1008,54	1032,09	+
10	C ₅₁ H ₈₀ N ₂ O ₁₈	0,37	13,47	1008,54	1031,99	-
11	C ₅₂ H ₈₅ N ₃ O ₁₆	0,14	7,65	1007,59	1008,60 ^{##}	+
12	C ₅₀ H ₈₀ N ₂ O ₁₇	0,38	10,86	980,55	981,55 ^{##}	±
13	C ₅₁ H ₈₀ N ₂ O ₁₉	0,58	11,55	1024,54	1025,57 ^{##}	+
14	C ₅₁ H ₈₀ N ₂ O ₁₉	0,58, 0,54	12,66, 13,22	1024,54	1025,48 ^{##}	+
15	C ₅₃ H ₈₅ N ₃ O ₁₇	0,55	7,43	1035,59	1059,16	+
16	C ₅₃ H ₈₄ N ₂ O ₂₁	0,12	9,35	1084,56	1085,48 ^{##}	±

	Fórmula molecular	Rf*	Rt**	Massa exata por MALDI MS		Solubilidade em água
				Calculado	Encontrado [M+Na] ⁺	
17	C ₅₃ H ₈₃ NO ₂₂	0,22	11,54	1085,54	1109,15	±
18	C ₅₃ H ₈₃ NO ₂₂	0,22	13,98#	1085,54	1109,00	±
19	C ₅₉ H ₉₃ NO ₂₇	0,16	11,64	1247,59	1271,12	±
20	C ₆₅ H ₉₅ N ₃ O ₁₇	0,63	14,35	1189,67	1212,72	-
21	C ₅₀ H ₈₀ N ₂ O ₁₇	0,14	9,78	980,55	981,58	±
22	C ₅₃ H ₈₇ N ₃ O ₁₇	0,09	7,40	1037,60	1038,54	±
23	C ₅₃ H ₈₅ N ₃ O ₁₈	0,06	7,70	1051,58	1052,65	+

*TLC sobre lâminas 60F254 de Sílica-gel da Merck em sistema de solventes CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1).

**HPLC foi realizada em um instrumento de HPLC Shimadzu da série LC 10 sobre uma coluna Kromasil 100-C18 (4 × 250 mm, tamanho de partícula de 6 µm) em um volume de injeção de 20 µL e um comprimento de onda de 408 nm. O sistema compreendia 0,01M de H₃PO₄ a 0,01M em um pH de 2,6 e acetonitrilo. A proporção de acetonitrilo variava de 30 a 70% durante 30 min, com taxa de fluxo de 1,0 mL/min.

#Sistema de HPLC isocrático - MeCN a 35%.

10 ##[M+H]⁺

Solubilidade em água: + solubilidade em água, ± dificilmente solúvel, - insolúvel

15 Seguindo os princípios sintéticos apresentados acima ou abaixo, os compostos 24 a 29 foram também sintetizados. Além disso, os outros compostos a seguir foram preparados baseado nos protocolos sintéticos apresentados nas figuras 10-16 e esquemas nas mesmas e na descrição a qual segue.

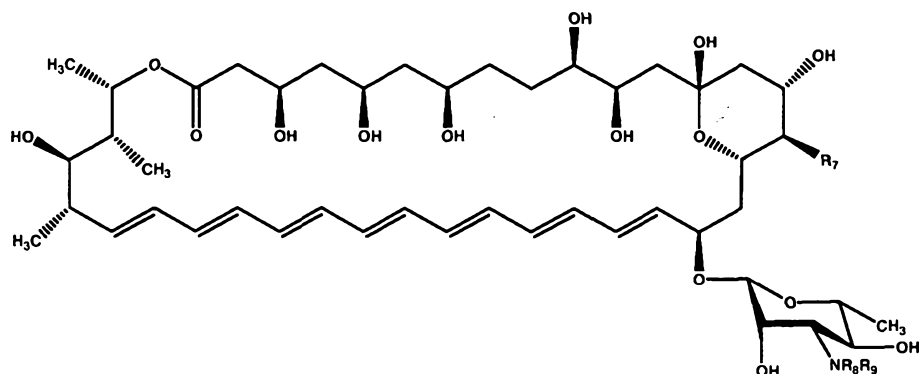
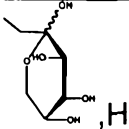


Tabela 3

Nº	R ₇	R ₈ , R ₉
Derivados di-substituídos de S44HP		
30	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	 , H (frutopiranosila)
31	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	 , H (tagatopiranosila)
32	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
33	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂] ₂ NH ₂ , H (L-lisila)
34	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glicila)
35	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NMe ₂	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
36	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	 , H (frutopiranosila)
37	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
38	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂] ₂ NH ₂ , H (L-Lys)
39	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glycila)
40	CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
41	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	 , H (frutopiranosila)
42	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	 , H (tagatopiranosila)

Nº	R ₇	R ₈ , R ₉
43	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
44	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-lisila)
45	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COCH ₂ NMe ₂ , H (N,N-di-Me-glicila)
46	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
47	COOH	COC ₆ H ₄ CH ₂ NH ₂ - <i>p</i> , H
48	CONHCH ₂ CH ₂ NMe ₂	H, H
49	CH ₃	 (frutopiranosila)
50	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₄ NMe ₂ - <i>p</i> , H
51	CH ₃	COCH[(CH ₂) ₄ NH ₂]NH ₂ , H (L-lisila)
52	CH ₃	(CH ₂) ₃ NH ₂ , (CH ₂) ₃ NH ₂
53	CH ₃	H,H – cloridrato
54	CH ₃	H,H – D-glutamato
55	CH ₃	H,H – L aspartato
56	CH ₃	H,H - metil-sulfonato
57	CH ₃	H,H – dicloroacetato

O Composto 28 é o sal de glutamato do composto 48.

Tabela 4. Propriedades dos derivados de S44HP e Composto 1: TLC (Rf), HPLC (Rt), espectros de massa por MALDI e dados de solubilidade

Compostos Nº	Fórmula molecular	Rf* (sistemas: I, II, III,IV)	Rt** (sistemas: A, B,C,D,E)	Massa exata por MALDI MS		Solubilidade em água
				Calculado [M+Na] ⁺	Encontrado [M+Na] ⁺	
Derivados di-substituídos de S44HP						
30	C ₅₈ H ₉₅ N ₃ O ₂₁	0,57 (IV)	14,07 (B)	1169,65	1192,63	+
31	C ₅₈ H ₉₅ N ₃ O ₂₁	0,53 (III)	12,21 (A)	1169,65	1192,47	+
32	C ₆₁ H ₉₆ N ₄ O ₁₆	0,55 (III)	24,78 (B)	1140,68	1163,65	–
33	C ₅₈ H ₉₇ N ₅ O ₁₇	0,02 (I)	9,98 (A)	1135,69	1158,73	±
34	C ₅₆ H ₉₂ N ₄ O ₁₇	0,20 (III)	11,49 (A)	1092,65	1115,41	+
35	C ₆₀ H ₉₂ N ₄ O ₁₇	0,01 (I)	11,98 (A)	1140,68	1141,54 [#]	–
36	C ₅₆ H ₈₉ NO ₂₂	0,57 (IV)	13,22 (A)	1142,6	1165,58	±
37	C ₅₉ H ₉₀ N ₂ O ₁₇	0,53 (III)	18,25 (A)	1113,63	1136,53	–
38	C ₅₆ H ₉₂ N ₄ O ₁₈	0,02 (I)	8,50 (C)	1108,64	1109,49 [#]	+
39	C ₅₄ H ₈₇ N ₃ O ₁₈	0,47 (III)	13,10 (A)	1065,60	1070,49 ^{##}	±
40	C ₅₈ H ₈₇ N ₃ O ₁₈	(0,2) (I)	14,03 (A)	1113,63	1136,57	–

Tabela 4. –continuação-

Compostos Nº	Fórmula molecular	Rf* (sistemas: I, II, III,IV)	Rt** (sistemas: A, B,C,D,E)	Massa exata por MALDI MS		Solubilidade em água
				Calculado [M+Na] ⁺	Encontrado [M+Na] ⁺	
Derivados di-substituídos de S44HP						
41 ***	C ₅₇ H ₉₂ N ₂ O ₂₁	0,53 (IV)	14,92 (D)	1155,63	1178,55	+
42	C ₅₇ H ₉₂ N ₂ O ₂₁	0,52 (III)	11,00 (A)	1155,63	1156,47 [#]	+
43	C ₆₀ H ₉₃ N ₃ O ₁₆	0,51 (III)	14,69 (A)	1126,67	1149,57	–
44 ***	C ₅₇ H ₉₅ N ₅ O ₁₇	0,01 (I)	9,93 (A)	1121,67	1122,49 [#]	+
45	C ₅₅ H ₉₀ N ₄ O ₁₇	0,29 (III)	11,43 (A)	1078,63	1079,41 [#]	±
46	C ₅₉ H ₉₀ N ₄ O ₁₇	0,01 (I)	12,10 (A)	1126,63	1149,56	–
Derivados mono-substituídos de S44HP						
47	C ₅₅ H ₈₀ N ₂ O ₁₈	0,24 (I)	14,52 (A)	1056,54	1079,44	–
48	C ₅₁ H ₈₃ N ₃ O ₁₆	0,24 (I)	10,70 (A)	993,61	1016,58	±
Derivados mono-substituídos de Composto 1						
49 ***	C ₅₃ H ₈₅ NO ₂₀	0,65 (IV)	10,20 (A)	1055,57	1060,39 ^{##}	±
50	C ₅₆ H ₈₆ N ₂ O ₁₅	0,85 (III)	25,39 (B)	1026,60	1049,49	–

Tabela 4. –continuação-

Compostos Nº	Fórmula molecular	Rf* (sistemas: I, II, III,IV)	Rt** (sistemas: A, B,C,D,E)	Massa exata por MALDI MS	Solubilidade em água
Derivados mono-substituídos de Composto 1					
51	C ₅₃ H ₈₇ N ₃ O ₁₆	0,03 (I)	13,05 (A)	1021,61	±
52	C ₅₃ H ₈₉ N ₃ O ₁₅	0,02 (III)	10,07 (A)	1007,63	±
Sais solúveis em água de Composto 1					
53	C ₄₇ H ₇₆ ClNO ₁₅	0,31 (III)	18,30 (B)	929,49	+
29	C ₅₂ H ₈₄ N ₂ O ₁₉	0,32 (III)	18,41 (B)	1040,57	+
54	C ₅₂ H ₈₄ N ₂ O ₁₉	0,31 (III)	18,40 (B)	1040,57	+
55	C ₅₁ H ₈₂ N ₂ O ₁₉	0,31 (III)	18,40 (B)	1026,55	+
56	C ₄₈ H ₇₉ NO ₁₈ S	0,32 (III)	18,36 (B)	989,50	+
57	C ₄₉ H ₇₇ Cl ₂ NO ₁₇	0,31 (III)	18,36 (B)	1021,46	+

A pureza dos análogos obtidos para testagem inicial de atividade antifúngica era de 85 - 95%.

* TLC sobre lâminas 60F254 de Sílica-gel da Merck em um sistema de solvente: I - CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1), II - CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (7:1:0,01:0,01), III - CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH conc. (13:6:0,7:0,01), IV - AcOEt:n-ProOH:NH₄OH conc. (15:10:10).

** HPLC de fase reversa analítica foi realizada sobre um instrumento de HPLC Shimadzu HPLC da série LC 10 sobre uma coluna Kromasil 100-C18 (4 × 250 mm, tamanho de partícula de 6 µm) em uma volume de injeção de 20 µL e um comprimento de onda de 408 nm com taxa de fluxo de 1,0 mL/min.

5 Oo sistema de solvente compreendia:

A - HCOONH₄ a 0,2%, pH de 4,5 e MeCN. A proporção de MeCN variava de 30 a 70% durante 30 min.; B - HCOONH₄ a 0,2%, pH de 4,5 e MeCN: 25 → 65%, 40 min.; C - HCOONH₄ a 0,2%, pH de 4,5 e MeCN, 30 → 90 %, 30 min., 90 → 90%, 10 min.; D - sistema isocrático - MeCN a 35%.

10 *** Cloridrato.

Solubilidade em água: + solubilidade em água, ± dificilmente solúvel, – insolúvel

[M+H]⁺¹ ;

[M-H₂O+Na]⁺¹

15 Síntese de outros derivados de S44HP (Compostos 30 a 48)

Geral

As reações foram monitoradas através de TLC sobre lâminas de Sílica-gel 60F254 da Merck em um sistema de solvente: I - CHCl₃: MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1), II - CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (7:1:0,01:0,01),
20 III - CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH conc. (13:7:1:0,1), IV - AcOEt:n-ProOH: NH₄OH conc. (15:10:10).

HPLC de fase analítica reversa foi realizada sobre um instrumento de HPLC Shimadzu da série LC 10 sobre uma coluna Kromasil 100-C18 (4 × 250 mm, tamanho de partícula de 6 µm) em um volume de injeção
25 de 20 µL e um comprimento de onda de 408 nm com taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O sistema de solvente compreendia: A - HCOONH₄ a 0,2%, pH de 4,5 e MeCN. A proporção de MeCN variava de 30 a 70% durante 30 min.; B - HCOONH₄ a 0,2%, pH de 4,5 e MeCN: 25 → 65%, 40 min.; C - HCOONH₄ a 0,2%, pH de 4,5 e MeCN, 30 → 90 %, 30 min., 90 → 90%, 10 min.; D - sistema isocrático - MeCN a 35%; E - H₃PO₄ a 0,01M em um pH de 2,6 e MeCN,
30 MeCN, 30 → 70 %, 30 min. F - H₃PO₄ a 0,01M em um pH de 2,6 e MeCN, 40 → 80 %, 30 min.

Derivados di-modificados de S44HP

N-Frutosil S44HP N,N-dimetilaminopropil amida (DMAP), -hidroxipropil amida (HP) ou -N,N-dimetilaminoetil (DMAE) amida (Compostos 30, 36, 41 respectivamente); N-tagatopironosil S44HP DMAP amida (Composto 31) ou N-tagatopironosil S44HP DMAE amida (Composto 42) (*Esquema 1, lado esquerdo*).

1ª Etapa (amidação) – S44HP DMAP amida (Composto 11), HP amida (Composto 12) ou DMAE amida (Composto 48)

A uma mistura de S44HP (36 mg, 0,04 mmol) e 0,12 mmol do cloridrato de amina apropriado dissolvido em 0,6 mL de DMSO foi adicionado, aos poucos, Et₃N para ajustar o pH para 8-8,5 e, após o que, durante 15 minutos, 0,06 mmol de reagente PyBOP. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora. Subsequente adição de éter dietílico (~5 mL) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi sucessivamente agitado com éter dietílico (5 mL x 2). Após a adição de 8 mL de acetona a esse óleo, um precipitado amarelo de amida foi formado. O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e, então, seco *in vacuo*. A amida bruta (85 - 90% de pureza através dos dados de HPLC e contendo sais) foi purificada através de cromatografia em coluna sobre Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suécia). A coluna foi feita usando água. A pureza da fração foi controlada através de HPLC, resultando em objetivação da pureza > 92% S44HP amida apropriada através de HPLC.

2ª Etapa (Re-estruturação de Amadori de amidas)

D-Glicose ou D-galactose (0,086 mmol) foi adicionada a uma solução da S44HP amida apropriada (Compostos 11, 12, 48) (0,040 mmol) em DMF (2 mL). A mistura de reação foi mantida a 37°C durante 20 horas. Então, a mistura de reação foi adicionada gota a gota a éter dietílico (50 mL). O precipitado resultante foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco. O composto bruto (85 - 90% de pureza através dos dados de HPLC e contendo sais) foi purificado através de cromatografia em coluna sobre Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suécia). A coluna foi feita usando água. A pureza da fração foi controlada através de TLC, sistema IV.

Frações contendo o composto desejado foram coletadas e a solução foi concentrada. A adição de acetona proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com acetona e seco *in vacuo*. O composto 41 foi obtido como o cloridrato. À solução de Composto 41 em metanol, HCl a 0,1N em metanol até um pH de ~4. A adição de éter dietílico proporcionou um precipitado amarelo o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. A pureza do derivado de N-alquila de S44HP amida era de >92%. Os dados analíticos para esses compostos (30, 36, 41, 31, 42) são resumidos na Tabela 4 acima.

10 N-(4-N,N-Di-metilaminobenzil) S44HP DMAP amida, -HP amida ou -DMAE amida (Compostos 32, 37, 43, respectivamente) (Esquema 1 (fig 10), lado direito)

1ª Etapa (amidação). S44HP DMAP amida (Composto 11), HP amida (Composto 12) ou DMAE amida (Composto 48) foram obtidos conforme descrito acima para o Composto 30 (1ª Etapa).

2ª Etapa (N-alquilação redutiva de amidas)

A solução de 4-N,N-dimetilaminobenzaldeído (0,065 mmol) e a S44HP amida apropriada (Composto 11, 12 ou 48) (0,022 mmol) em DMF (2 mL) foi mantida a 37°C durante 2 h, então, NaBH₃CN (4,1 mg, 0,065 mmol) foi adicionado. A mistura de reação foi mantida a 37°C durante 20 h. Adição de éter dietílico (10 mL) levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (10 mL x 2). Um precipitado amarelo foi formado após adição de acetona (10 mL). O precipitado foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco. O composto bruto contendo sais foi purificado através de sílica-gel da Merck usando o sistema CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1). A pureza da fração foi controlada através de TLC, sistema I. Frações contendo o composto desejado foram coletadas e a solução foi concentrada. A adição de acetona proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com acetona e seco *in vacuo*. A pureza do derivado de N-alquila da S44HP amida apropriada era de >92%. Os dados analíticos para esses compostos são resumidos na Tabela 4 acima.

