

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social F. HOFFMANN-LA ROCHE A.G. sociedad existente y organizada de conformidad con las leyes de Suiza ✓

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica) JOSE ANTONIO LLOREDA ✓

País de Domicilio Suiza

Departamento o Estado

Dirección 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basilea, Suiza ✓

Ciudad Basilea

Teléfono 41 61 6881111

(74) DATOS DEL REPRESENTANTE LEGAL

Nombre JOSE ANTONIO LLOREDA ✓

Dirección y Domicilio Calle 72 No. 5-83 Piso 6, Bogotá, Colombia

Ciudad Bogotá D.C.

Teléfono 57 1 3264270

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es) Masami Kohchi, Kazunao Masubuchi, Takashi Murata, Takahiro Okada y Nobuo Shimma ✓

Identificación Takakura 509-1-D-202, Fujisawa-shi, Kanagawa-ken, 252-0802; Nagatsuma

Dirección cho 191-1-406, Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, 244-0341; Higashi-kaigan-Minami 6-6-17-I-106, Chigasaki-shi, Kanagawa-ken, 253-0054; Fuji-gatani 4-17-17-102, Kugenuma, Fujisawa-shi, Kanagawa-ken, 251-0031 y Higashikaigan-Minami 2-11-19, chigasaki-shi, Kanagawa-ken, 253-0054, Japón

Ciudad Kanagawa-ken

Teléfono 41 61 6881111

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención "NUEVOS COMPUESTOS CÍCLICOS" ✓

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☒
D.486

UNIONISTA ☐

(33) País EPO ✓

(32) Fecha 17-01-00 ✓

(31) No. Solicitud 00100807.7 ✓

Para Publicar a los ☒ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses a partir de la fecha de la presente Solicitud

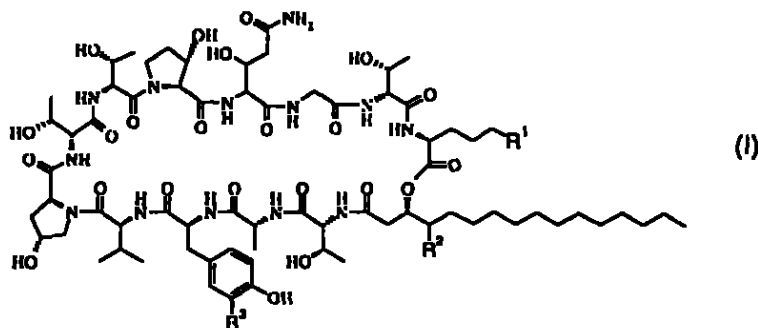
17 JUL. 2001

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A-61 P-311.10

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos aerotricinos representados por la fórmula (I),



en donde R^1 , R^2 y R^3 son como se ha definido en la reivindicación 1; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que contiene un aerotricino de fórmula (I) y una carga farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención se refiere al empleo de dichos aerotricinos para la preparación de medicamentos, así como a los procedimientos para la preparación de los aerotricinos de fórmula (I).

Traducción oficial

Si se reivindica prioridad Unionista:

Copia certificada de la primera solicitud:

Nota: Debe presentarse dentro de los cuatro (4) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior

Traducción Simple No. 5.794 de fecha 09-12-00 de Maria Luisa Brigard de Restrepo

Capítulo descriptivo

Dibujos, planos necesarios

Capítulo reivindicatorio

Tarjeta archivo propietarios según formato

Tarjeta archivo temático según formato

Extracto para publicación según formato

Arte final 12 x 12 cms. y 6x6 cms

Otros Documentos

Nota: Anexo información sobre la fuente normativa de reciprocidad y petición Reconocimiento Personería

SOLICITO LA CONCESIÓN DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE JOSÉ ANTONIO LLOREDA

C.C. 17.159.681 de Bogotá TP No. 10.784



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 01002340 00000000
Fecha (AND): 2001-01-15 16:12:32
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Folios: 100

NIT : 300176009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 1,552
FECHA : ENERO 15 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Gr. PAGO
LLEREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	3109960	3,806,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RECIBISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	600,000.00
	TOTAL :	600,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

ANEXO

Atentamente manifiesto a usted que la fuente normativa de la reciprocidad de la cual se deriva el derecho del solicitante para reivindicar prioridad en el presente caso, se encuentra:

- a) En el Artículo 2 del Tratado de Amistad y Comercio suscrito el 14 de Marzo de 1908 entre Suiza y Colombia, que establece la "Cláusula de la Nación más favorecida".

Suiza, que constituye uno de los países signatarios de la Convención Europea de Patentes vigente desde el 7 de octubre de 1977, convención en virtud de la cual se expiden las Patentes Europeas, es uno de los países respecto de los cuales se ha solicitado la correspondiente patente (Solicitud No. 00100807.7), tal como se desprende del texto de la solicitud en relación con la cual reclamo prioridad.
- b) En el Artículo 2 del Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la "Organización Mundial de Comercio (OMC)" suscrito en Marruecos el 15 de abril de 1994. Este acuerdo fue aprobado por el Congreso de Colombia mediante Ley 170 de 1994 y por la Corte Constitucional Colombiana mediante Sentencia C-137-95 de 28 de marzo de 1995, y entró en vigencia en nuestro país el 30 de abril de 1995, 30 días después de su ratificación.

Dicho Artículo establece que en lo que respecta a las partes II, III y IV del Acuerdo (referidos a la existencia, alcance y ejercicio de los derechos de propiedad intelectual, entre otros) los Miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del Convenio de París —el Artículo que establece la prioridad de las patentes de invención es el Artículo 4.
- c) En el Artículo 4 del mencionado Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el que se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC), el cual consagra el "Trato de la nación más favorecida" para los países Miembros del mismo.
- d) En el Artículo 4 del Convenio de París, del cual ya era parte Colombia en el momento en que se presentó la solicitud cuya prioridad ahora reivindico, con lo cual se cumple la reciprocidad exigida en el Artículo 9 de la Decisión 486 del Acuerdo de Cartagena para con solicitudes provenientes del País Miembro del Acuerdo de Cartagena.