N-(N,N-dimetilglicil) S44HP DMAE amida, -HP amida ou -DMAP amida (Compostos 39, 45, 34, respectivamente) (N-aminoacilação de amidas, Esquema 2 (Fig 11, lado esquerdo))

A uma mistura de N, N-dimetilglicina (0,04 mmol) e S44HP DMAE amida apropriada (Composto 48), -HP amida (Composto 12) ou -DMAP amida (Composto 11) (veja **Esquema 1**) (0,02 mmol) em 0,5 mL de DMSO, Et₃N para ajustar o pH para 8 foi adicionado e, após o que, 0,03 mmol de reagente PyBOP aos poucos durante 15 minutos. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora. Subsequente adição de éter dietílico (~3 mL) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (3 mL x 2). Após a adição de 5 mL de acetona a esse óleo, um precipitado amarelo de amida foi formado. O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e, então, seco *in vacuo*, proporcionando N-(N,N-dimetilglicil) S44HP DMAE amida, -HP amida ou -DMAP amida (Compostos 39, 45, 34). Os dados analíticos para esses compostos são resumidos na Tabela 4 acima.

N-(N-L-Lisil) S44HP HP amida e -DMAE amida (Compostos 38 e 44, respectivamente)(Esquema 2, lado direito)

1ª Etapa: (N-[N-Fmoc-amino]acilação) – N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP

À solução esfriada para ~+5°C de N α ,N ϵ -di-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-L-lisina (180 mg, 0,33 mmol), N-hidroxibenzotriazol (54 mg, 0,4 mmol) em DMF seca (1,2 mL), DCC (62 mg, 0,3 mmol) foi adicionado e a mistura de reação foi agitada a ~+5°C durante 1 h. O resíduo de DCU foi filtrado e o eluato combinado foi adicionado a S44HP (184 mg, 0,2 mmol) em DMF (1,0 mL). Então, à mistura de reação, (*i*-Pro)₂EtN (0,1 mL, 0,81 mmol) foi adicionado gota a gota durante 10 minutos sob agitação. A mistura de reação foi agitada em r.t. durante 2 h sob controle por TLC no sistema: CH₂Cl₂:MeOH:H₂O:HCOOH (6:1:0,01:0,02) e, então, 20 mL de etil éter foram adicionados. O precipitado obtido foi filtrado, lavado através de uma mistura de etil éter:acetona (1:1, 10 ml x 3) e seco *in vacuo*, proporcionando 202 mg de pó amarelo. O composto bruto foi purificado através de cromatografia em coluna sobre sílica-gel da Merck. A coluna foi feita usando o sistema: CH-

Cl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (9:1:0,01:0,02 → 7:1:0,01:0,02). A pureza da fração foi controlada através de TLC no sistema II. Frações contendo o composto desejado coletado e a solução foram concentradas. A adição de acetona proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com acetona e seco *in vacuo*, proporcionando 60 mg de N-[N',N'-di-(9-fluorenilmetoxi-carbonil)-L-lisil] S44HP pura (>96%, HPLC, Rt = 22,80, sistema B). Espectro de massa por MALDI. Encontrado: 1500,542 [M-H₂O+Na]⁺¹. Calculado para C₈₃H₁₀₅N₃O₂₂ 1495,72 (Massa exata).

2ª Etapa (amidação de N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP - N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP HP amida ou -DMAE amida

A uma mistura de N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP (0,02 mmol) e 0,06 mmol de cloridrato de 3-hidroxipropil amina ou dicloridrato de 4-(N,N-dimethilaamino) propil amina dissolvido em 0,3 mL de DMSO foi adicionado, aos poucos, Et₃N para ajustar o pH para 7-7,5 e, após o que, durante 15 minutos, 0,03 mmol de reagente PyBOP. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora sob controle por TLC no sistema de CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH conc. (5:1:0,01:0,01). Subsequente adição de éter dietílico (~3 mL) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (3 mL x 2). Após a adição de 5 mL de acetona a esse óleo, um precipitado amarelo de amida foi formado. O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e, então, seco *in vacuo*, proporcionando a N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP HP-amida ou (N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP -DMAE amida apropriada com a pureza de ~90%, através dos dados de HPLC: Rt = 21,43 (C) e 20,39 (B), respectivamente. Dados de TLC: Rf = 0,47 e Rf = 0,43, respectivamente, no sistema de CHCl₃: MeOH: H₂O:NH₄OH conc. (5:1:0,01:0,01).

3ª Etapa (Fmoc remoção)

A N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP amida apropriada (30 mg) foi dissolvida em DMSO (3 mL), piperidina (0,1 mL) foi adicionada. Após 2 h em temperatura ambiente, éter dietílico (~7 mL) foi adicionado, um resíduo oleoso se formou e foi agitado sucessivamente com éter dietílico (7 mL x 2). Adição de acetona (10 mL) proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi fil-

trado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. O Composto 44 foi obtido como o cloridrato. À solução de Composto 44 em metanol, HCl a 0,1N em metanol foi adicionado até um pH de ~4. A adição de éter dietílico proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. Os dados analíticos para esses compostos são resumidos na Tabela 4 acima.

N-(4-Aminometilbenzoila) S44HP DMAP amide, -HP amida, -DMAE amida (Compostos 35, 40, 46 respectivamente)(Esquema 3, fig 12, lado esquerdo).
1ª Etapa (N-[4-Fmoc-aminometil] benzoilação) – N-(4-Fmoc-aminometil benzoil) S44HP

Os derivados foram obtidos nas condições conforme para o Composto 38 (1ª Etapa). A uma solução de ácido 4-N-Fmoc-aminometilbenzóico (80 mg, 0,022 mmol) e S44HP (100 mg, 0,11 mmol) em DMSO (3 mL), Et₃N para ajustar o pH para 7 e PyBOP (90 mg, 0,165 mmol) foi adicionado. A mistura de reação foi mantida em r.t. durante 20 h e, então, gota a gota a éter dietílico (200 mL) foi adicionado. O precipitado amarelo foi filtrado e purificado através de cromatografia em coluna sobre Sílica-gel da Merck para cromatografia em coluna (0,040 – 0,063 mm) no sistema de CHCl₃:MeOH: HCOOH (3:1:0,01) para proporcionar N-(4-N-Fmoc-aminometil)benzoil S44HP (Composto 47) com a pureza de ~95%, através dos dados de HPLC (Rt = 18,18, sistema B). TLC (Rf = 0,61, I).

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

Os derivados foram obtidos nas condições conforme para o Composto 38 (2ª Etapa), começando a partir de N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP e a DMAP-, HP- ou DMAE amina apropriada e usando reagente PyBOP. A mistura de reação foi agitada durante 4 h. A pureza era de ~ 85 - 93%, através dos dados de HPLC: N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP DMAP amida (Rt = 15,88, B; Rf = 0,25, I), N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP HP amida (Composto 12) (Rt = 17,14, B; Rf = 0,60, I) ou N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP DMAE amida (Rt = 15,95, B; Rf = 0,24, I).

3ª Etapa (Fmoc-remoção)

Os derivados foram obtidos nas condições conforme para o Composto 38 (3ª Etapa), começando a partir de N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP DMAP amida, -HP amida ou -DMAE amida. Os dados analíticos para esses três compostos são resumidos na Tabela 2 abaixo.

N-L-lisil S44HP DMAP-amida (Composto 33)(Esquema 3, lado direito)

1ª Etapa (Amidação) - S44HP DMAP-amida (Composto 11)

S44HP DMAP amida foi obtida conforme para o **Composto 33 (Esquema 1, lado esquerdo)**. A pureza era de ~90% (HPLC).

2ª Etapa (N-[N-Fmoc-amino]acilação de DMAP amida)-N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP DMAP-amida

A uma solução de S44HP DMAP amida (0,02 mmol) em DMSO (0,5 mL) de N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisina (0,04 mmol) e Et₃N foram adicionados (pH de 7-7,5) e, após o que, durante 15 minutos, 0,03 mmol de reagente PyBOP. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora. Subsequente adição de éter dietílico (~3 mL) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (3 mL x 2). Após a adição de 5 mL de acetona a esse óleo, um precipitado amarelo de amida foi formado. O precipitado foi formado, lavado com acetona e, então, seco *in vacuo*, proporcionando N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) S44HP DMAP amida, com a pureza de ~95%, através dos dados de HPLC (Rt = 22,01, sistema B).

3ª Etapa (Fmoc-remoção)

Os derivados foram obtidos nas condições conforme para o Composto 38 (3ª Etapa), começando a partir de N-(N α ,N ϵ -di-Fmoc-L-lisil) DMAP amida. Os dados analíticos para esses dois compostos são resumidos na Tabela 4 acima.

Derivados mono-modificados de S44HP

N-(4-Aminometilbenzoil) S44HP (Composto 47)(veja *Esquema 4, Fig 13, Fmoc-remoção*) foi obtido sob as condições conforme para o Composto 38 (3ª Etapa), começando a partir de N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil) S44HP (obtido de acordo com o *Esquema 3, 1ª Etapa*). Os dados analíticos

para esses dois compostos são resumidos na Tabela 4 acima.

N, N-dimetilaminoetila (DMAE) S44HP amida (Composto 48) (método alternativo, Esquema 5, fig 14)

1ª Etapa (Fmoc-introdução) N-Fmoc-S44HP

5 A uma solução agitada de 500 mg (0,5 mmol) de S44HP bruto em 6 mL de DMF:MeOH (5:1), 0,057 mL (0,65 mmol) de piridina e 360 mg (1,0 mmol) de FmocOSu foram adicionados aos poucos. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 4 h. Subsequente adição de éter dietílico (20 mL) à mistura de reação levou a um precipitado amarelo de N-Fmoc-S44HP. O precipitado foi filtrado e lavado com éter dietílico e seco. O N-Fmoc-S44HP bruto foi purificado através de cromatografia sobre sílica-gel da Merck no sistema de CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,05) a fim de proporcionar ~ 30% de N-Fmoc-S44HP com a pureza de 94% através de HPLC (Rt = 20,49, sistema: H₃PO₄ a 0,01M em um pH de 2,6 e MeCN, 40
10
15 → 80 %, 30 min. TLC 0,39 (III).

2ª Etapa (Amidação) N-Fmoc-S44HP DMAE amida

 A uma solução agitada de 115 mg (0,10 mmol) de N-Fmoc-S44HP em 2 ml de DMSO, 37 mg (0,30 mmol) de cloridrato de N,N-dimetilaminoetilamina e Et₃N para ajustar o pH para 7 – 7,5 foram adiciona-
20 dos. 78 mg (0,15 mmol) de PyBOP foram adicionados aos poucos; o pH da mistura de reação foi mantido em 7 – 7,5 através da adição de Et₃N. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 1 h. Subsequente adição de éter dietílico (5 mL) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (5 mL). Adição de acetona (10 mL) levou a um precipitado amarelo, o qual foi filtrado,
25 lavado com acetona e seco para proporcionar N-Fmoc-S44HP DMAE amida com a pureza de ~92%, através dos dados de HPLC (Rt = 14,50, sistema A).

3ª Etapa (Fmoc-remoção)

 O derivado - (Composto 48) foi obtido nas condições conforme
30 para o Composto 38 (3ª Etapa), começando a partir de N-Fmoc-S44HP DMAE amida. Os dados analíticos para esse compostos são resumidos na Tabela 4 acima.

Composto 1 puro: purificação de Composto 1, começando a partir da amostra de Composto 1 bruto (Esquema 6, Fig 15)

1ª Etapa (Fmoc-introdução e purificação)

N-Fmoc-Composto 1

- 5 A uma solução agitada de 2000 mg (2,0 mmoles) de Composto 1 bruto (contendo composto 1 - 81,5%, S44HP - 8,27% e impureza desconhecida de ~10% através dos dados de HPLC, sistema B) em 40 mL de DMSO, Et₃N foi adicionado para ajustar o pH para 7-7,5. 1400 mg (4,0 mmoles) de FmocOSu foram adicionados aos poucos; o pH da mistura de reação foi mantido em 7-7,5 através da adição de Et₃N. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 2 h. Subsequente adição de éter dietílico (200 mL) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (150 mL x 3). Após a adição de 50 mL de acetona a esse resíduo, éter dietílico (50 mL) foi adicionado para proporcionar um precipitado amarelo. O precipitado foi filtrado e lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*, proporcionando 2200 mg de N-Fmoc-composto 1 bruto, o qual foi purificado através de cromatografia em coluna sobre sílica-gel da Merck no sistema de CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH a 25% (13:6:1:0,05) a fim de proporcionar 650 mg (~30%) de N-Fmoc-composto 1 com a pureza de 86% através de HPLC (Rt = 18,44, sistema C).

2ª etapa (Fmoc-remoção)

- 25 Fmoc-composto 1 (400 mg) foi dissolvido em DMSO (60 mL), piperidina (0,2 mL) a 15°C foi adicionada. Após 2 h a 15°C, éter dietílico (~50 mL) foi adicionado; um resíduo oleoso se formou e foi agitado sucessivamente com éter dietílico (50 mL x 3). Adição de acetona (10 mL) e éter dietílico (20 mL) proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*, proporcionando 300 mg de composto 1 puro. A porção de composto 1 puro para HPLC foi obtida como o cloridrato. À solução de composto 1 (base) em metanol, HCl a 0,1N em metanol em um pH de ~4 foi adicionado. A adição de éter dietílico proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo* com a pureza de 92,1% através dos dados de HPLC (cloridrato, Rt = 11,37,

sistema A).

Derivados mono-modificados de Composto 1 (Esquema 7, fig 16)

N-Frutopiranosil-Composto 1 (Composto 49) (Re-estruturação de Amadori)

D-Glicose (0,086 mmol) foi adicionada a uma solução de com-
 5 posto 1 (0,040 mmol) em DMF (2 mL). A mistura de reação foi mantida a 37°C durante 20 horas. Então, a mistura de reação foi adicionada gota a gota a éter dietílico (50 mL). O precipitado resultante foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco. Composto bruto (85 - 90% de pureza através dos dados de HPLC e contendo sais) foi purificado através de cromatografia em coluna
 10 sobre Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suécia). A coluna foi feita usando água. A pureza da fração foi controlada através de TLC, sistema IV. Frações contendo o composto desejado foram coletadas e a solução foi concentrada. A adição de acetona proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com acetona e seco *in vacuo*. O composto
 15 41 foi obtido como o cloridrato. À solução de Composto 49 em metanol, HCl a 0,1N em metanol a um pH de ~4 foi adicionado. A adição de éter dietílico proporcionou um precipitado amarelo o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. Os dados analíticos para N-Frutopiranosil-Composto 1 (Composto 49) são resumidos na Tabela 2 abaixo.

20 N-(4-N,N-Di-metilaminobenzil) Composto 1 (Composto 50)(N-alquilação re-
 dutiva)

A solução de 4-N, N-dimetilaminobenzaldeído (0,065 mmol) e Composto 1 (0,022 mmol) em DMF (2 mL) foi mantida a 37°C durante 2 h, então, NaBH₃CN (4,1 mg, 0,065 mmol) foi adicionado. A mistura de reação
 25 foi mantida a 37°C durante 20 h. Adição de éter dietílico (10 mL) levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (10 mL x 2). Um precipitado amarelo foi formado após a adição de acetona (10 mL). O precipitado foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco. O composto bruto contendo sais foi purificado através de cromatografia em coluna sobre sílica-
 30 gel da Merck usando o sistema de CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH (13:6:1:0,1). A pureza da fração foi controlada através de TLC, sistema I. Frações contendo o composto desejado foram coletadas e a solução foi concentrada. A adição de

acetona proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com acetona e seco *in vacuo*. Os dados analíticos para N-(4-N,N-Di-metilamino-benzil) Composto 1 (Composto 50) são resumidos na Tabela 4 acima.

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

5 1ª etapa (N-[N-Fmoc-amino] acilação)

Solução de Composto 1 (50 mg, 0,055 mmol) em DMF seca (1 mL) foi esfriada a 10°C e, então, Et₃N (7,5 µl, 0,055 mmol) e N-óxi-succinimida éster de N',N'-di-Fmoc-L-lisina (57 mg, 0,083 mmol) foram adicionados. A mistura de reação foi agitada nessa temperatura durante 1 hora. A corrente de reação foi controlada através de TLC em um sistema de solventes de CHCl₃-MeOH (6:1). Adição de éter dietílico (~5 ml) à mistura de reação levou a um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico, seco *in vacuo* e purificado através de cromatografia em coluna sobre sílica-gel (sistema de CHCl₃-MeOH com gradiente de MeOH 0→10%). Frações contendo o composto desejado foram coletadas, a solução foi concentrada e a adição de éter dietílico proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. TLC: R_f = 0,6 (CHCl₃-MeOH a 6:1). HPLC: Rt = 13,08 (HCOONH₄ a 0,2%, pH de 4,5 e MeCN: 75 → 90%, 20 min, 90 → 90%, 10 min).

20 2ª etapa (Fmoc-remoção)

Ao sólido amarelo isolado (22 mg, 0,015 mmoles) em DMSO/MeOH a 10:1 (1 mL), piperidina (4,5 µl, 0,045 mmoles) foi adicionada. Após 30 min de agitação em temperatura ambiente, éter dietílico (~3 mL) foi adicionado; um resíduo oleoso se formou e foi sucessivamente agitado com éter dietílico (3 mL x 2). Adição de acetona (2 mL) proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. Os dados analíticos para N-L-Lisil-Composto 1 (Composto 51) são resumidos na Tabela 4 acima.

N,N-Di-(3-aminopropil)-composto 1 (Composto 52)

30 1ª etapa (N-alquilação redutiva)

A uma solução de N-Fmoc-3-aminopropionaldeído (160 mg, 0,054 mmol) e Composto 1 (100 mg, 0,011 mmol) em DMF (3 mL) foi adicio-

nado NaBH_3CN (34 mg, 0,054 mmol). A mistura de reação foi mantida a 37°C durante 20 horas e, então, adicionada gota a gota a éter dietílico (200 mL). O precipitado amarelo foi filtrado e purificado através de cromatografia rápida sobre Sílica-gel da Merck para cromatografia em coluna (0,040 –
 5 0,063 mm) em um sistema de gradiente linear de CHCl_3 : MeOH: HCOOH (3:1:0,01) $\rightarrow$ CHCl_3 :MeOH: H_2O : HCOOH (13:6:1:0,1) para proporcionar o precipitado amarelo de N,N-Di-(N-Fmoc-3-aminopropil) Composto 1. Dados de HPLC: $R_t = 27,43$ (C).

2ª etapa (Fmoc-remoção)

10 A uma solução de N,N-di-[3-(N-Fmoc)-aminopropil]-S44HP em DMSO (3 mL), piperidina (0,1 mL) foi adicionada. Após 2 h em temperatura ambiente, éter dietílico (~7 mL) foi adicionado e um resíduo oleoso se formou, o qual foi sucessivamente agitado com éter dietílico (7 mL x 2). Adição
 15 de acetona (10 mL) proporcionou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco *in vacuo*. Os dados analíticos para N,N-Di-(3-aminopropil) Composto 1 (Composto 52) são resumidos na Tabela 4 acima.

Sais de Composto 1

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

20 Composto 1 (13 mg, 0,015 mmol) foi dissolvido em 0,2 ml de DMSO e, então, a solução correspondendo ao aminoácido (0,015 mmol) em 0,1 ml de água foi adicionada. A mistura de reação foi mantida em temperatura ambiente durante 15 minutos. Adição de éter dietílico (~2 ml) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com
 25 éter dietílico (2 ml x 2). Após a adição de 3 ml de acetona a esse óleo, um precipitado amarelo de sal foi formado. O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e, então, seco *in vacuo*.

Metil-sulfonato (56), dicloroacetato (57)

30 O ácido correspondente (0,015 mmoles) foi dissolvido em 0,1 ml de DMSO e, então, foi adicionado à solução de Composto 1 (13 mg, 0,015 mmol) em 0,1 ml de DMSO. A mistura de reação foi mantida em temperatura ambiente durante 5 minutos. Adição de éter dietílico (~2 ml) à mistura de

reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (2 ml x 2). Após a adição de 3 ml de acetona a esse óleo, um precipitado amarelo de sal foi formado. O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e, então, seco *in vacuo*.

5 Cloridrato de Composto 1 (53)

À solução de Composto 1 (13 mg, 0,015 mmol) em 0,2 ml de DMSO foi adicionado 0,15 ml (0,015 mmol) de solução aquosa de HCl a 0,1N. A mistura de reação foi mantida em temperatura ambiente durante 5 minutos. Adição de éter dietílico (~2 ml) à mistura de reação levou a um resíduo oleoso, o qual foi agitado sucessivamente com éter dietílico (2 ml x 2). Após a adição de 3 ml de acetona a esse óleo, um precipitado amarelo de sal foi formado. O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e, então, seco *in vacuo*.

Todas as amostras foram obtidas em rendimentos de cerca de 90% e eram solúveis em água.

DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E TOXICIDADE

Estudo de suscetibilidade antifúngica (1)

Testagem de suscetibilidade antifúngica de levedos e fungos filamentosos (mofos) foi determinada usando o método de microdiluição de caldo descrito nos documentos da NCCLS M27-A [*Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, ISBN 1-56238-328-0, Pensilvânia, 1997] e M38-A [*Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard*, ISBN 1-56238-470-8, Pensilvânia, 2002], respectivamente.

Meio e tampão. O meio RPMI 1640 com L-glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato de sódio, suplementado com glicose a 0,2% (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA), tamponado com ácido morfolinopropano-sulfônico a 0,165 M (MOPS; ACROS ORGANICS, New Jersey, USA), pH de 7,0, foi usado no estudo.

Agentes antifúngicos. Os compostos foram inicialmente solubilizados em sulfóxido de dimetila (DMSO) em uma concentração inicial de 1600 µg/mL. Séries de diluições (1600 a 3,13 µg/mL) foram preparadas a

partir das soluções de estoque no mesmo solvente. Então, essas soluções de DMSO foram diluídas 50 vezes (primeiro, 10 vezes e, então, 5 vezes) no meio de teste. Finalmente, elas foram diluídas 2 vezes quando inoculadas, o que reduziu a concentração final de solvente para 1% (concentrações finais de agentes antifúngicos eram de 16 a 0,13 µg/mL). As soluções foram pre-

5 paradas exatamente antes de uso.

Organismos. Os organismos usados para testagem de suscetibilidade foram: *Candida albicans* ATCC 14053, *Cryptococcus humicolus* ATCC 9949, *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Fusarium oxysporum* VKM F-140 (=

10 CMI, IMI 90473). Os organismos foram armazenados sobre lâminas de ágar de dextrose de batata e em solução de glicerol a 50% a -70 °C. Para armazenamento a curto prazo, culturas de estoque foram armazenadas sobre lâminas de ágar a 4 °C. As culturas de levedos foram sub-cultivadas sobre ágar de dextrose de Sabouraud (SAB) e incubadas durante 24 horas a 35 °C

15 (*Candida albicans*) ou durante 48 horas a 25 °C (*Cryptococcus humicolus*) para obter uma cultura pura recentemente crescida. As culturas de mofo foram sub-cultivadas sobre ágar de dextrose de batata e incubadas durante 7 dias a 35 °C (*Aspergillus niger*) ou durante 2 dias a 35 °C, então, 5 dias a 25 °C (*Fusarium oxysporum*) para assegurar esporulação máxima.

20 Preparo de inóculo

Para levedos, o inóculo inicial foi preparado através de suspensão de colônias de culturas em solução salina estéril a 0,85%. A suspensão resultante foi submetida a turbilhonamento e ajustada, com um espectrofotômetro, a 530 nm para ser equivalente à turbidez de McFarland a 0,5 M (1×10^6 a 5×10^6 CFU/mL). A suspensão de levedo de estoque foi diluída a

25 1:1000 com meio para obter o inóculo de teste a duas vezes (1×10^3 a 5×10^3 CFU/mL).

Para mofo, as suspensões de estoque foram preparadas cobrindo as colônias fúngicas maduras com solução salina a 0,85% estéril e

30 raspando ligeiramente. 1% (v/v) do agente de umedecimento Tween 20 foi adicionado à solução salina para preparo do inóculo de *Aspergillus*. Finalmente, as suspensões foram submetidas a turbilhonamento durante 15 s

para decompor os grumos de células e, então, filtradas através de quatro camadas de gaze estéril. As densidades das suspensões de esporos conidiais foram medidas a 530 nm e ajustadas para 0,09 – 0,11 para *Aspergillus niger* e 0,15 - 0,17 para *Fusarium oxysporum*. Essas suspensões foram diluídas a 1:50 com o meio padrão. As diluições de inóculo a 1:50 correspondiam a 2x a densidade necessária de aproximadamente $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 CFU/mL.

A quantificação de inóculo foi realizada através de diluição em lâmina do inóculo sobre ágar de dextrose Sabouraud para determinar o número viável de CFU por mililitro.

Técnica de Microdiluição

Lâminas de microtitulação com fundo plano de 96 poços foram usadas para testagem. 100 µl inóculo diluído foram distribuídos em cada poço de microdiluição contendo 100 µl das diluições duplas de compostos. Controles isentos de fármaco e isentos de levedo/mofo foram incluídos. Bandejas de microdiluição foram incubadas a 35 °C (*Candida albicans* e mofos) ou 25 °C (*Cryptococcus humicolus*) sem agitação e observadas com relação à presença ou ausência de crescimento visível. Um escore numérico de 0 a 4 foi fornecido a cada poço usando a seguinte escala: 0 = opticamente clara ou ausência de crescimento, 1 = ligeiro crescimento (25% do controle de crescimento), 2 = redução proeminente no crescimento (50% do controle de crescimento), 3 = ligeira redução no crescimento (75% do controle de crescimento), 4 = sem redução no crescimento. Concentrações inibitórias mínimas (MICs) foram lidas a 48 horas.

As MICs para cada um dos compostos testados foram definidas como a menor concentração de agentes antifúngicos que impedem qualquer crescimento visível do organismo (escore de crescimento = 0). Para elucidar as ligeiras diferenças entre os agentes, em alguns casos, as MIC's para mofos foram adicionalmente definidas como as menores concentrações com um escore de crescimento = 1 (25% do controle de crescimento). Os resultados são mostrados na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Atividade antifúngica de compostos

Composto	MIC µg/mL*			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	<i>Cryptococcus humicolus</i> ATCC 9949	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Fusarium oxysporum</i> VKM F-140
AmB	1	1	1	4
S44HP	1	1	1	4
1	1	1	1	2
5	2	4	4	4
6	2	2	4	4
7	2	1	2	8
8	2	2	4	8
9	1	1	2	4
10	2	2	4	8
11	1	1	2	2
12	1	1	2	2
13	1	1	1	4
14	1	1	2	4
15	1	2	2	4
16	1	1	2	8
17	1	1	2	8
18	1	1	2	8
19	2	2	2	8
20	2	2	4	>16
21	2	4	4	4
22	1	1	1	1
23	4	4	8	8

*MICs são medidas como as menores concentrações de agentes que impedem qualquer crescimento visível. Os resultados dos experimentos eram reproduzíveis. Em casos de coincidência total dos dados obtidos, a MIC é

5 representada como um único número.

Os resultados mostram que os compostos da invenção têm atividade antifúngica. Mais especificamente, esses testes sugerem que uma série de derivados de nistatina têm atividade antifúngica comparável à Anfotericina B e S44HP (por exemplo, compostos nos. 1, 9, 11, 12, 13, 14 e 22).

5 Estudo de suscetibilidade antifúngica (2)

A atividade antifúngica de vários dos derivados de nistatina foi ainda investigada. O método usado no estudo (1) é o método internacionalmente aceito para testagem de atividade antifúngica, mas não é muito sensível, uma vez que ele não distingue prontamente entre compostos de atividade comparável. A atividade antifúngica de uma série dos derivados de nistatina foi, portanto, determinada em um método o qual é criado para ser mais sensível.

O organismo de teste usado para a testagem adicional da bioatividade do macrolídeo de polieno foi *Candida albicans* ATCC 10231, crescido em 120 µl de meio M19 padrão sem NaCl (com um inóculo de 1000 cfu por poço) e 30 µl de amostras de macrolídeo de polieno diluídas. Os antibióticos podem ser diluídos em MeOH em série, assegurando um espectro de concentrações, as quais proporcionaram resultados oscilando de inibição completa de crescimento a nenhuma inibição do organismo de teste. As culturas de organismo de teste com diluições de antibiótico foram incubadas em lâminas de microtitulação com 96 poços a 30 °C sem agitação e o crescimento foi medido como OD₄₉₀ após 12, 14 e 16 horas sobre um leitor para lâmina de microtitulação SpectraMax Plus. A OD foi plotada contra a concentração de antibiótico e a MIC₅₀ foi estimada a partir da curva de regressão em uma inibição de crescimento de 50%.

Os resultados são mostrados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6

Composto	MIC ₅₀ (µg/mL)
AmB	0,12
S44HP	0,12
1	0,07
9	0,13

Tabela 6 –continuação-

Composto	MIC ₅₀ (µg/mL)
11	0,12
12	0,14
15	0,20
22	0,07

Os resultados confirmam que uma série de análogos de nistatina da invenção realmente têm atividade antifúngica aprimorada comparado com a anfotericina B e S44HP.

5 Atividades antifúngicas de sais do Composto 1 (Tabela 7)

Os seguintes sais solúveis em água são testados:

COMPOSTO 1 cloridrato (53),

COMPOSTO 1 L-glutamato (29),

COMPOSTO 1 D-glutamato (54)

10 COMPOSTO 1 L-aspartato (55),

COMPOSTO 1 dicloroacetato (57)

Tabela 7

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

O Composto 1, L-glutamato (29), é o sal mais ativo do Composto 1.

Atividades antifúngicas de derivados de composto Tabelas 8 e 9)

Tabela 8

Composto 50	p-Dimetilaminobenzil-Composto 1
Composto 51	N-(L-Lisil)-Composto 1

Organismo	MIC (µg/ml)		
	Composto 50	Composto 51	Composto 1
Candida albicans ATCC 14053	2	1	1
Cryptococcus humicola ATCC 9949	2	1	1
Aspergillus niger ATCC 16404	2	1	2
Fusarium oxysporum VKM F-140	8	2	2

- Os compostos 51 é o derivado mais ativo nesta série com atividade antifúngica ligeiramente mais alta do que o antibiótico de origem.
- 5

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

Tabela 9

Estudo de toxicidade *in vitro*

A toxicidade de vários derivados de nistatina foi testada a 2 e 5 $\mu\text{g/mL}$ e a 25 μM .

- 5 Compostos foram dissolvidos em DMSO para 5 mg/mL e amostras de 0,1 mL com diferentes concentrações foram preparadas em DMSO. As amostras foram misturadas com 0,9 mL de tampão de PBS contendo sangue de cavalo a 2,5% (PBS-HB; mantida sobre gelo) e incubadas a 37 °C durante 30 min sem agitação.

- 10 As células foram peletizadas através de centrifugação a 5000 rpm durante 5 min e a hemólise foi avaliada através de medição da OD₅₄₅. A hemólise de 100% foi definida como o valor de OD₅₄₅ obtido a partir de uma suspensão de sangue de cavalo a 2,5% em água destilada.

Os resultados são mostrados nas Tabelas 10-12 abaixo.

- 15 **Tabela 10.** Hemólise de eritrócitos de sangue humano ($M \pm SE$, %) sob a ação de 2 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de antibióticos

Amostra de sangue #	Conc. $\mu\text{g/mL}$	Anf. B	S44HP	13	14	16	DMSO
1	5	30	34,6	15,5	4,8	3,1	2,2
2		29,5	39,7	14	4,5	2,9	1,7
3		31,5	50,4	14,2	5,3	3,4	1,4
MÉDIA $\pm$ SE		30,3 $\pm$ 0,6	41,6 $\pm$ 4,6	14,5 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,14	1,7 $\pm$ 0,2
1	2	4,4	12,3	3,3	2,7	2,3	
2		5,9	6,4	3,0	2,5	2,2	
3		8,0	7,5	4,9	2,5	2,6	
MÉDIA $\pm$ SE		6,1 $\pm$ 1,0	8,7 $\pm$ 1,8	3,7 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,07	2,4 $\pm$ 0,12	

Tabela 11. Hemólise de eritrócitos ($M \pm SEM$, %) sob a ação de 5 $\mu\text{g/mL}$ de antibióticos

Amostra de sangue #	Anf, B	S44HP (92%)	7	15	11	12	DMSO
1	39	73	5,8	2,8	3	5	1,4
2	38	64	5,0	2,4	3,4	4,3	2,2
3	42	56	5,0	2,7	3,3	4,0	1,5
Média $\pm$ SE	39,7 $\pm$ 1,2	64,3 $\pm$ 4,9	5,2 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,25

Tabela 12. Hemólise de eritrócitos ($M \pm SEM$, %) sob a ação de 25 μM de antibióticos

Amostra de sangue #	5	6	7	9	17	18
	2	2	0,9			
	1,8	2,4				
	2,1	3,3	1,9		4,8	5,3
	1,0	7	1,9	12,2		
	1	3,7	1,7	18,0	1,7	3,0
	1,9	4,3	1,3	16,7	1,7	3,2
			1,9	22,4	2,1	9,7
	1,3	3,2	1,0	25	0,8	1,0
				16,2	3,3	1,5
Média $\pm$ S.E.M.	1,6$\pm$0,2	3,7 $\pm$0,6	1,5 $\pm$0,17	18,4 $\pm$1,9	2,4 $\pm$0,6	3,9 $\pm$1,3
N	7	7	7	6	6	6
P	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05

- 5 Esses resultados mostram que os compostos da invenção são significativamente menos tóxicos do que S44HP ou Anfotericina B. Isso é altamente vantajoso, uma vez que os compostos da invenção podem, portanto, ser usados em maiores quantidades sem efeito adverso.

TESTAGEM IN VIVO DE COMPOSTOS 1 e 11 (e outros)

- 10 **Animais.** Camundongos machos de híbridos de primeira gera-

ção (C57Bl/6xDBA/2)F1 B6D2F1, peso de 20-22 g, recebidos da Central farm. "Kryukovo" of Russian Academies of Medical Science (RAMS) foram usados. Os animais foram mantidos em um viveiro em gaiolas plásticas (com forragem de madeira dura em condições ambientalmente controladas: 24 ± 1°C, ciclo de claro/escuro de 12/12 horas) sob uma dieta padrão de ração em pélete com acesso fácil à água de beber (*ad libitum*). Após um período de quarentena de 2 semanas, os animais saudáveis foram usados em trabalho experimental.

Agente infeccioso. *Candida albicans* (cepa 14053 ATCC) foi usada.

Agentes antifúngicos. Soluções de compostos 1 e 11 (e outros) foram preparados "ex temporae" e foram mantidos em frascos de vidro escuro para evitar o ingresso de luz. As soluções foram preparadas como segue: substâncias antibióticas secas (5 mg) foram misturadas com deoxicolato de sódio seco (4,1 mg) em um frasco de vidro estéril. 10 mL de tampão de fosfato (NaH_2PO_4 – 1,59 g; Na_2HPO_4 – 0,96 g; H_2O – a 100 mL) foram adicionados à mistura e a suspensão foi imediatamente submetida à agitação vigorosa durante 10 minutos até que suspensões homogêneas fossem formadas. As suspensões obtidas (2 mL) foram colocadas nos novos frascos de vidro estéreis, 6 mL de solução de glicose a 5 % neutra estéril foram adicionados e as soluções resultantes (0,125 mg/mL) foram usadas para administração intravenosa.

Preparados de anfotericina B e S44HP foram também preparados da mesma forma.

25 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda de compostos 1 e 11 (e outros), bem como da anfotericina B e S44HP foi determinada.

Os preparados de antibiótico foram unicamente injetados na veia caudal de camundongos dentro de 1-1,5 hora após o preparo de soluções. A velocidade de injeção não excedia a 0,5 mL por minuto. Cada antibiótico foi usado em uma faixa de doses, resultando em letalidade de 0% a 100% e um mínimo de 3 doses intermediárias. Os animais foram aleatoriamente distribu-

idos em grupos, cada um contendo 6 camundongos. MTD e LD₅₀ de doses que caracterizam a toxicidade foram calculadas com o método de "análise proibitiva" de acordo com Litchfield – Wilcoxon (J Pharmacol Exp Ther 96: 99) através do programa de análise estatística "StatPlus-3.5.0 – 2005". Os resultados são mostrados na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13. Toxicidade aguda

Composto	LD ₅₀ (mg/kg)	MTD (mg/kg)
Anfotericina B	2,8	2,01
S44HP	2,05	0,64
1	15,4	7,8
11	16,4	11,9
29	17,8	11,0
51	5,3	4,48
41	38,6	21,2
48	32,2	25,9
25	50,8	42,8
26	50,0	43,1
27	20,6	10,8
28	22,1	14,7

Atividade antifúngica *in vivo*

Os animais foram infectados intravenosamente com cultura de *Candida albicans* em uma dose de 1,0 milhões CFU/camundongo (volume de 0,1 mL). 30 minutos após infecção, os agentes antifúngicos intravenosamente introduzidos nos camundongos em várias doses em um volume de 0,2 mL (em uma taxa de 0,2 mL/30 segundos). Cada dose foi administrada diariamente durante quatro dias, incluindo o dia de infecção (0, 1, 2 e 3 dias).