ANEXO

El documento que acredita la calidad REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores JOSE LLORED CAMACHO y/o ALFONSO LLORED CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLORED para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 15.256. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



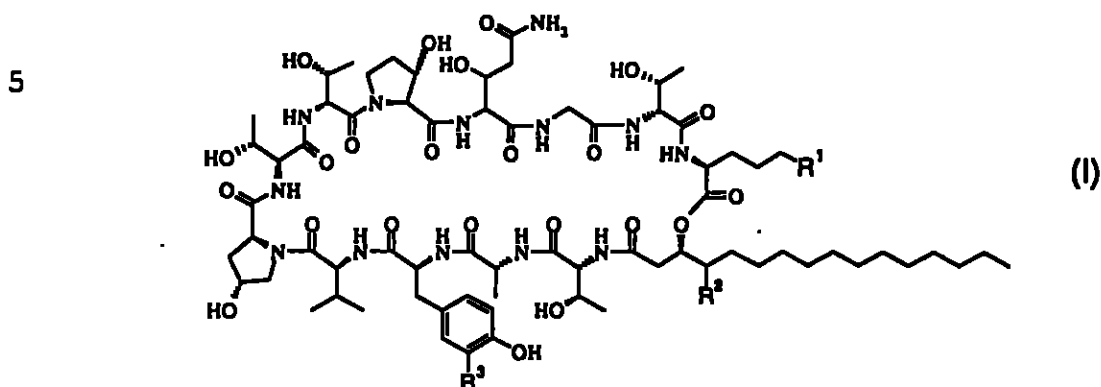
JOSE ANTONIO LLORED

T.P. No. 10.784

CODIGO 231

RESUMEN OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos aerotricinos representados por la fórmula (I),



en donde R^1 , R^2 y R^3 son como se ha definido en la reivindicación 1; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que contiene un aerotricino de fórmula (I) y una carga farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención se refiere al empleo de dichos aerotricinos para la preparación de medicamentos, así como a los procedimientos para la preparación de los aerotricinos de fórmula (I).

15

20

La presente invención se refiere a nuevos compuestos cíclicos que tienen una actividad antifúngica (de aquí en adelante llamados aerotricinos), al empleo de los aerotricinos en la terapia médica, a composiciones farmacéuticas que contienen aerotricinos, así como a procedimientos para la preparación de aerotricinos.

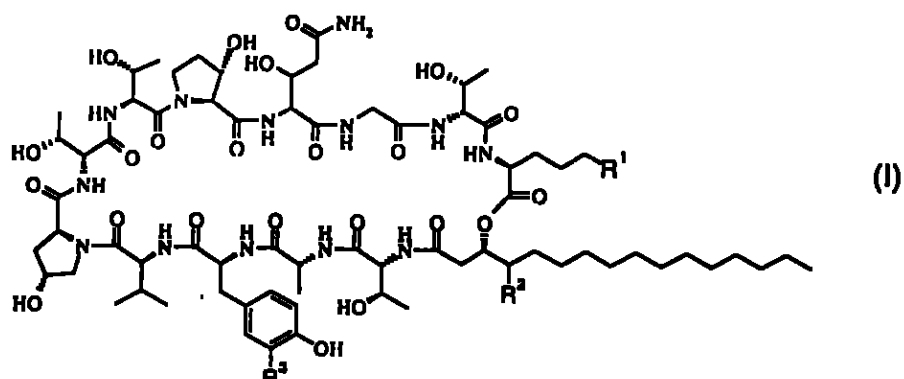
Habitualmente se emplean ampliamente agentes antifúngicos del grupo de los azoles para el tratamiento de las micosis sistémicas. Sin embargo, el empleo profiláctico a largo plazo de antifúngicos azoles da como resultado la aparición de *Candida spp.* resistentes al azol, debido a su acción fungiestática. Por lo tanto, los agentes fungicidas son particularmente importantes para el tratamiento de las micosis sistémicas graves, especialmente contra la aspergilosis pulmonar. Además, los agentes antifúngicos disponibles corrientemente, no son efectivos contra los *Scedosporium spp.* los cuales son uno de los patógenos emergentes entre los pacientes inmunocomprometidos. La anfotericina B es un agente fungicida altamente efectivo empleado corrientemente clínicamente, pero su índice terapéutico (dosis efectiva frente a dosis tóxica) es más bien pequeño. Ciertos compuestos cíclicos tales como el LY303366 (EP 736 541), y el WF11243 (EP 584 360) son conocidos por presentar actividad fungicida mediante la inhibición de la β -1,3-glucan sintasa. Sin embargo, tienen todavía algunos inconvenientes en cuanto al espectro antifúngico y/o el perfil de seguridad. Por este motivo, es necesario urgentemente el desarrollo de nuevos agentes fungicidas con mejor perfil de

seguridad y eficacia contra patógenos sistémicos importantes incluyendo el *Aspergillus fumigatus* y *Scedosporium spp.*

En particular, la presente invención se refiere a nuevos aerotricinos representados por la fórmula (I),

5

10



en donde

R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril] amino, N-(3-aminopropil)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-amino-
15 etil)amino]valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[-5-amino-2-[N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino, N-(2-aminoetil)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino u ornitil-ornitilamino;

R^2 es hidrógeno o metilo;

20

R^3 es hidrógeno o hidroxilo;

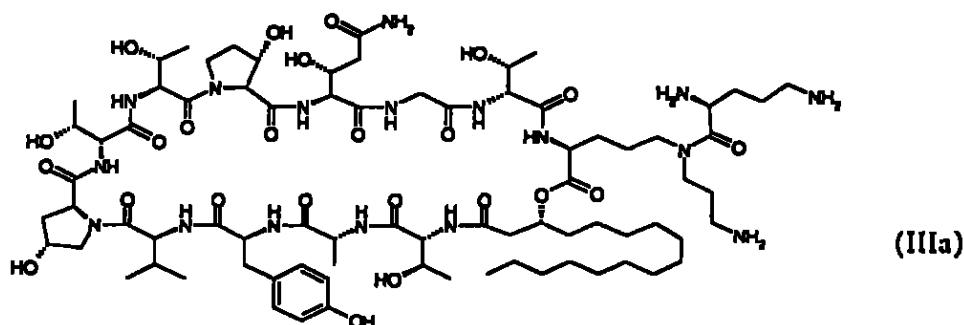
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que contiene un aerotricino de fórmula (I) y una carga farmacéuticamente aceptable. Además, la
25 presente invención se refiere al empleo de dichos aerotricinos para la preparación de medicamentos, así como a procedimientos para la preparación de los aerotricinos de fórmula (I). Adicionalmente, la presente invención se refiere

a un método para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patogénicos.

En una versión preferida, la presente invención se refiere a los aerotricinos de fórmula (I) en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino, N-(2-aminoetil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, ó (L)-ornitil-(D)-ornitilamino; R^2 es hidrógeno o metilo, de preferencia hidrógeno; R^3 es hidrógeno o hidroxilo, de preferencia hidrógeno; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

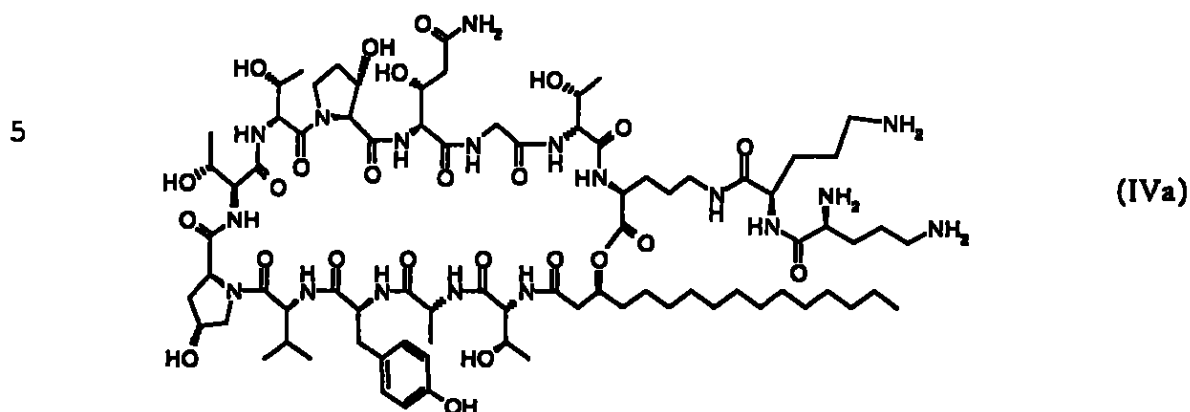
En otra versión preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril]amino, y R^2 y R^3 son átomos de hidrógeno; a saber, de la fórmula (IIIa)



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En otra versión preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en donde R^1 es (L)-

ornitil-(D)-ornitilamino, y R^2 y R^3 son átomos de hidrógeno; a saber, de la fórmula (IVa)

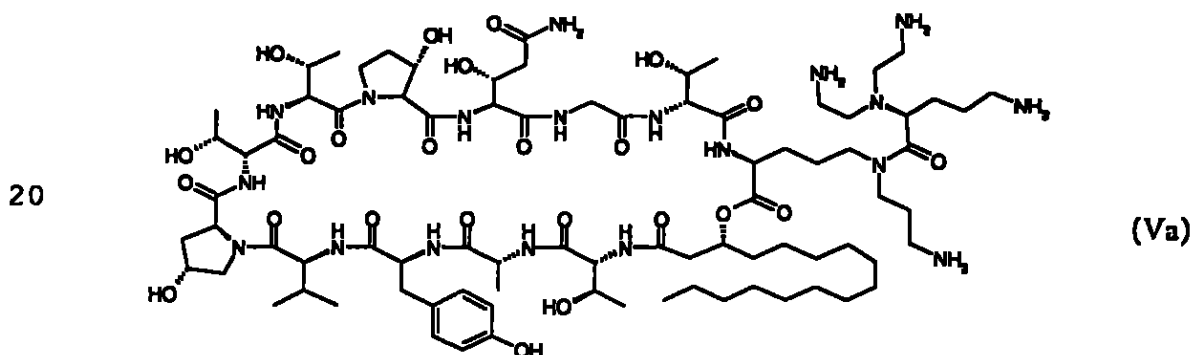


10

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En otra versión preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]

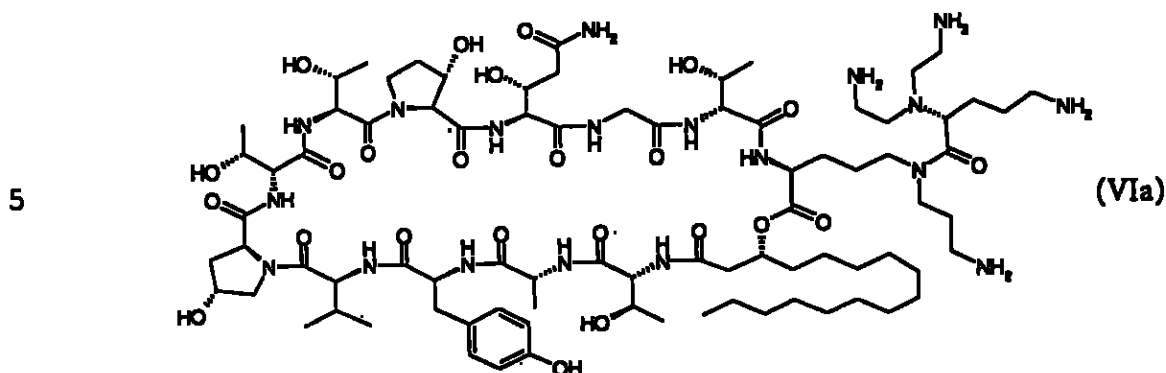
15 no]valeril]amino, y R^2 y R^3 son átomos de hidrógeno; a saber, de la fórmula (Va)



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

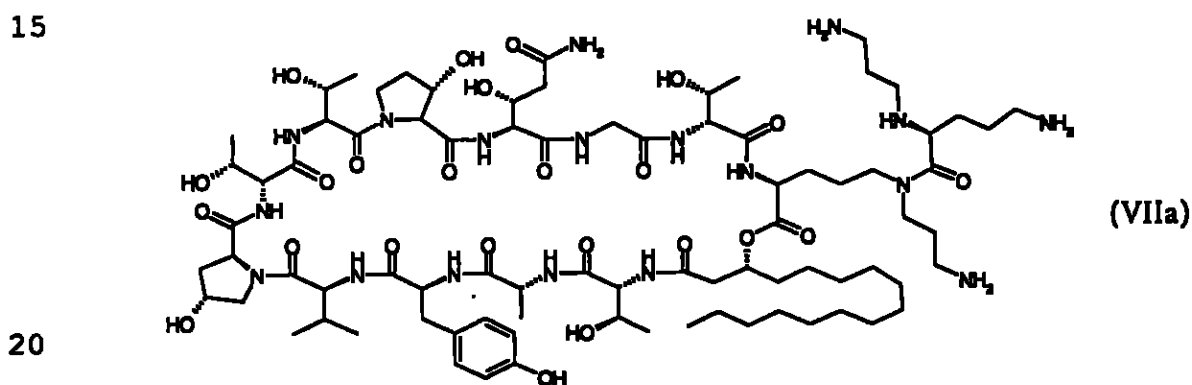
25 En otra versión preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, y R^2 y R^3 son átomos de hidrógeno; a saber,

de la fórmula (VIa)