Como um controle, houve um grupo de camundongos não tratados (infectados da mesma forma com *Candida albicans*). Também havia um grupo com "placebo" de animais não infectados os quais foram intravenosamente administrados (no mesmo volume que os preparados de agente antifúngico) 0,2 mL de solvente (tampão fosfatídico + glicose a 5% (1:1)).

Nenhuma atividade foi identificada sobre qualquer um dos grupos com "placebo". Também, *Candida albicans* nunca foi encontrada em

animais não infectados.

No 5º dia de experimento, os camundongos foram pesados e sofreram eutanásia (mortos) através de deslocamento cervical. Então, em condições estéreis, a carga de *Candida albicans* de cada camundongo foi determinada através de contagem de homogenatos viáveis dos rins. Os rins foram removidos assepticamente e pesados, então, colocados em pilares de porcelana com coríndon estéril. Diluições de suspensões resultantes foram preparadas e colocadas sobre discos de Petri com ágar Saburo, incubadas durante 24 horas em uma temperatura de 35 °C. As colônias desenvolvidas de *Candida albicans* foram, então, contadas e sua quantidade calculada com base em 1 g de tecido renal.

Análise estatística foi realizada com o Microsoft Office Excel 2003. Distinções significativas tinham $P \geq 0,05$ em comparação com o t-critério de Student.

Os resultados são mostrados na Tabela 14 abaixo e na figura 9.

Tabela 14.

	Dose			
Composto	5 mg/kg×4/24	2,5 mg/kg×4/24	0,8 mg/kg×4/24	0,08 mg/kg×4/24
Número de colônias				
não trata- das	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
	$5,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$
	$4,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$
Anf B	-	$2,8 \times 10^2$	4×10^3	$3,4 \times 10^4$
	-	$1,0 \times 10^3$	2×10^3	$1,8 \times 10^4$
	-	$2,2 \times 10^2$	6×10^3	$2,6 \times 10^4$
1	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$2,5 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$
	0	$1,0 \times 10^1$	$1,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$
	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$
11	0	$<10^1$	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$
	0	$1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$
	$<10^1$	$1,0 \times 10^1$	$2,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$

S44HP	Dose de S44HP			
	0,6 mg/kg X 4/24	0,3 mg/kg X 4/24	0,15 mg/kg X 4/24	0,08 mg/kg X 4/24
	Número de colônias			
	2,5 × 10 ³	2,7 × 10 ³	8,0 × 10 ³	2,7 × 10 ⁴
	8,8 × 10 ³	9,4 × 10 ³	6,4 × 10 ³	8,0 × 10 ⁴
	1,2 × 10 ³	1,3 × 10 ⁴	1,6 × 10 ⁴	8,2 × 10 ⁴

Estudo de atividade específica de Compostos 29, 51, 41, 48 sobre o modelo da sepsia por candidíase de camundongos

Animais. Em experimentos usando camundongos fêmeas de híbridos de primeira geração (C57Bl/6xDBA/2)F1 (B6D2F1), peso de 18-20 g., recebidos da Central farm "Kryukovo" of Russian Academies of Medical Science (RAMS). Animais foram mantidos no viveiro do Instituto em gaiolas plásticas (com forragem de madeira dura em uma sala ambientalmente controlada: 24 ± 1°C, ciclo de 12/12 horas de claro/escuro) sobre uma dieta padrão de ração em pélete com acesso fácil à água de beber (*ad libitum*). Após 2 semanas de quarentena, os animais saudáveis foram usados no trabalho experimental.

Como o agente infeccioso, foi usado *Candida albicans* (cepa 14053 ATCC). Os preparados testados foram os Compostos 29, 51, 41, 48. Um preparado de comparação foi anfotericina B (puro). Soluções de preparados foram testadas *ex tempore* através da técnica especificada pelo fabricante.

Configuração do experimento

Os animais foram alojados em 3 camundongos e infectados intravenosamente com cultura de *Candida albicans* em uma dose de 1,0 milhão de CFU/camundongo em um volume de 0,1 ml. É necessário notar que a *Candida albicans* permaneceu constante em todos os experimentos. Em 30 minutos após infecção, aos camundongos foi realizada a primeira introdução intravenosa de preparados testados em doses correspondentes em um volume de 0,2 ml (com uma velocidade de 0,2 ml/30 segundos).

O experimento foi planejado de uma maneira tal que, em cada experimento, uma dose (para anfotericina B e para os preparados testados),

cada dose fornecida diariamente dentro de quatro dias, a partir do dia de infecção (0, 1, 2 e 3 dias). Em cada experimento, havia um grupo de animais não tratados, infectados com *Candida albicans*. Também havia um grupo de animais intactos, com "placebo" (não infectados), aos quais foram intravenosamente injetados (no mesmo volume conforme os preparados médicos) 0,2 ml de solvente - tampão de fosfato + glicose a 5% (1:1). Dados sobre a atividade do "placebo" não mostram qualquer atividade. *Candida albicans* nunca foi encontrada em animais não infectados.

No 5º dia de experimento pós-estímulo, os camundongos foram pesados e sacrificados (mortos) através de deslocamento cervical. Então, em condições estéreis, as cargas de *Candida albicans* foram determinadas através de contagem viável de homogenatos a partir dos rins. Os rins, os quais foram removidos assepticamente e pesados, colocados em pilões de porcelana com coríndon estéril, diluições das suspensões recebidas feitas e colocadas sobre discos de Petri com ágar Saburo, incubadas durante 48 horas em uma temperatura de 35°C, então, contadas até que colônias de *Candida albicans* se desenvolvessem e sua quantidade re-calculada sobre 1 g de tecido renal. A primeira diluição foi de 10^{-1} . Um resultado zero nesse cultivo foi aceito para 5 CFU/g.

Para o critério básico de uma avaliação dos preparados investigados, o efeito máximo da Anfotericina B foi aceito (dose eficaz, ED).

Processamento estatístico foi realizado com o auxílio do programa de computador Microsoft Office Excel 2003 para distinções significativas aceitas da média em $P \leq 0,05$ em comparação através do t-critério de Student.

Os resultados recebidos são apresentados na Tabela 15. A anfotericina B mostrou atividade máxima, na maior de suas doses estudadas (1,25 mg/kg/d, $\approx 62\%$ a partir da MTD).

Tabela 15

Atividade dos Compostos 29, 51, 41, 48 em comparação com Anfotericina B (pura) sobre o modelo de sepsia por candidíase em camundongos

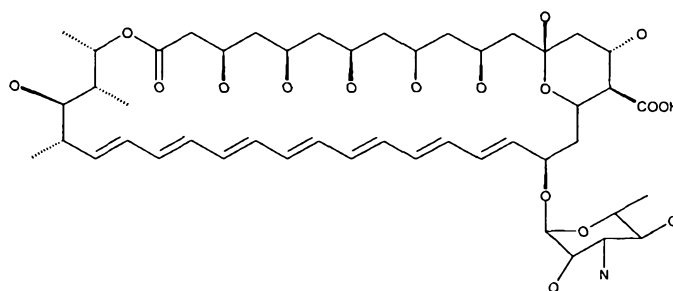
		Dose mg/kg/d:								
	n	0	0,08	0,16	0,31	0,62	1,25	2.5	5	10
fár-maco										
Não trata-do	24	99042±15255								
AMF	3		105000±48563	85667±9770	34667±12914	10667±4807	1667±441*			
29	3			102667±58769		12500±6614*	2557±1281*	133±33*	5±1*	
51	3		56667±22040		22667±3844*	17833±9011*	9400±6416*	5±1*		
41	3			67000±8622		22667±2906*	2767±1974*	1667±1167*		5±1*
48	3			51667±25221		3233±888*	1487±417*	63±19*		5±1*

Notas: * diferença significativa dos Dadosaq/não tratados apresentada como a média ± erro padrão. n – número de camundongos

Síntese de outros compostos baseado em manipulação genética

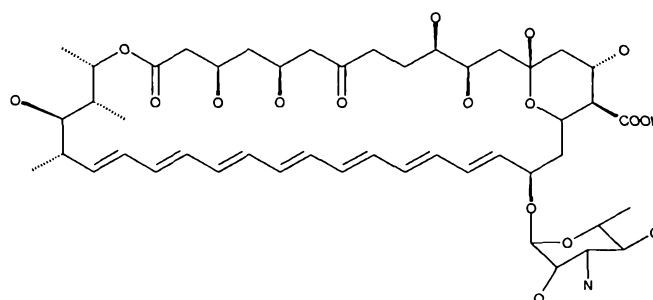
- Várias outras estruturas de parte principal manipuláveis foram preparadas. Usando a química acima, vários grupos funcionais diferentes podem ser presos aos grupos COOH e amina livres. Essas estruturas básicas formam todos os outros compostos preferidos da invenção (os átomos de H não são mostrados).

B1



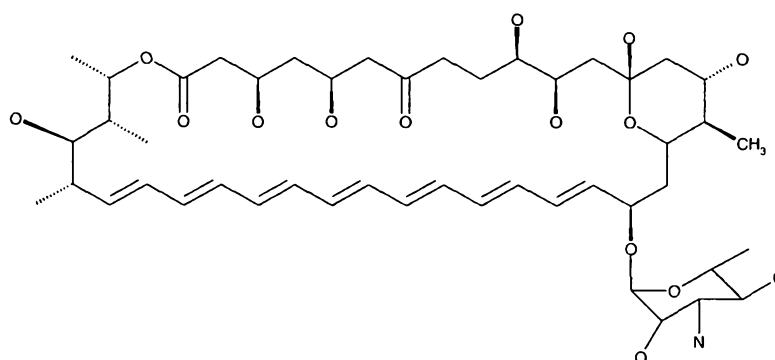
Inativação dos domínios ER5 e DH15 em PKS de nistatina, sem hidroxilação em C-10.

B2



Inativação dos domínios ER5 e KR16 em PKS de nistatina.

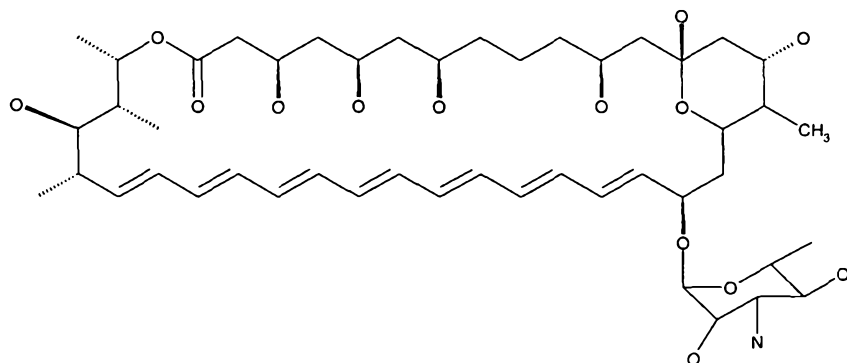
B3



Inativação dos domínios ER5, DH15 em PKS de nistatina e mo-

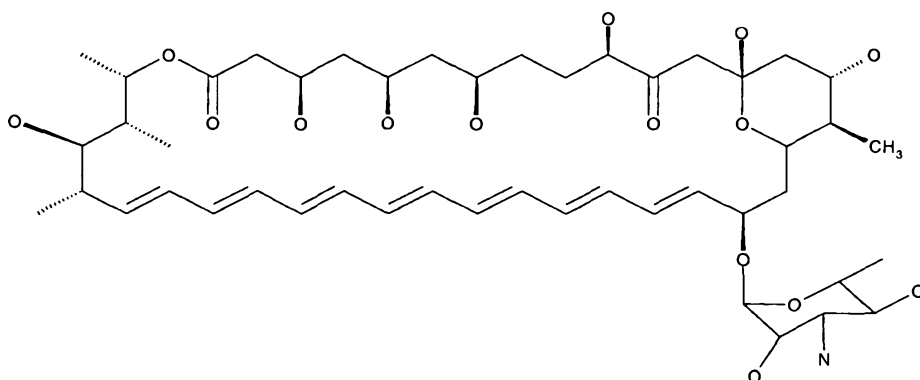
no-oxigenase de NysN, sem hidroxilação em C-10.

B4



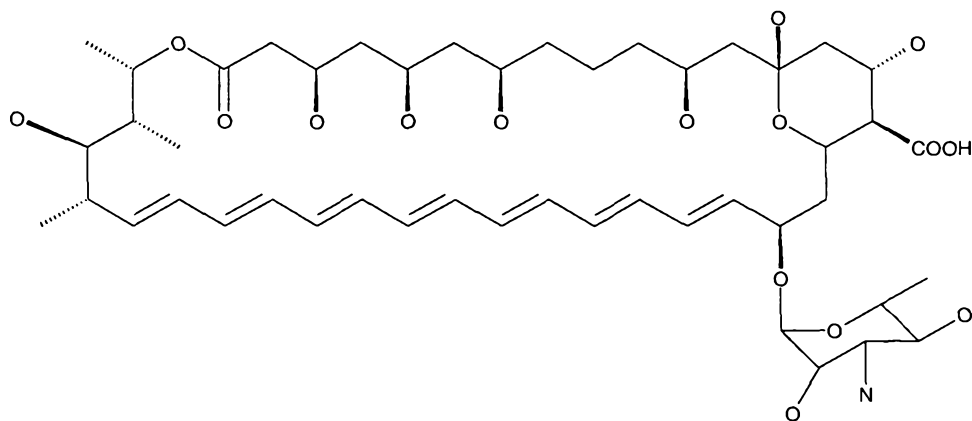
Inativação do domínio ER5 em PKS e NysN de nistatina e mono-oxigenase de NysLs

5 **B5**

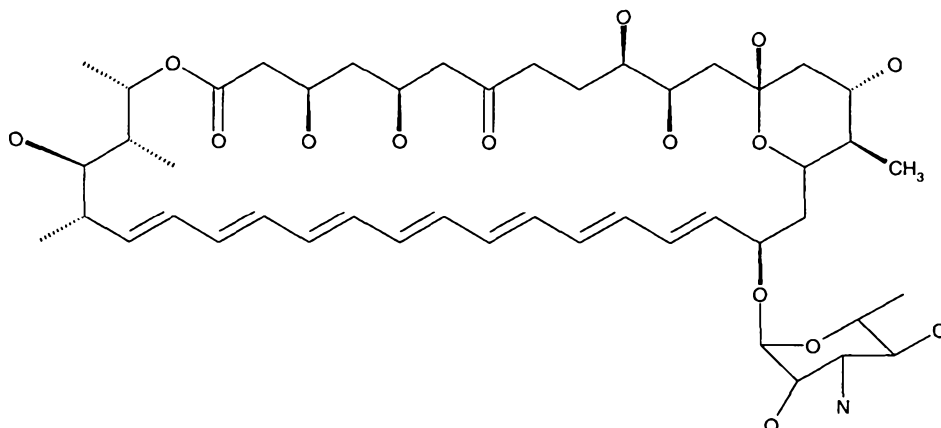


Inativação dos domínios ER5 e KR14 em PKS de nistatina e mono-oxigenase de NysN.

B6



Inativação do domínio ER5 em PKS de nistatina e mono-oxigenase de NysL.

B7

Inativação dos domínios ER5 e KR16 em PKS de nistatina e mono-oxigenase de NysN.

Construção do mutante B2

5 Construção do vetor de substituição gênica para inativação de KR16

Todo o inserto de 14 kb do fago recombinante N20 (Brautaset e outros, 2000) foi excisado através do XbaI e clonado no plasmídeo pGEM-3zf, proporcionando o pL20X. A partir desse plasmídeo, o fragmento BamHI de 3,7 kb foi excisado e ligado no pGEM-3zf, resultando no plasmídeo pGEMB3.7. Um fragmento de DNA de 0,8 kb (incluindo o resíduo Y3404 do sítio ativo KR16) foi, então, amplificado por PCR a partir do pGEMB3.7 usando os seguintes iniciadores:

KR16-F1: 5'-ttttctgCAGCCGACCGGCACCGTCC-3' (sentido), e

KR16-1R: 5'-ttttaaGCTTCCTGGACCGCGCGGG-3' (antissentido)

15 O produto de PCR foi terminalmente digerido com PstI e HindIII (novos sítios de reconhecimento sublinhados nos dois iniciadores de PCR) e clonado nos sítios correspondentes do pLITMUS28, proporcionando o pLIT-PH0.8. O último plasmídeo serviu como um *modelo* para mutagênese sítio-dirigida do sítio ativo KR16 usando os seguintes oligonucleotídeos mutagênicos:

mutKR16-1F:

5'-CCCCGCCAGGCCGGCTTCGAAGCCGCCAACGCGGTCC-3' (sentido)

mutKR16-1R:

5'-GGACCGCGTTGGCGGC~~TCGA~~AAGCCGGCCTGGCCGGGG-3' (antissentido)

Nucleotídeos com mutação são mostrados em negrito e o novo sítio de restrição BstBI introduzido está sublinhado. Usando esses dois oligonucleotídeos, a Tyr do sítio ativo KR16 é substituída por Phe e, simultaneamente, a próxima Ala a jusante é substituída por Glu, proporcionando a mutação dupla YA3404FE. Um plasmídeo com a mutação correta foi identificado através de digestão com BstBI e todo o clone inserido foi sequenciado para rastrear quaisquer outras mutações indesejadas. A partir do plasmídeo com mutação correta, o fragmento Bpu102I/Bpu10I de 627 bp foi excisado e usado para substituir o fragmento correspondente do plasmídeo pGEMB3.7, proporcionando o plasmídeo pGEMB3.7m. A partir do último plasmídeo, todo o inserto de 3,7 kb foi excisado com EcoRI/HindIII e ligado junto com a parte principal EcoRI/HindIII de 3,1 kb do pSOK201, proporcionando o vetor de substituição gênica pKR16m.