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

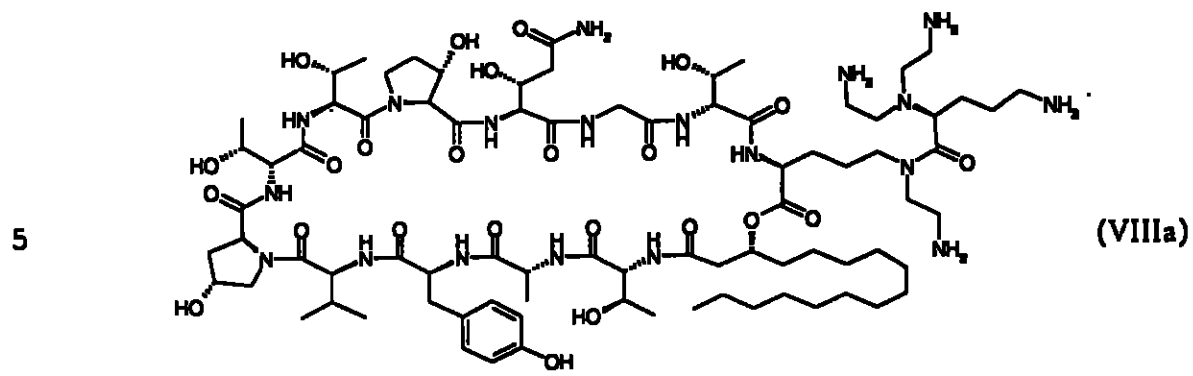
10 En otra versión preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropil)amino] valeril]amino, y R^2 y R^3 son átomos de hidrógeno; a saber, de la fórmula (VIIa)



20

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En otra versión preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), en donde R^1 es N-(2-aminoetil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, y R^2 y R^5 son átomos de hidrógeno; a saber, de la fórmula (VIIIa)



10 y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los aerotricinos de acuerdo con la presente invención son aerotricinos ejemplificados en la siguiente tabla 1.

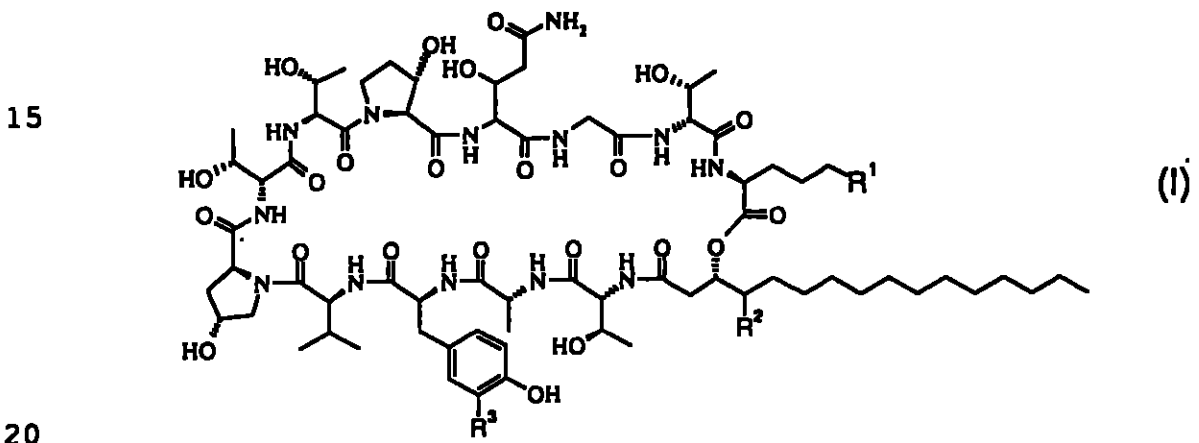


Tabla 1

Nombre del compuesto	R ¹	R ²	R ³
Aerotricino 1 (material de partida)	NH ₂	CH ₃	H
Aerotricino 2 (material de partida)	NH ₂	H	OH
Aerotricino 3 (material de partida)	NH ₂	H	H
Aerotricino 132	$\begin{matrix} \text{--NCO--CH(NH--)} \\ \\ \text{(CH}_2\text{)}_3\text{NH}_2 \end{matrix}$	H	H

	Aerotricino 133	$\begin{array}{c} \text{NCO}-\overset{*}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{NHCOCH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	H	H	
5	Aerotricino 134	$\begin{array}{c} \text{NCO}-\overset{**}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{N}[(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H	
	Aerotricino 135	$\begin{array}{c} \text{NCO}-\overset{*}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{N}[(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H	
10	Aerotricino 136	$\begin{array}{c} \text{NCO}-\overset{**}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H	
	Aerotricino 137	$\begin{array}{c} \text{NCO}-\overset{**}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{N}[(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H	
15					

* configuracion (R) ** configuracion (S)

Los aerotricinos representados por la fórmula (I) pueden obtenerse a partir de los aerotricinos 1, 2 ó 3 de acuerdo con los métodos descritos en el esquema 1 y 2, en donde el grupo protector amino P₁ y P₂ pueden seleccionarse del terc-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Cbz), fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y similares; R² y R³ son como se ha definido más arriba.

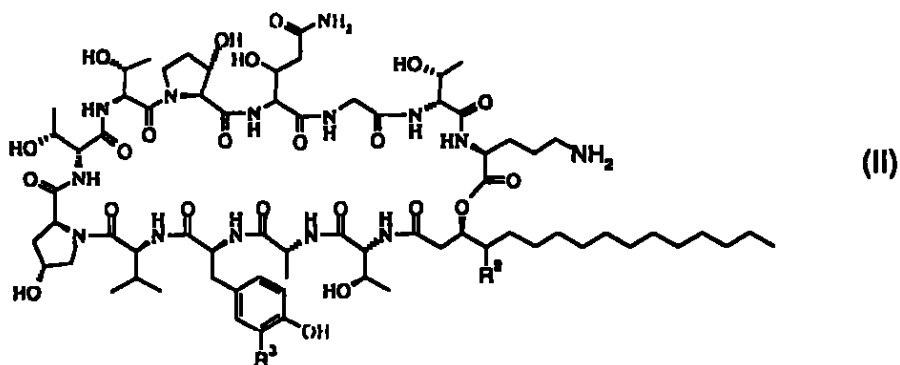
25 Procedimiento A

Los compuestos de partida, los aerotricinos de fórmula (II), pueden obtenerse cultivando un microorganismo que pertenece a Deuteromycotina, capaz de producir los aerotri-

cinosen 1, 2 y 3 [el aerotricinosen 3 (= WF11243) est descrito en la referencia del ejemplo 1] en condiciones aeróbicas en un medio acuoso o sólido y aislando los aerotricinosen 1,2 y/o 3 del cultivo.