Substituição gênica

O último vetor foi introduzido no mutante GG5073SP *nysA*-deficiente de *S. noursei* (Borgos e outros, 2006) através de recombinante homóloga dupla. A mutação KR16 cromossômica correta foi verificada usando PCR + digestão com BstBI, bem como Southern blot, antes da produção de polieno ser restaurada através de introdução do gene *nysA in trans*, conforme descrito em alguma parte aqui (Brautaset e outros, 2003). O mutante resultante foi designado B2.

Construção do mutante B7

O plasmídeo pKOnysN-CL346AS (veja PNAS-manus) foi introduzido no B2 *nysA*-deficiente através de recombinação homóloga dupla. A mutação *nysN* cromossômica correta foi verificada usando PCR e digestão com NheI, bem como Southern blot, antes da produção de polieno ser restaurada através de introdução do gene *nysA in trans*, conforme descrito em alguma parte aqui (Brautaset e outros, 2003). O mutante resultante foi designado B7.

Construção do mutante B5

Construção do vetor de substituição gênica para inativação de KR14

O fragmento BclI/EcoRI de 4,0 kb do plasmídeo pL20X (veja es-

estratégia B2, acima) foi excisado e ligado no pGEM-3zf digerido com BamHI/EcoRI, proporcionando o pBE4.0. Um fragmento de 1 kb foi amplificado por PCR a partir do último plasmídeo usando os seguintes iniciadores:

KR14-F1: 5'- TTCGGCGGCGTAATCTCC-3' (sentido) e

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

O fragmento de PCR foi digerido com SacI e HindIII (novo sítio de reconhecimento está sublinhado no iniciador) e ligado no pLITMUS28, proporcionando o pLITHS1.0 e o último plasmídeo foi usado como um *modelo* para mutagênese sítio dirigida do sítio ativo KR14 usando os seguintes oligonucleotídeos mutagênicos:

KR14-mut1:

5'-CCCGGGCCAGGCCAACTTCGAAGCTGCCAACGCCGTCCTG-3' (sentido),

KR14-mut2:

5'-CAGGACGGCGTTGGCAGCTTCGAAGTTGGCCTGGCCCGGG-3' (antissentido)

15 Nucleotídeos com mutação são mostrados em negrito e o novo sítio de reconhecimento BstBI introduzido está sublinhado. Usando esses dois oligonucleotídeos, a Tyr do sítio ativo KR14 é substituída por Phe e, simultaneamente, a próxima Ala a jusante é substituída por Glu, proporcionando a mutação dupla YA9197FE. Um plasmídeo com a mutação correta
20 foi identificada através de digestão com BstBI e o inserto todo clonado foi sequenciado para rastrear quaisquer outras mutações indesejadas. A partir do plasmídeo com mutação correta, o fragmento FseI/AscI de 0,7 kb foi excisado e usado para substituir o fragmento correspondente do plasmídeo pBE4.0, proporcionando o pBE4.0mut. A partir do último plasmídeo, todo o
25 inserto de 4,0 kb foi excisado com EcoRI/HindIII e ligado junto com a parte principal EcoRI/HindIII de 3,1 kb do pSOK201, proporcionando o vetor de substituição gênica pKR14m.

Substituições gênicas

30 O último vetor foi introduzido no mutante de *S. noursei* nysA-deficiente GG5073SP (Borgos e outros, 2006) através de recombinante homóloga dupla. A mutação KR14 cromossômica correta foi verificada usando PCR + digestão com BstBI, bem como Southern blot, antes da produção de

polieno ser restaurada através de introdução do gene *nysA in trans*, conforme descrito aqui em alguma parte (Brautaset e outros, 2003). O mutante resultante foi designado BSG015.

Em seguida, o vetor de inativação de *nysN* pKOnysN-CL346AS (veja PNAS-manus) foi introduzido em BSG015*nysA*-deficiente através de recombinação homóloga dupla. A mutação *nysN* cromossômica correta foi verificada usando PCR e digestão com *NheI*, bem como Southern blot, antes que a produção de polieno fosse restaurada através de introdução do gene *nysA in trans*, conforme descrito aqui em alguma parte (Brautaset e outros, 2003). O mutante resultante foi designado B5.

Construção do mutante B4

Construção do vetor de substituição gênica para inativação de *nysL*

O plasmídeo com deleção em-rede por substituição do gene *nysL* pNLD1 foi descrito (Volkhan e outros, 2006) e o inserto clonado de 4,2 kb desse plasmídeo inclui regiões da região de codificação *nysN* de *S. noursei*. De forma a introduzir a mutação *nysL* em uma base mutante *nysN*-CL346ST, nós tivemos de modificar esse plasmídeo para incluir essa mutação *nysN* também. Isso foi feito como segue: o fragmento *Agel*/*Fsp* de 1011 bp do plasmídeo pSOK201*nysN*4.1-CL346ST (veja pedido de patente da Biosergen, Maio de 2007) foi excisado e usado para substituir o fragmento correspondente do plasmídeo pNLD1, proporcionando o plasmídeo de substituição gênica pNLD2.

Substituição gênica

O plasmídeo pNLD2 foi introduzido no Composto 1 *nysA*-deficiente através de recombinante homóloga dupla. A mutação *nysL* cromossômica correta foi verificada usando PCR e digestão com *NheI*, bem como Southern blot, antes da produção de polieno ser restaurada através de introdução do gene *nysA in trans*, conforme descrito aqui em alguma parte (Brautaset e outros, 2003). O mutante resultante foi designado B4.

B1 e B3

Inativação do sítio ativo DH15 His966 de *NysJ*:

Objetivo: Introduzir uma mutação sítio-específica no sítio ativo

DH15 de *nysJ*, levando à mutação por substituição H966F no domínio DH15

Procedimento:

- Digerir pL20X com BclI + SphI e clonar o fragmento de 3,33 kb no pGEM11-zf digerido com BamHI/SphI = **pDH15-A**

5 - Digerir pDH15-A com EcoRI+HindIII e clonar o fragmento de 3,34 kb nos sítios correspondentes do pGEM3-zf = **pDH15-B**

- Realizar mutagênese sítio-dirigida usando o *modelo* pDH15-B e com os seguintes oligonucleotídeos mutagênicos:

Mut-DH15-1:

10 5'- CACCCCTGGCTCGCCGACT**TTC**GTCGTCGGCGGCATGGTC -3'

Mut-DH15-2:

5'- GACCATGCCGCCGACGAC**GAA**GTCGGCGAGCCAGGGGTG -3'

- Nucleotídeos com mutação são indicados em negrito. A mutação destrói o sítio BtrI natural nessa posição.

15 - Verificar a mutação correta através de digestão com BtrI e sequenciamento de DNA = **pDH15-Bmut**.

- Isolar o fragmento-1 EcoRI/SacI de 1,6 kb do pDH15-B; O fragmento-2 HindIII/BglII de 1,1 kb do pDH15-B e o fragmento-3 SacI/BglII do pDH15-Bmut e ligar todos os três fragmentos juntos com a parte principal Eco-

20 RI/HindIII do pSOK201 de 3,1 kb; **pDH15-123**

- Prosseguir com a substituição gênica em *S. noursei*.

- Verificações de mutações DH15 de *S. noursei* corretas

- Mutantes do 1º cruzamento podem ser verificados através de Southern blot após digestão com NotI do DNA total e usando o inserto de 3,33 kb rotulado de pDH15-A como uma sonda. O tipo silvestre proporcionará sinais de 5,2 + 8 kb, enquanto que o mutante do 1º cruzamento correto (ambas variantes teóricas) proporcionará sinais de 5,2 + 6,4 + 8 kb.

25

- Mutantes do 2º cruzamento podem ser analisados através de PCR usando os seguintes iniciadores:

30 ○ **DH15-F:** 5' – CCTTCCTCGAACTCGGCC – 3'

○ **DH15-R:** 5' – GCGTAGATCTCGGTGTCG – 3'

- o que proporcionará o produto de 817 bp. O produto de PCR da cepa pre-

cursora pode ser digerido com BtrI, proporcionando fragmentos de 392 bp e 425 bp, enquanto que o produto de PCR do mutante não pode ser cortado com BtrI. Adicionalmente, o 2º mutante pode também ser verificado através de Southern blot usando o produto de PCR de 817 bp rotulado como uma
5 sonda. O DNA da cepa precursora, digerido com BtrI, proporcionará o fragmento de hibridização de 0,95 kb + 0,45 kb, enquanto que o DNA BtrI-digerido do mutante proporcionará o fragmento de hibridização de 1,4 kb.

Construção do mutante B1

A mutação DH15 foi introduzida na cepa GG5073SP nysA-deficiente e o mutante correto foi, então, complementado com o gene nysA
10 *in trans*.

Construção de mutantes B3

A mutação nysN-CL346ST foi introduzida na base genética B1-S1 nysA-deficiente e a cepa com mutação correta foi complementada com o
15 gene nysA *in trans*, proporcionando o mutante B3-1S.

Eficácia *in vivo* da anfotericina B e novos análogos de S44HP em um modelo de camundongo neutropênico de candidíase disseminada

Os camundongos foram tornados neutropênicos através de injeção com mono-hidrato de ciclofosfamida (Fluka, BioChemika, Sigma-Aldrich,
20 Suíça) intraperitonealmente a 2 x 100 mg/kg de peso corporal 1 dia antes de infecção.

Infecção disseminada com *Candida albicans* foi obtida através de injeção de 3×10^5 CFU/ml de inóculo via a veia caudal lateral de camundongos neutropênicos 2 h antes do início da terapia com antibiótico. A eficácia de antibióticos na eliminação de infecção por *C. albicans* foi avaliada a-
25 través de avaliação da carga fúngica em rins durante tratamento de 4 dias (1 dose por dia). Os resultados são apresentados na figura 17.

Anfotericina B foi administrada na maior dose de 2 mg/kg (exatamente abaixo da MTD).

30 Esses resultados mostram claramente que o composto 28 e composto 29 são consideravelmente melhores do que a anfotericina B, uma vez que:

1) Eles mostram uma toxicidade aguda aproximadamente 5-7 vezes menor;

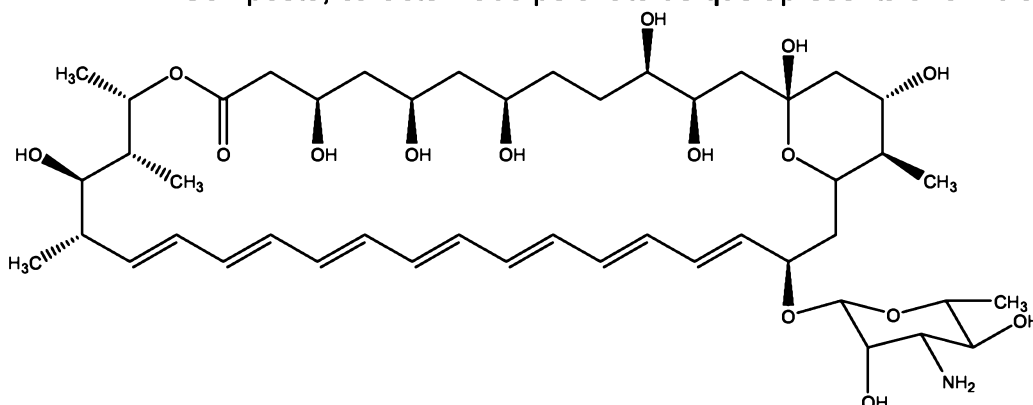
2) Eles demonstram eficácia 5-10 vezes menor no tratamento de candidíase disseminada no modelo de camundongo neutropênico;

5 3) Eles são solúveis em glicose a 5% (> 10 mg/ml), enquanto que a solubilidade da anfotericina B é < 1 mg/ml.

Embora o composto 25 e composto 26 sejam menos ativos do que a anfotericina B no modelo de camundongo neutropênico de candidíase, eles mostram toxicidade aguda muito menor (aproximadamente 20 vezes
10 menor do que a anfotericina B) e, portanto, ainda são considerados candidatos interessantes.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula:



ou um sal farmacologicamente aceitável deste.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que está na forma de um sal que é formado com um ácido orgânico ou inorgânico fisiologicamente aceitável que é ácido acético, aspártico, benzenossulfônico, benzoico, bicarbônico, bissulfúrico, bitartárico, butírico, edetato de cálcio, cansilaico, carbônico, clorobenzoico, cítrico, edético, edisilaico, estólico, esila, esilaico, fórmico, fumárico, glucéptico, glucônico, glutâmico, glicolilarsanílico, hexâmico, hexil-resorcinóico, hidrabâmico, bromídrico, clorídrico, iodídrico, hidroxinaftóico, isetiônico, láctico, lactobiônico, maleico, málico, malônico, mandélico, metanossulfônico, metilnítrico, metil-sulfúrico, mícico, mucônico, napsilaico, nítrico, oxálico, p-nitrometano-sulfônico, pamoico, pantotênico, fosfórico, monohidrogeno fosfórico, di-hidrogeno fosfórico, ftálico, poligalacturônico, propiônico, salicílico, esteárico, succínico, sulfâmico, sulfanílico, sulfônico, sulfúrico, tânico, tartárico, teóclico ou toluenosulfônico.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que está na forma de um sal que é formado com uma base que é uma amina primária, secundária ou terciária, uma amina substituída, uma amina cíclica, arginina, betaína, cafeína, colina, N,N-dibenziletlenodiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilenodiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glicosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, uma resina de poliamina, procaína, uma purina, teobromo, trietilamina, trime-

tilamina ou tripropilamina.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que está na forma de um sal de glutamato.

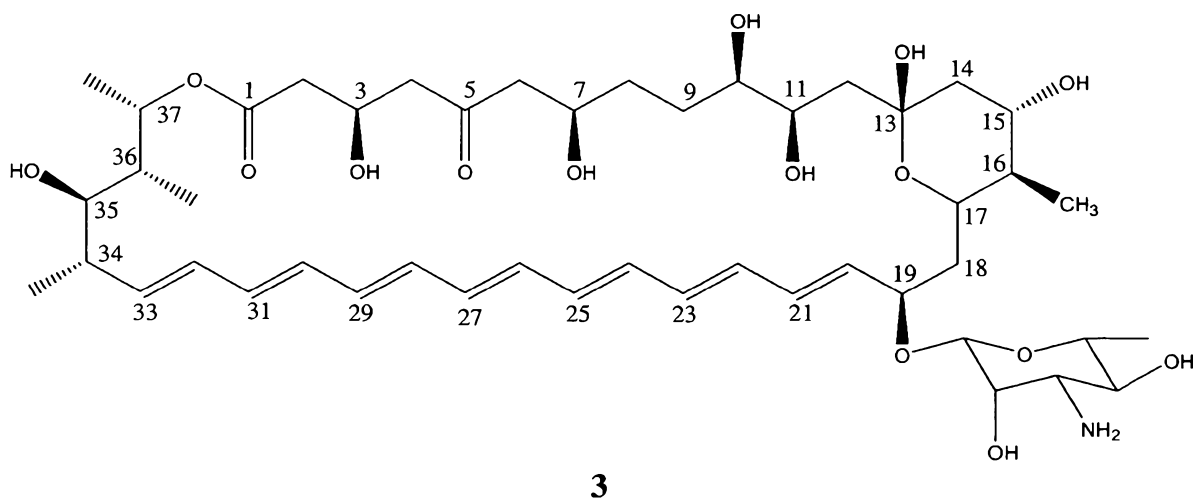
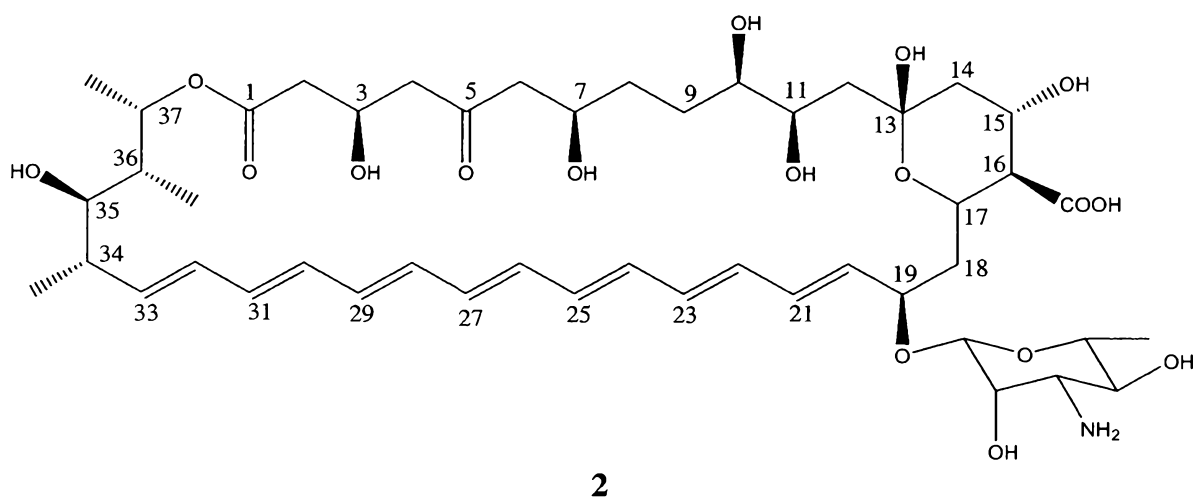
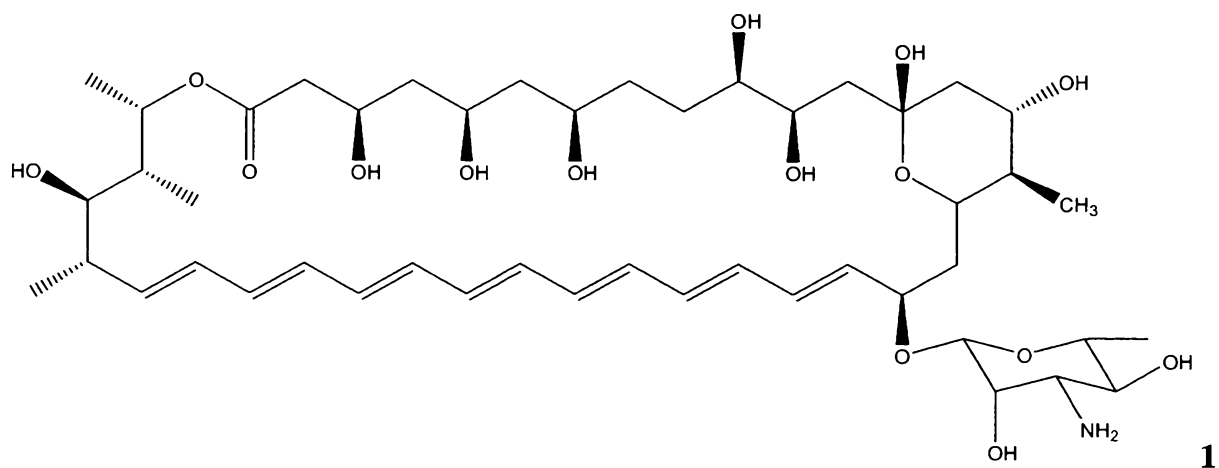
5 5. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um veículo, diluente ou excipiente.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que é um produto farmacêutico.

10 7. Uso do composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma composição para o tratamento de infecções fúngicas.

8. Uso, do composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser como um desinfetante ou como um conservante.

1/15



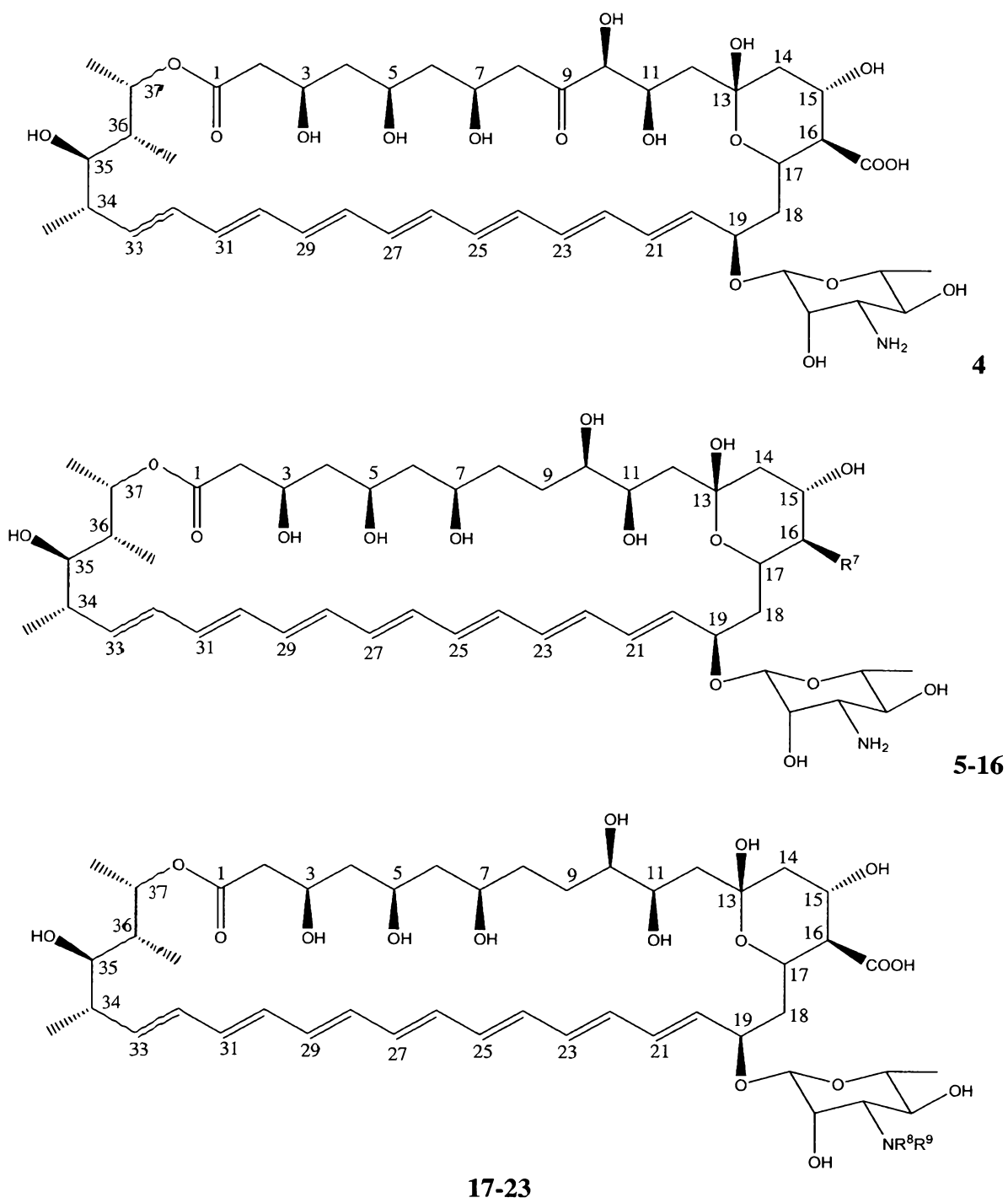
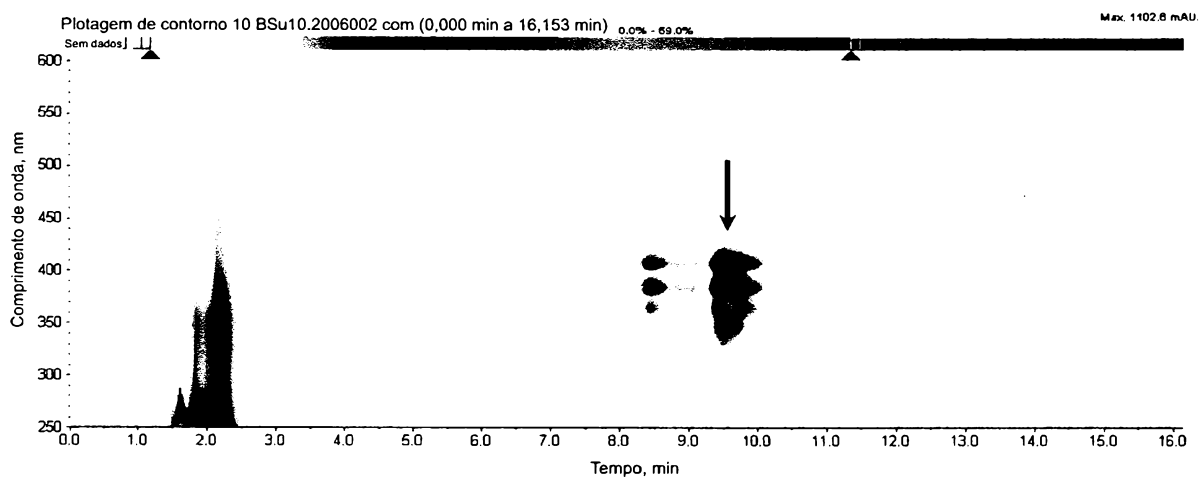
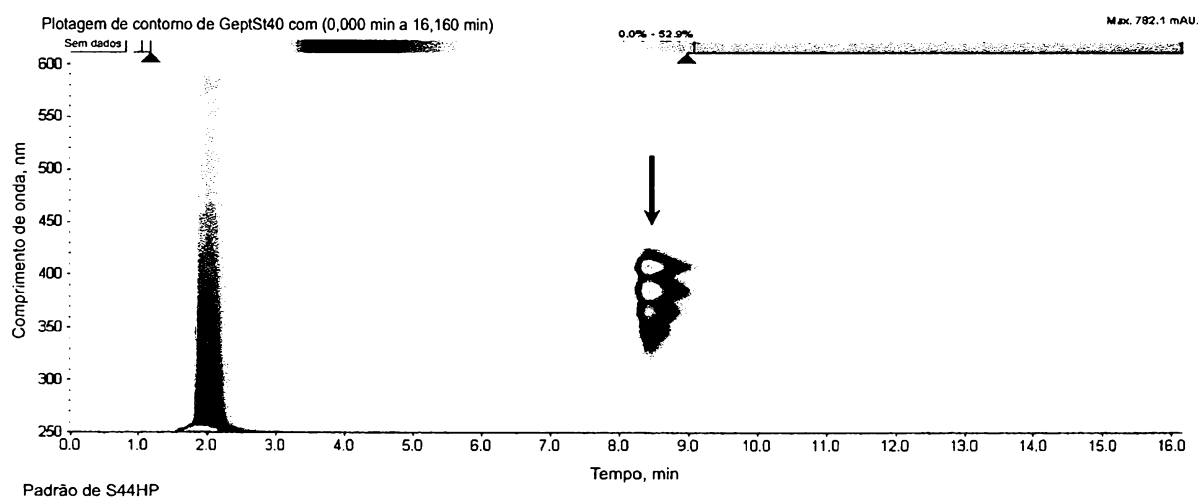


FIG. 1

FIG 2.



Composto1

FIG 3

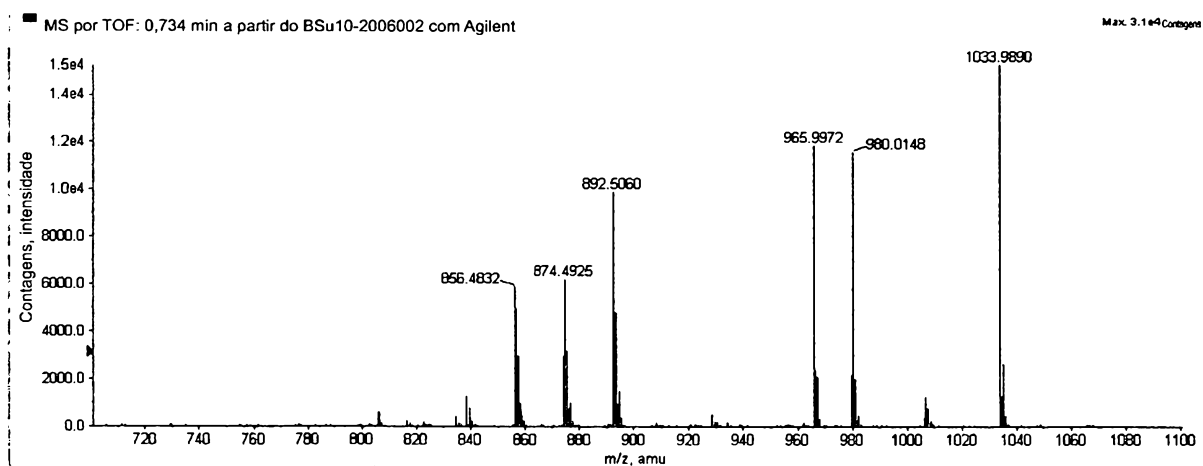


FIG 4

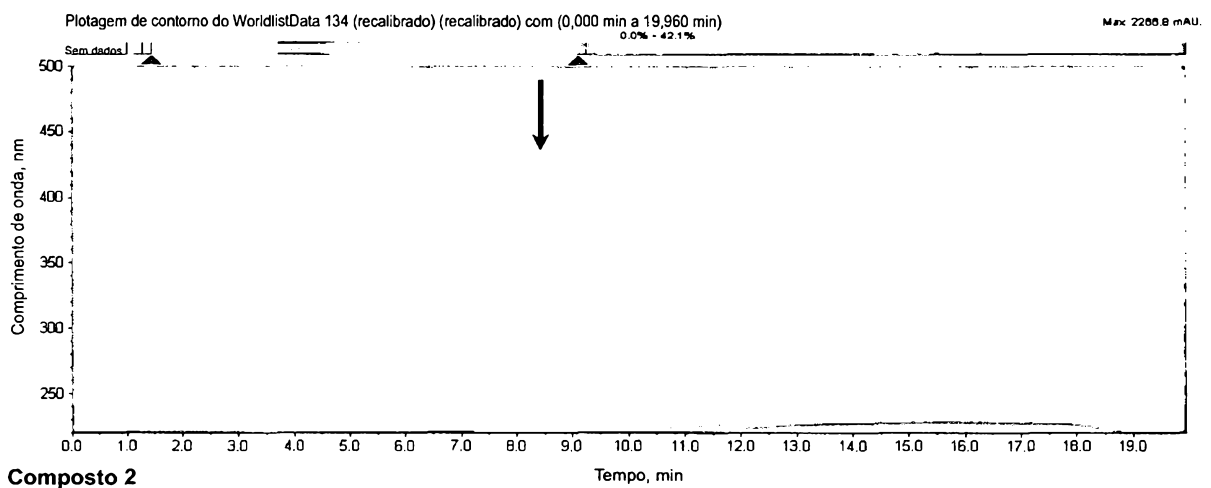
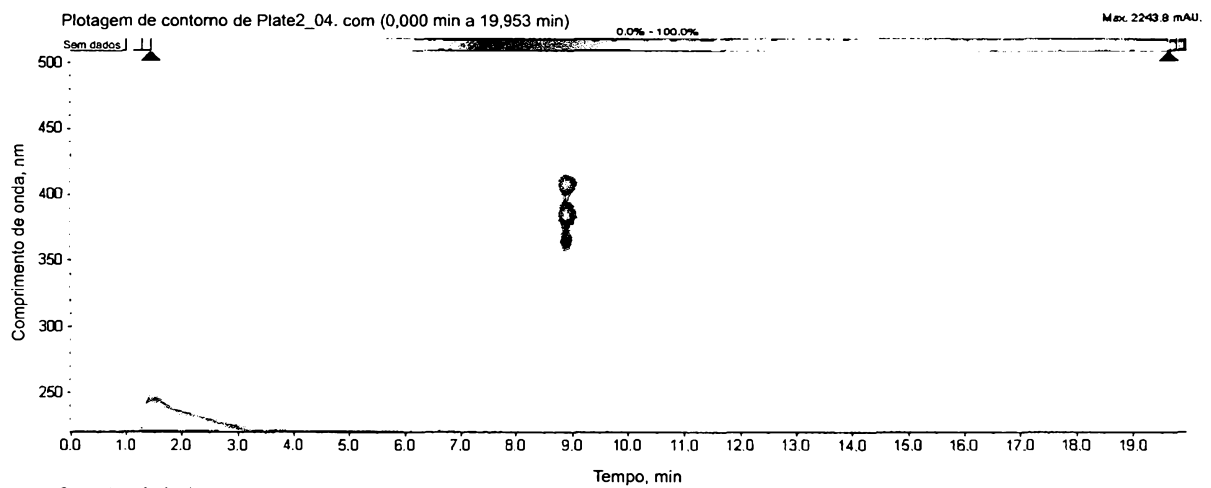


FIG 5

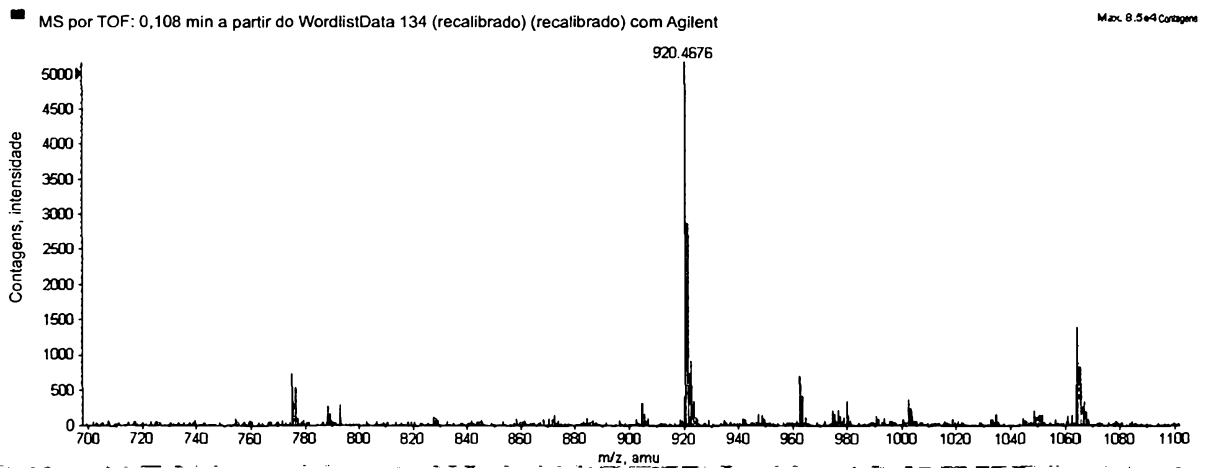
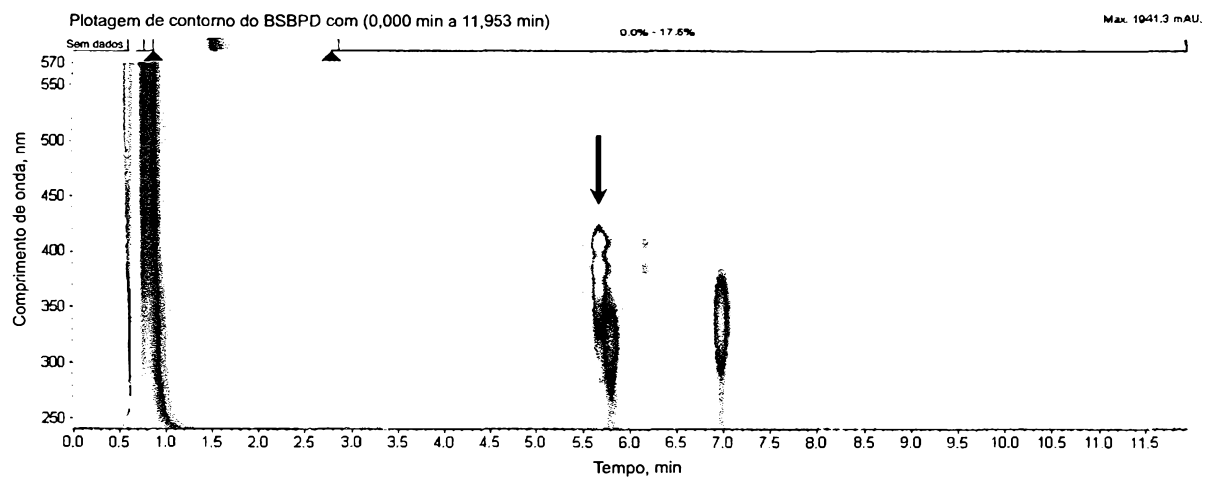
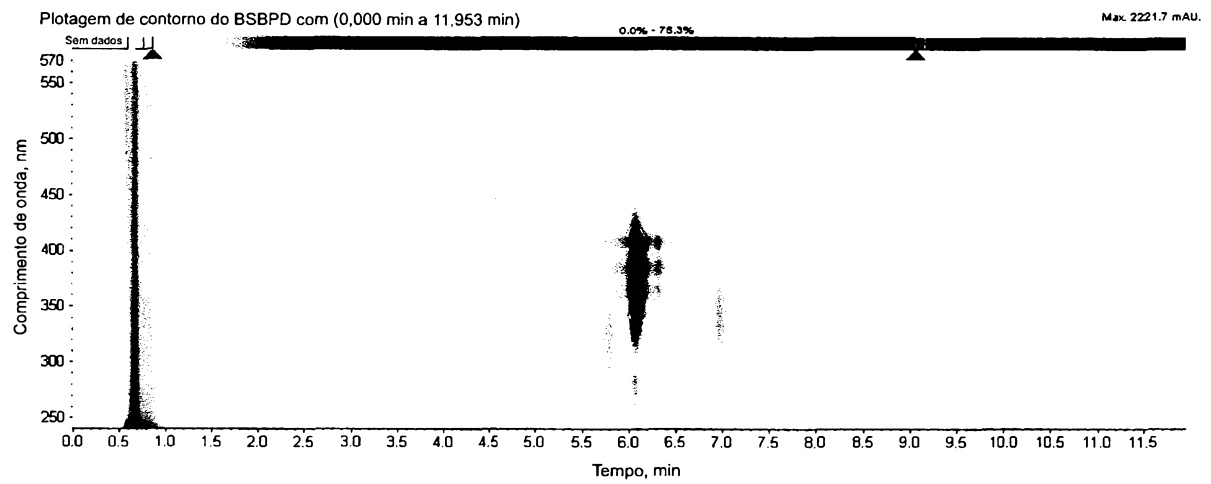