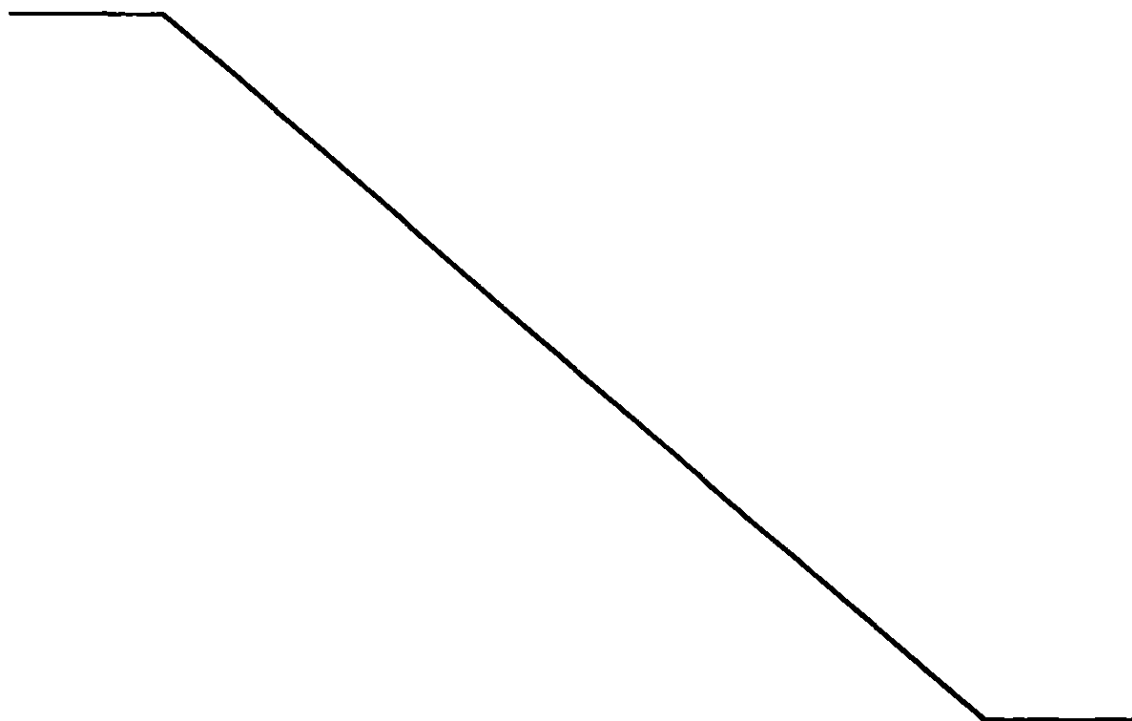
5

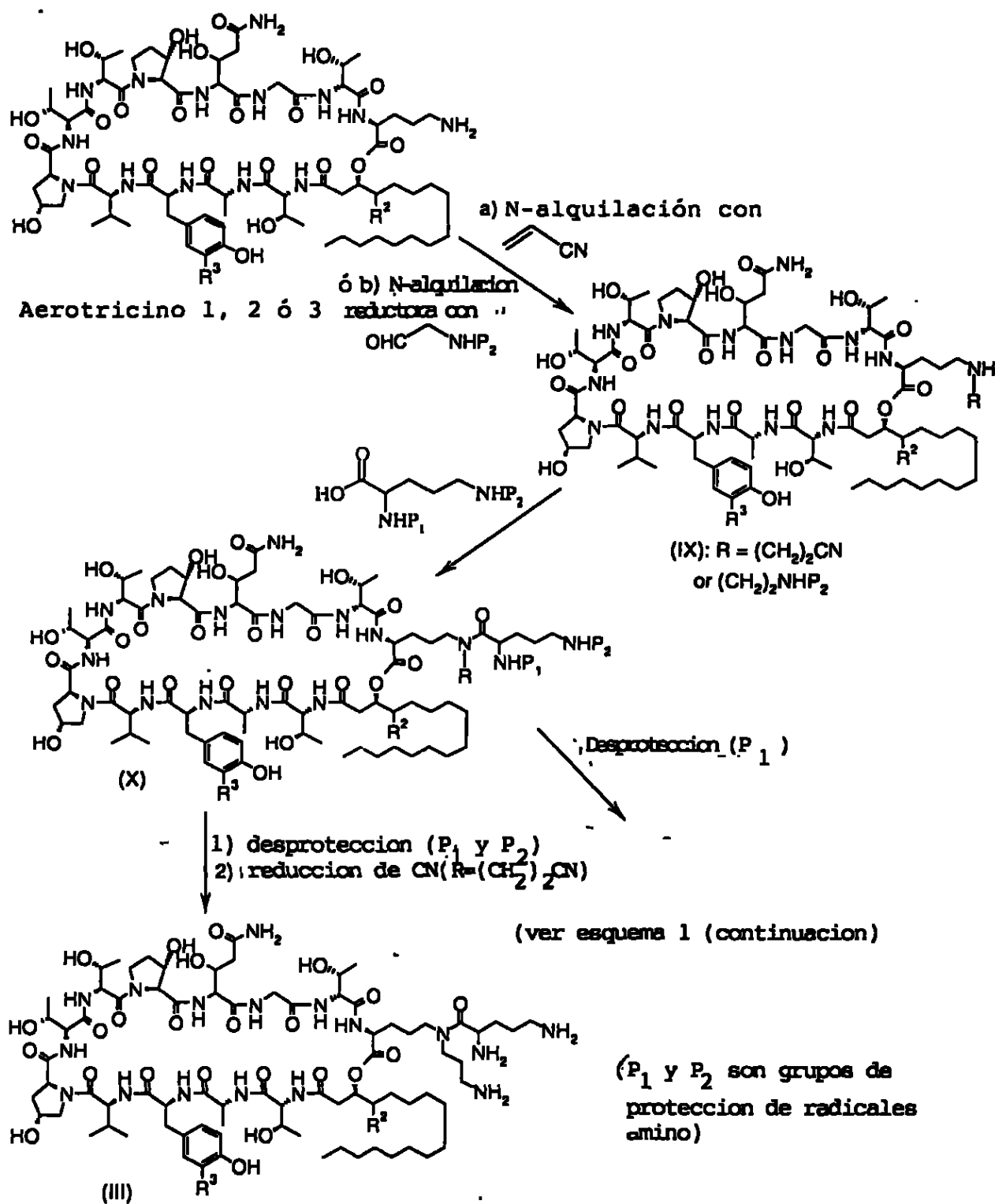
10



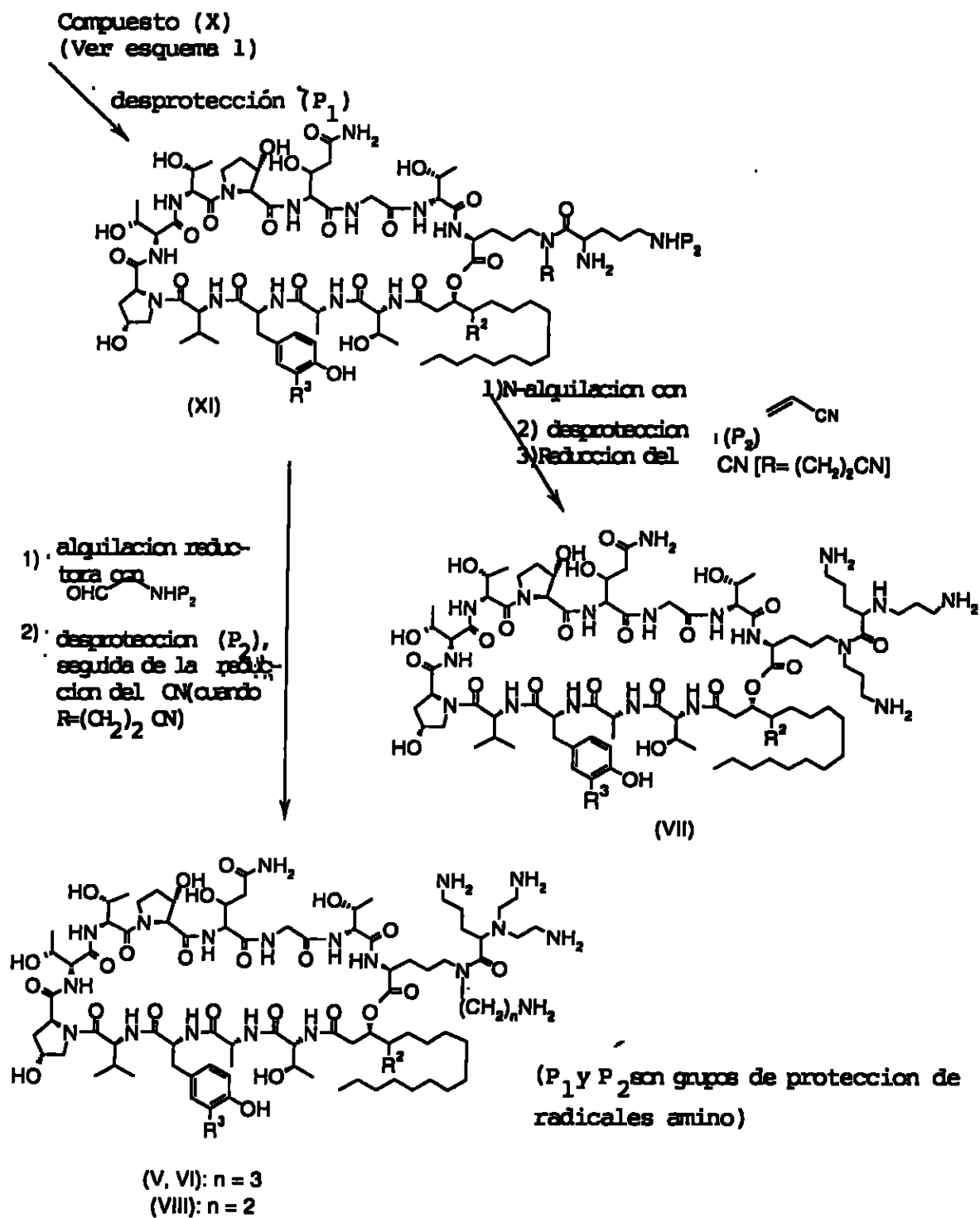
[en donde R^2 es hidrógeno o metilo; R^3 es hidrógeno o hidroxilo]

Los compuestos de fórmula II pueden convertirse en compuestos de fórmula I mediante los siguientes procedimientos B  C:



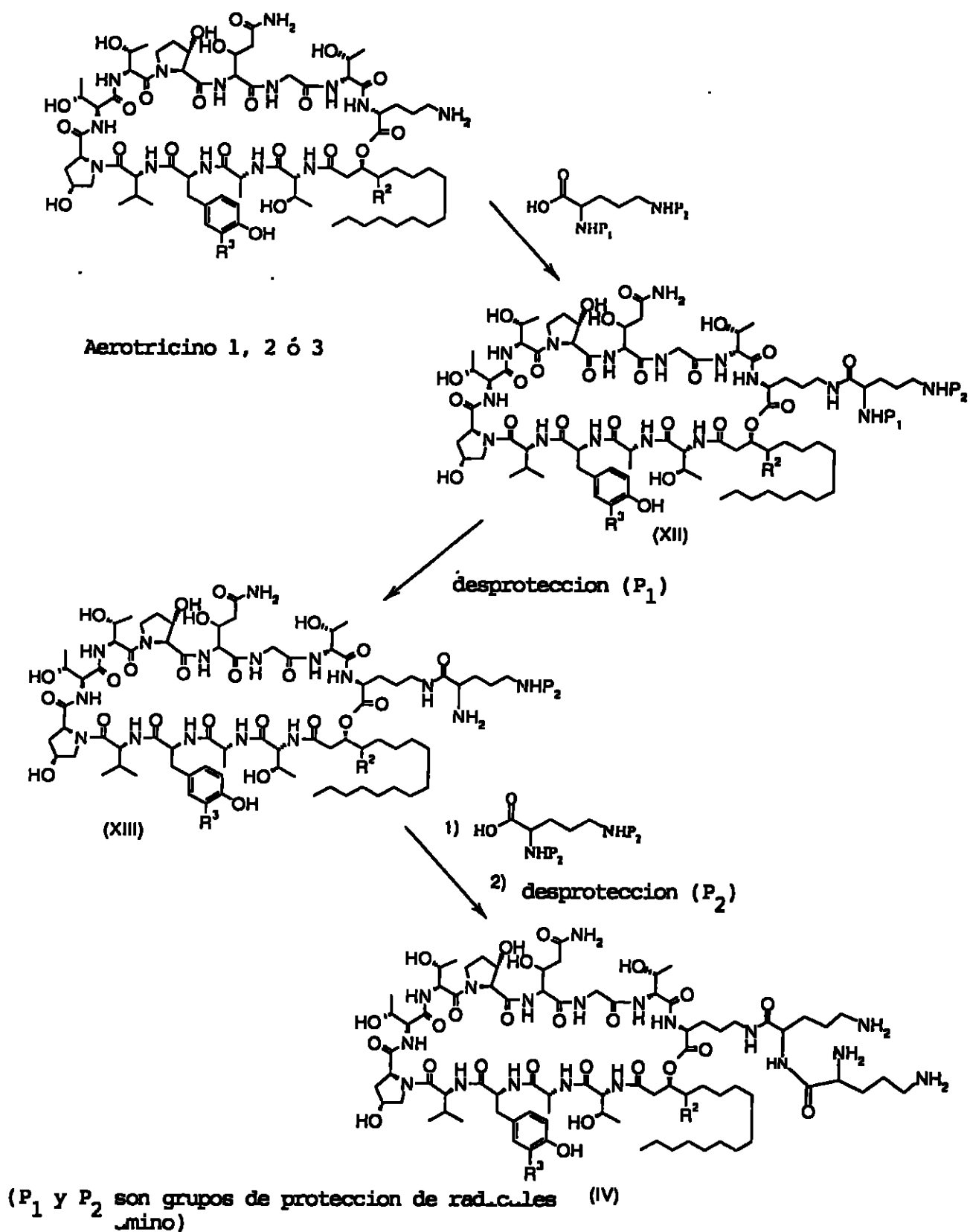
Proceso B

Esquema 1



Esquema 1 (continuación)

Procedimiento C



Esquema 2

Los procedimientos A a C pueden ilustrarse con más detalle como sigue:

Procedimiento A

El microorganismo empleado en la presente invención puede ser cualquier cepa incluyendo los mutantes y variantes pertenecientes a los *Deuteromycotina* capaces de producir los aerotricinos 1, 2 y 3. Es especialmente preferida la cepa NR 7379 la cual se aísla de las hojas caídas recogidas en Kagoshima pref. en Japón, identificada como una cepa perteneciente a los *Deuteromycotina*.

El cultivo y las características morfológicas de la cepa NR 7379 son como sigue:

1. Características del cultivo

Agar de harina de maíz (CMA): El crecimiento no fue muy extenso: Las colonias alcanzaron 11 mm de diámetro a partir del inóculo (taco de agar de 4,5 mm de diámetro) después de 14 días a 25°C. Eran planas y de color amarillo crema pálido. La cara opuesta era de color amarillo crema pálido. Estaban presentes exudados incoloros y mucilaginosos.

Medio de Miura (LCA): El crecimiento no fue muy extenso. Las colonias alcanzaron 11 mm de diámetro a partir del inóculo después de 14 días a 25°C. Eran planas y de color amarillo crema pálido. La cara opuesta era de color amarillo crema pálido. No habían exudados presentes.

Agar de extracto de malta (MEA): El crecimiento no fue muy extenso. Las colonias eran pustuliformes y alcanzaron un diámetro de 18 mm a partir del inóculo después de 14

días a 25°C. El color de las colonias era pardo amarillento claro. La cara opuesta era del mismo color. Los exudados eran incoloros y mucilaginosos.

Agar de patata-dextrosa (PDA): El crecimiento no fue
5 muy extenso. Las colonias eran pustuliformes y alcanzaron 14 mm de diámetro a partir del inóculo después de 14 días a 25°C. El color y la textura de las colonias era similar a los de MEA. Los exudados eran incoloros y mucilaginosos.

Se observó una germinación entre 5°C y 30°C con CMA,
10 LCA, MEA y PDA.

2. Características morfológicas

Los micelios estaban parcialmente sumergidos, en parte en la superficie, ramificados, formando tabiques y de color pardo a color amarillo crema. Los conidioforos se formaron
15 a partir del micelio sumergido. Eran hialinos, en forma de tabiques, ramificados, irregulares. Habían células conidiogenas sobre evidentes conidioforos o hifas irregulares. Eran enteroblásticos, fialídicos, terminales o subterminales. Las fialidas terminales o subterminales eran de longitud y forma variables. Eran desde cilíndricas hasta planas
20 y su longitud y ancho eran desde 5,5 hasta 10 µm y 2,5 a 5,5 µm, respectivamente. A menudo se formaron conidioforos filiformes irregulares con células conidiogenas laterales inmediatamente debajo de tabiques. Los conidios eran mono-
25 celulares, hialinos, lisos, globosos a subglobosos, de 2,0 a 5,5 µm de longitud y 2,0 a 5,0 µm de ancho.

Sobre la base de estas inconfundibles características de cultivo y morfológicas, la presente cepa pertenecía a la

Deuteromycotina designada como *Deuteromicotina* NR 7379.

La cepa indicada como *Deuteromicotina* NR 7379 ha sido depositada en el National Institute of Bioscience and Human-Technology ("Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana") Agency of Industrial Science and Technology ("Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial"), Japón, con el nombre de Nippon Roche K.K., de 6-1, Shiba 2-chome, Minato-ku Tokio, 105 Japón, el 16 de Junio de 1998 bajo el tratado de Budapest, como sigue:

10 *Deuteromicotina* NR 7379 (FERM BP-6391).

El cultivo de acuerdo con el procedimiento descrito por la presente invención, puede efectuarse en un medio de cultivo que contiene los nutrientes habitualmente empleados en el cultivo de microorganismos. Como fuentes de carbono
15 pueden mencionarse por ejemplo, la glucosa, sacarosa, almidón, glicerina, melazas, dextrina y mezclas de los mismos. Fuentes de nitrógeno son, por ejemplo, harina de soja, harina de semilla de algodón, extracto de carne, peptona, levadura anhidra, extracto de levadura, extracto de germen de
20 maíz, sulfato de amonio, nitrato de sodio y mezclas de los mismos. Además, puede añadirse al medio de cultivo otras sustancias orgánicas o inorgánicas para promover el crecimiento de los microorganismos y para el aumento de producción del aerotricino I. Ejemplos de dichas sustancias son
25 las sales inorgánicas tales como carbonato de calcio, cloruro de sodio, fosfatos y similares.

El cultivo se efectúa en condiciones aeróbicas de preferencia en un medio líquido mediante fermentación sumergi-

da, o en un medio sólido mediante fermentación estática. Una temperatura de 20°C a 30°C con una temperatura óptima de 27°C, es adecuada para el cultivo. El cultivo se efectúa de preferencia a un pH de 3 a 9. El tiempo de cultivo depende de las condiciones bajo las cuales se efectúa el cultivo. En general, es suficiente efectuar el cultivo de 20 a 360 horas.

Para recoger los deseados aerotricinos 1, 2 y 3, a partir de los cultivos, pueden emplearse correctamente los métodos de aislamiento que se emplean habitualmente para aislar los metabolitos obtenidos por microbios a partir de sus cultivos. Por ejemplo, el aerotricino 1, el cual es una sustancia anfótera extraíble con metanol, se recupera ventajosamente mediante los siguientes procedimientos.

El cultivo sólido completo obtenido mediante fermentación al estado sólido, se extrae con un disolvente apropiado para recuperar el producto propuesto. Los disolventes que pueden emplearse para extraer el compuesto en cuestión a partir del sólido total cultivado incluyen disolventes orgánicos solubles en agua o una solución hídrica de disolventes orgánicos solubles en agua, tales como el metanol, etanol y alcoholes hídricos.

Para la separación de las sales, sustancias solubles en agua, etc. a partir de los extractos resultantes se utiliza con ventaja, el reparto entre agua y disolventes orgánicos no miscibles en agua, tales como el n-butanol, acetato de etilo, etc. Para la separación de sustancias colorantes, sustancia soluble en grasas o similares a partir

del extracto, se utiliza con ventaja la purificación mediante el metanol, etanol, una mezcla de acetonitrilo - ácido trifluoroacético acuoso al 0,1%, etc.

Para la completa purificación del aerotricino, es ventajoso el empleo de la cromatografía de columna. Las cargas que pueden emplearse en dicha cromatografía de columna son tales como YMC-GEL ODS (Yamamura Chemical Laboratories, Japan) ó Preparative C18 (Waters Millipore Corporation). Como eluyente, se emplea un sistema disolvente que consiste en una mezcla de ácido trifluoroacético acuoso y disolventes orgánicos apropiados solubles en agua, tales como el metanol, etanol, acetonitrilo, etc. La fracción eluída así purificada, la cual contiene cada componente, puede someterse a concentración o liofilización para pulverizar los aerotricinos 1, 2 y 3.