FIG 6



Composto 3

FIG 7

■ MS por TOF: 5,700 min a partir do BSBP73 com Agilent

Max. 4,1e4 Contagens

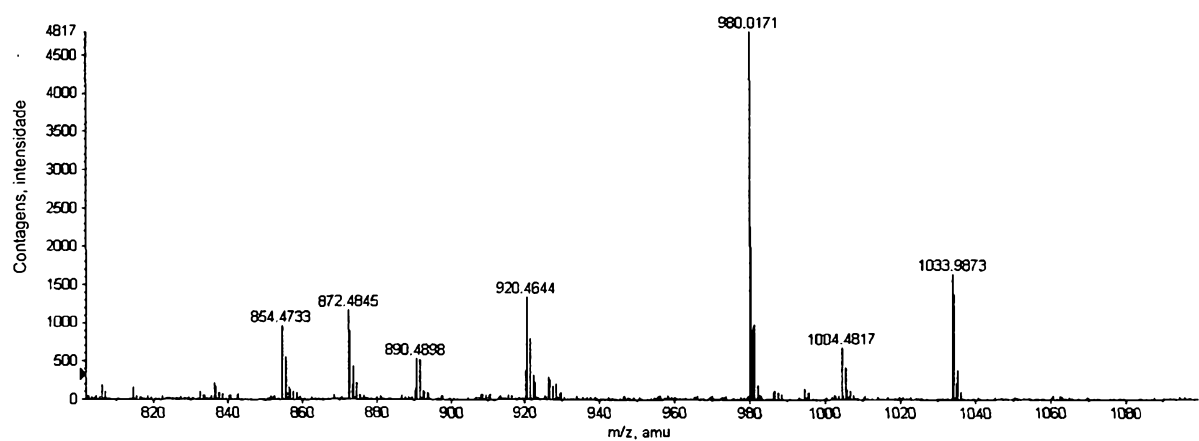
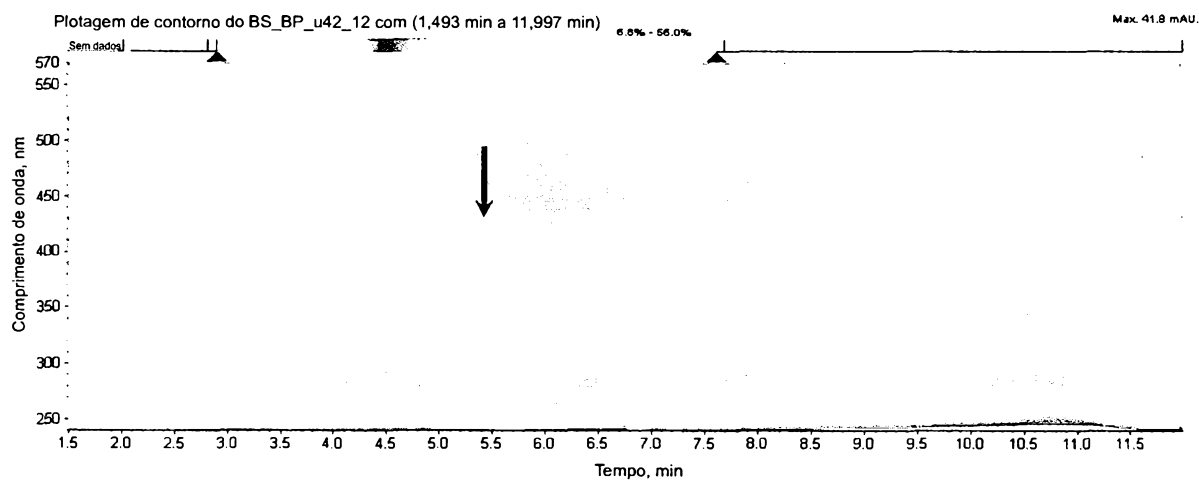
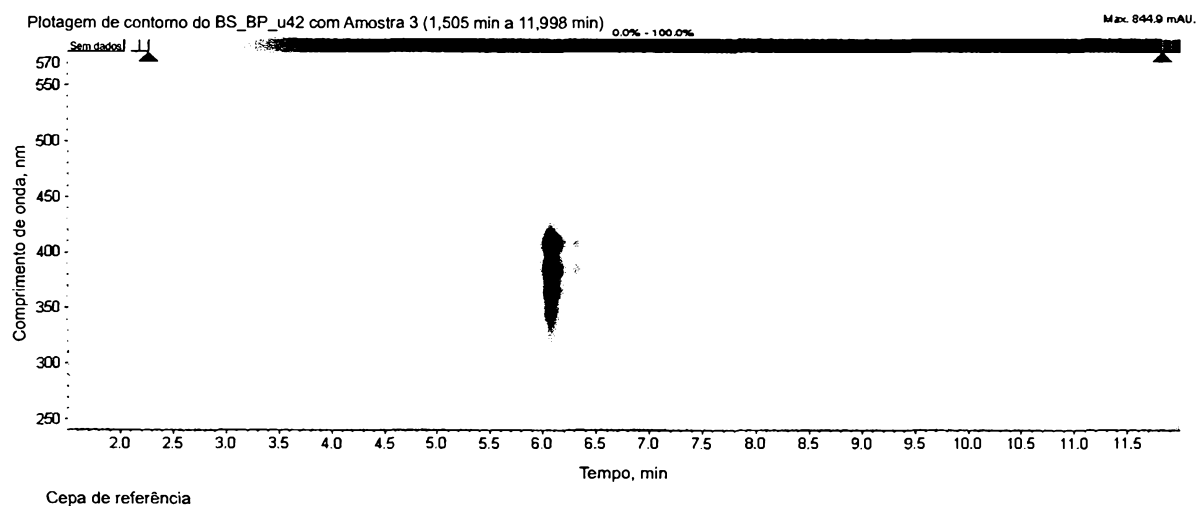


FIG 8



Composto 4

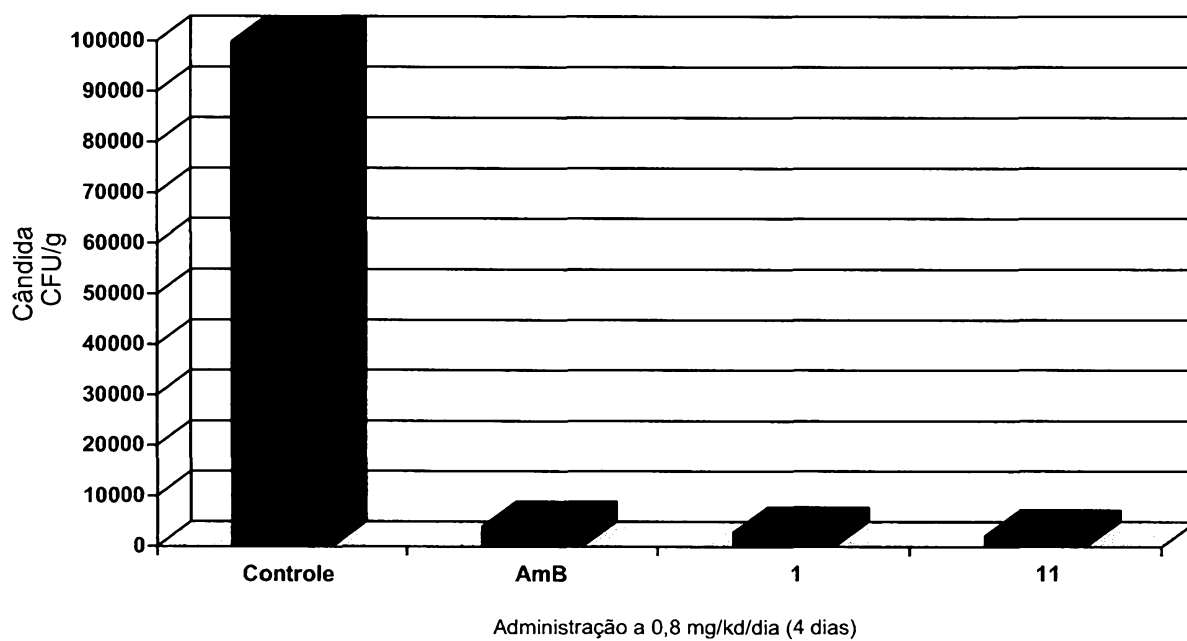
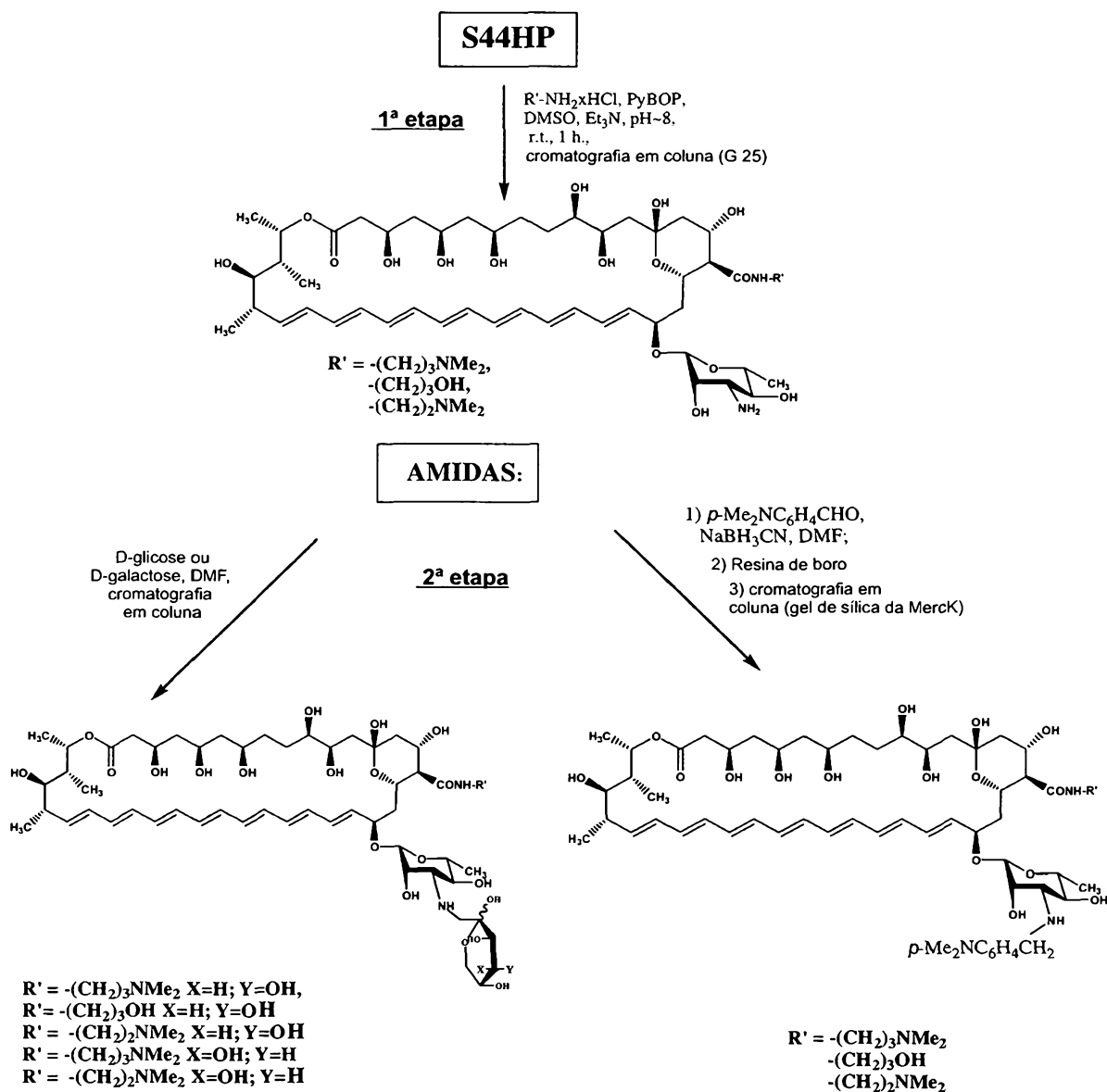
FIG. 9

FIG. 10 Esquema 1

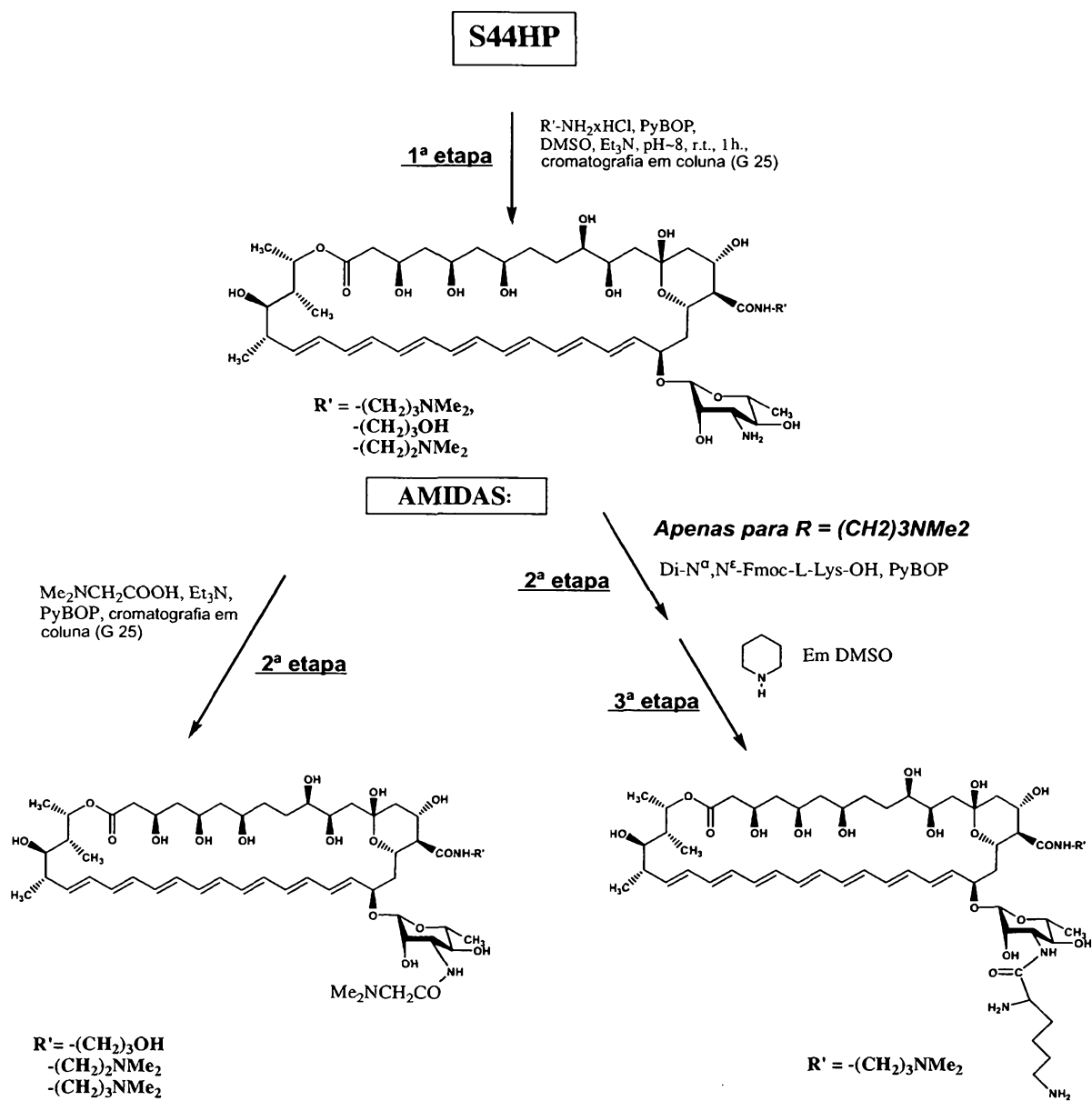
Amidas de derivados de N-alquila



Derivados de
reestruturação
de Amadori

Amidas de derivados de N-alquila

Derivados de
N-alquilação reductiva

FIG. 11 *Esquema 2* **Amidas de derivados de N-aminoacila**

Amidas de derivados de N-aminoacila

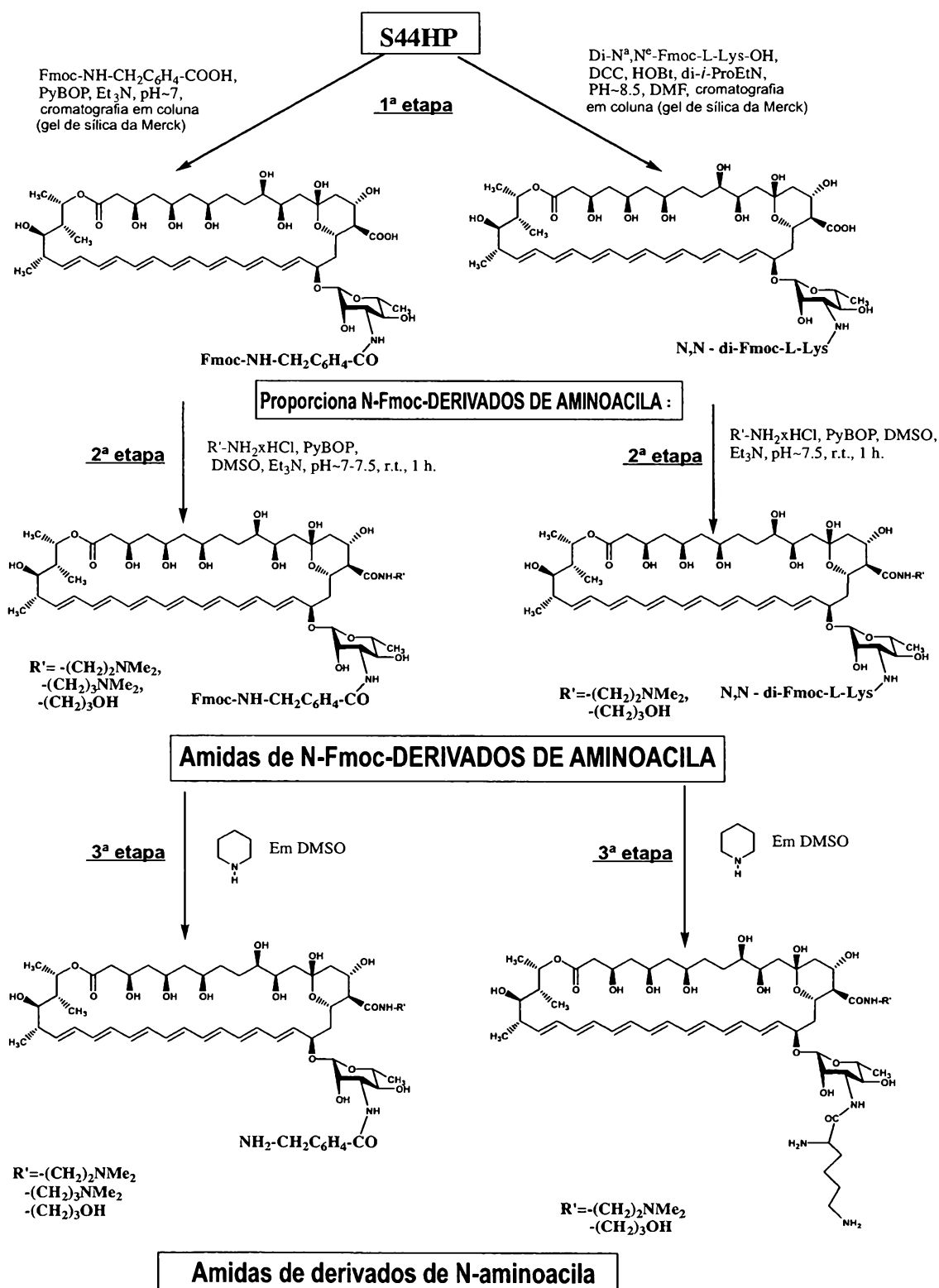
Fig. 12 Esquema 3 Amidas de derivados de N-aminoacila

FIG. 13 Esquema 4

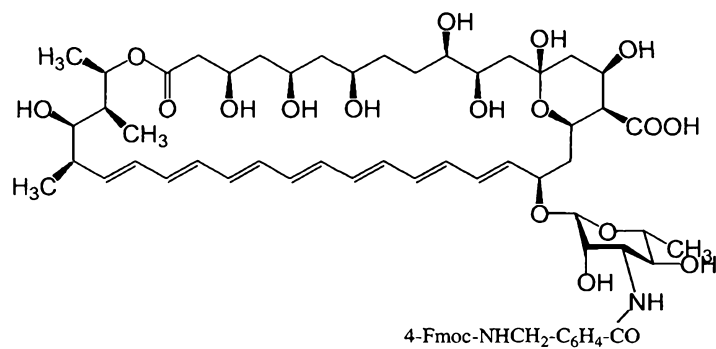
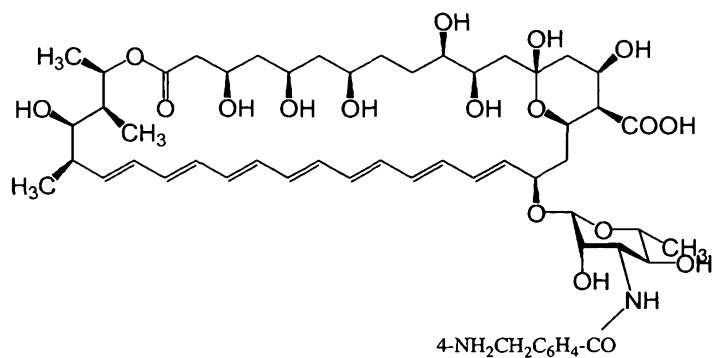
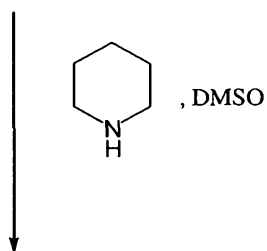
Síntese de N-(4-aminometilbenzoil)S44HP**N-(4-Fmoc-aminometilbenzoil)S44HP****N-(4-aminometilbenzoil)S44HP**

FIG. 14 Esquema 5 Síntese de S44HP DMAE amida

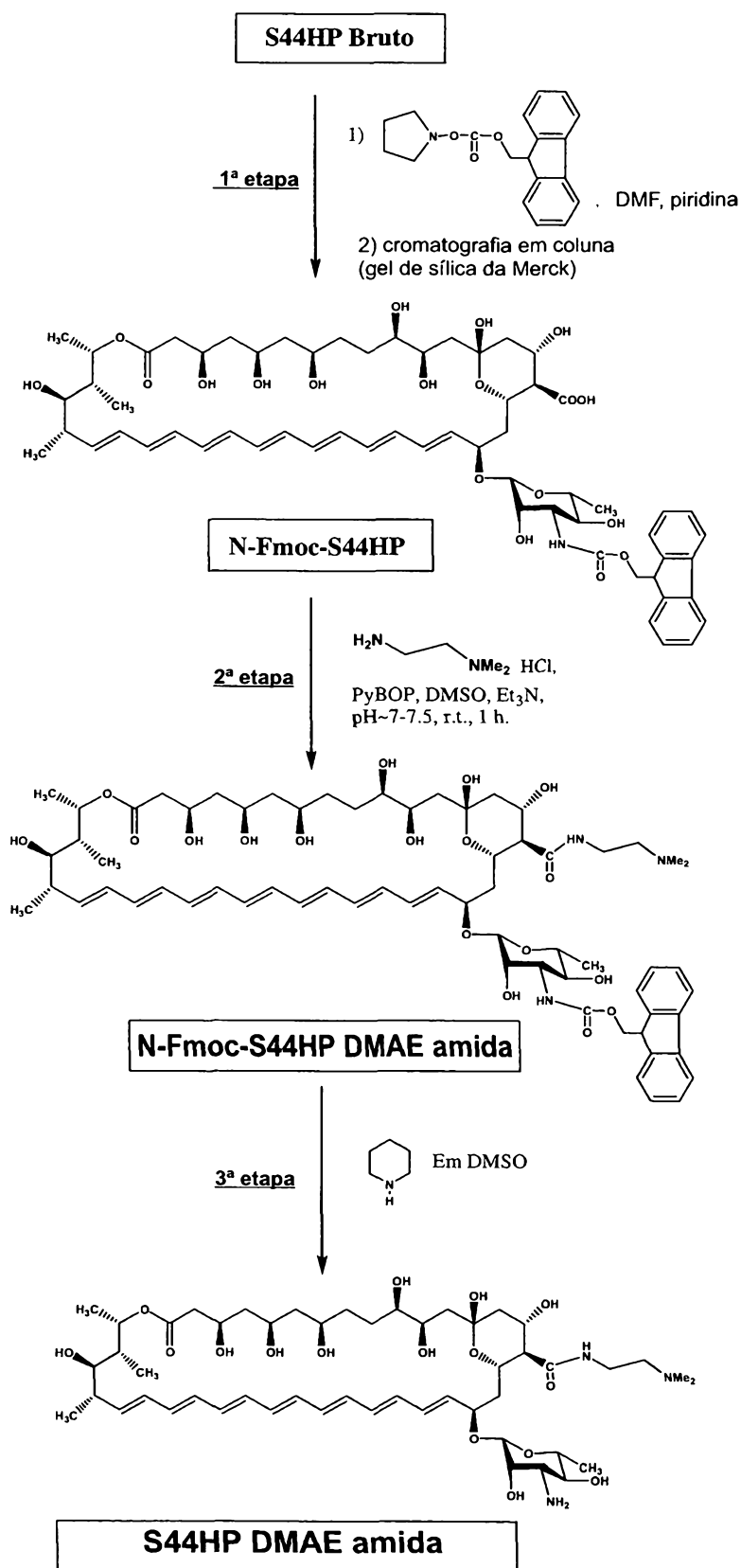


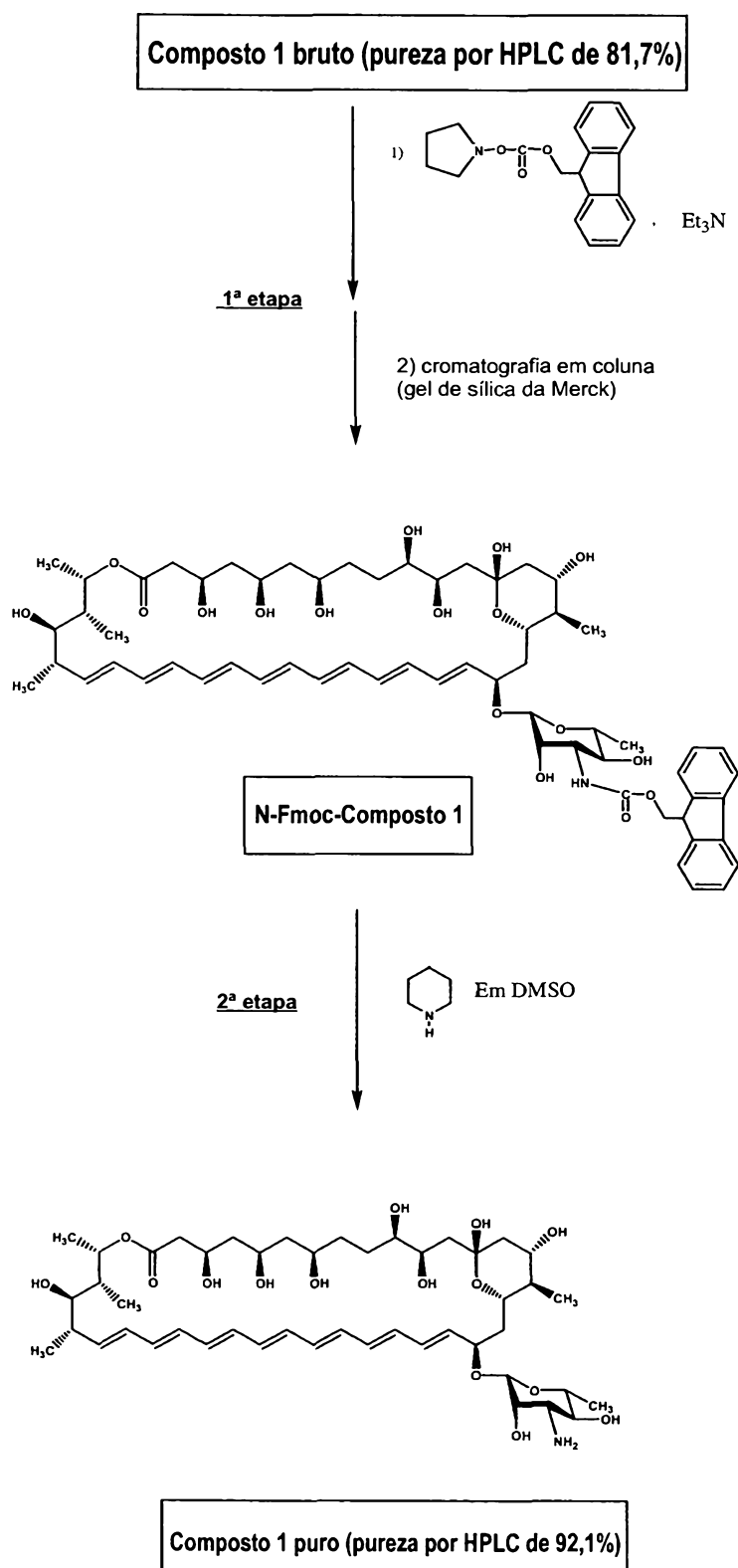
FIG. 15 Esquema 6 Purificação de composto 1, começando a partir de composto 1 bruto

FIG. 16 Esquema 7

N-frutopiranosil-Composto 1 (derivado de N-alquila, reestruturação de Amadori);
N-(4-N,N-di-metilaminobenzil) composto 1 (derivado de N-alquila, alquilação redutiva);
N-L-lisil-Composto 1 (derivado de N-aminoacila, N-Fmoc-aminoacilação); **N,N-di-(3-aminopropil)**
Composto 1 (derivado de N,N-di-alquila, alquilação redutiva)

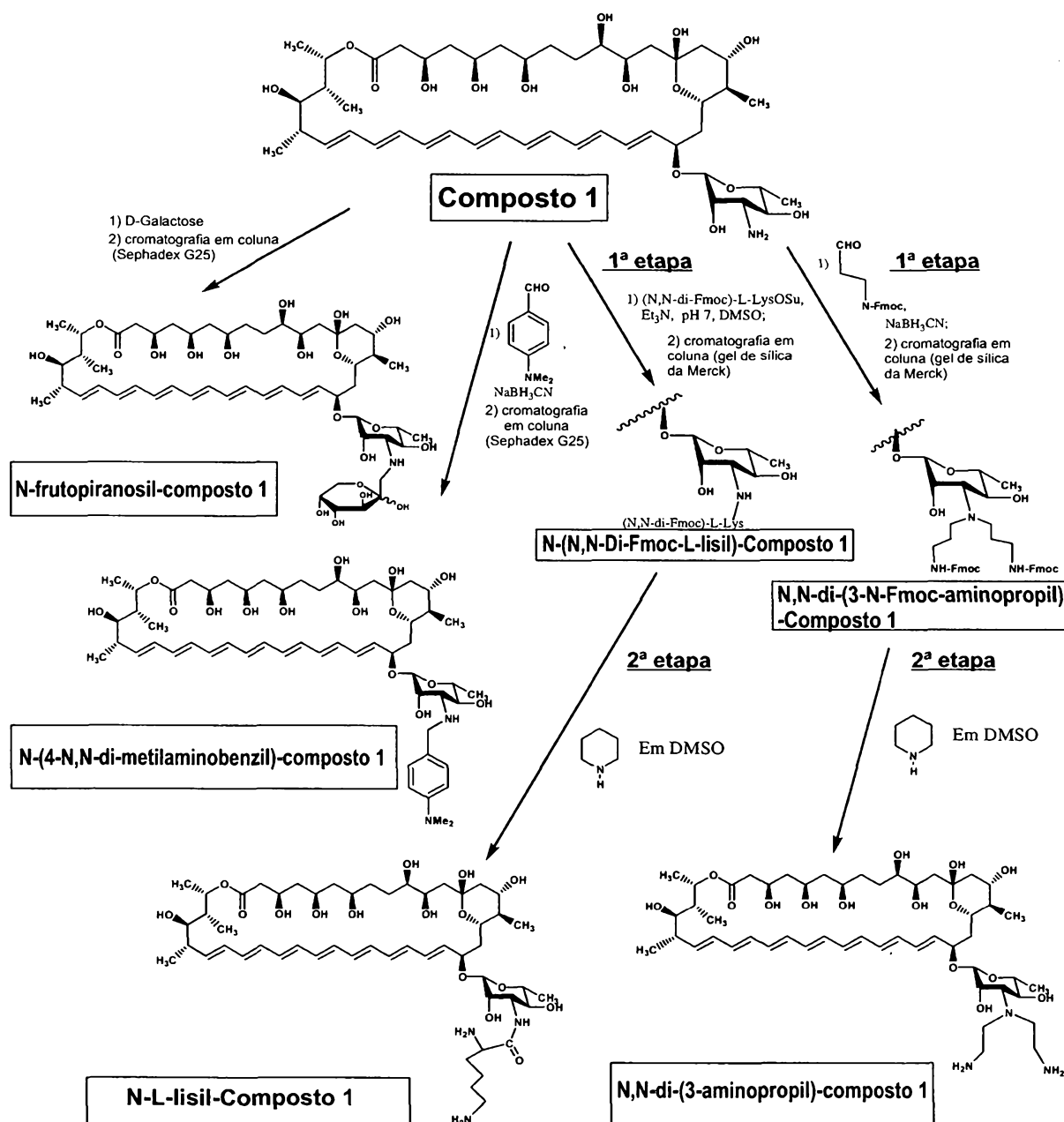


FIG. 17