Los aerotricinos 1, 2 y 3 fueron aislados como sal del ácido trifluoroacético, pero los aerotricinos 1, 2 y 3 libres pueden prepararse mediante el siguiente procedimiento. La sal de los aerotricinos 1, 2 y 3 con el ácido trifluoroacético, se disolvió en agua, a la cual se añadió un equivalente de hidróxido de sodio, y la mezcla se sometió a una cromatografía de columna con Sephadex LH-20, seguida de una elución con un alcohol hidrico tal como el metanol-agua, etc. para obtener los aerotricinos 1, 2 y 3 (forma libre), respectivamente.

Procedimiento B

El compuesto de fórmula (III) puede prepararse a partir de los aerotricinos de fórmula (II) [en donde R¹ es un

grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido más arriba] en 4
pasos: (1) N-alquilación con acrilonitrilo, (2) acilación
con ornitina N-protegida, (3) eliminación de los grupos de
protección de los radicales amino (P_1 y P_2), y (4) reducción
5 del grupo ciano.

El compuesto de fórmula (V, VI) puede prepararse a
partir de los aerotricinos de fórmula (II) [en donde R^1 es
un grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido más arriba]
en 6 pasos: (1) N-alquilación con acrilonitrilo, (2) acila-
10 ción con ornitina N-protegida, (3) eliminación del radical
amino protegido (P_1), (4) N-alquilación reductora con ami-
no-acetaldehído N-protegido, (5) eliminación del grupo de
protección del radical amino (P_2), y (6) reducción del gru-
po ciano.

15 El compuesto de fórmula (VIII) puede prepararse a par-
tir de los aerotricinos de fórmula (II) [en donde R^1 es un
grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido más arriba] en
6 pasos: (1) N-alquilación reductora con amino-acetaldehído
N-protegido, (2) acilación con ornitina N-protegida, (3)
20 eliminación del grupo de protección del radical amino (P_1),
(4) N-alquilación reductora con amino-acetaldehído N-
protegido, (5) eliminación del grupo protector del radical
amino (P_1), y (6) reducción del grupo ciano.

El compuesto de fórmula (VII) puede prepararse a par-
25 tir de los aerotricinos de fórmula (II) [en donde R^1 es un
grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido más arriba] en
6 pasos: (1) N-alquilación con acrilonitrilo, (2) acilación
con ornitina N-protegida, (3) eliminación del grupo de pro-

tección del radical amino (P_1), (4) N-alquilación con acrilonitrilo, (5) eliminación del grupo de protección del radical amino (P_2), y (6) reducción del grupo ciano.

Procedimiento C

- 5 El compuesto de fórmula (IV) puede prepararse a partir de los aerotricinos de fórmula (II) [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido más arriba] en 4 pasos: (1) acilación con ornitina N-protegida, (2) eliminación del grupo de protección del radical amino (P_1), (3)
- 10 acilación con ornitina N-protegida, y (4) eliminación del grupo de protección del radical amino (P_2).

En los procedimientos anteriores B y C;

- (a) La N-monoalquilación de un grupo amino puede hacerse empleando el acrilonitrilo de acuerdo con el método
- 15 descrito en Organic Synthesis ("Síntesis Orgánica") col. vol. III, página 93.

- (b) N-alquilación del radical amino primario o secundario puede hacerse mediante la alquilación reductora convencional con aminoacetaldehído N-protegido empleando un
- 20 agente reductor tal como el cianoborohidruro de sodio en presencia o ausencia de un ácido débil tal como el ácido acético. La reacción puede efectuarse a temperatura ambiente en un disolvente tal como el metanol, etanol, ácido acético y similares.

- 25 (c) La reducción del grupo nitrilo puede llevarse a cabo mediante hidrogenación catalítica o reducción con borohidruro de sodio/cloruro de cobalto, complejo boro/sulfuro de metilo y similares [ver J. Meed. Chem., 37,

222 (1994)]].

(d) La N-acilación de un grupo amino puede hacerse con ornitina N-protegida empleando agentes de condensación tales como la diciclohexilcarbodiimida, BOP, HBTU, TNTU, 5 PyBroP™, PyBOP™, TBTU, TSTU, HOBT y similares, o la combinación de dos de ellos. La reacción puede efectuarse en un disolvente tal como el metanol, etanol, piridina, N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona y similares en presencia o ausencia de una base tal como la trietilamina, di-isopro- 10 piletilamina, piridina y similares a una temperatura entre -20°C y +50°C, de preferencia, entre 0°C y +25°C.

(e) La eliminación del grupo protector del radical amino puede hacerse mediante un método ya conocido por los expertos en la especialidad, p. ej. tratamiento con ácido 15 trifluoroacético para el grupo Boc, o piperidina para el grupo Fmoc.

La presente invención se refiere también a las sales de adición ácida de los aerotricinos. La sal de adición ácida puede obtenerse como sal del ácido trifluoroacético 20 después del curso normal de la separación. La sal así obtenida puede disolverse en agua y pasada a través de una columna de intercambio aniónico que lleva el anión deseado. El eluato que contiene la sal deseada puede ser concentrado para recuperar la sal como un producto sólido.

25 Los aerotricinos de fórmula (I) pueden ser convertidos en una sal correspondiente en virtud de la presencia de átomos de nitrógeno terciarios.

La sal de adición ácida de los aerotricinos de fórmula

(I) pueden obtenerse por tratamiento de la base libre de los aerotricinos con por lo menos una cantidad estequiométrica de un ácido apropiado, tal como ácidos minerales, p. ej. ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, p. ej. ácido acético, ácido propiónico, Ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, Ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares. Típicamente, la base libre se disuelve en un disolvente orgánico inerte tal como el etanol, metanol y similares, y el ácido se añade en un disolvente similar. La temperatura se mantiene alrededor de 40°C. La sal resultante precipita espontáneamente o puede extraerse de la solución con un disolvente menos polar.

Las sales de adición ácida de los aerotricinos de fórmula (I) pueden convertirse en las correspondientes bases libres por tratamiento con por lo menos una cantidad estequiométrica de una base adecuada tal como el hidróxido de sodio o de potasio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio, amoníaco y similares.

Los aerotricinos proporcionados por la presente invención presentan una amplia actividad fungicida contra varios hongos y pueden ser empleados como agentes para el tratamiento y profilaxis de enfermedades infecciosas fúngicas. La actividad antifúngica in vitro e in vivo (ver tablas

2,3-1 y 3-2) así como la toxicidad a los hepatocitos (ver tabla 4) de los aerotricinos representativos de fórmula (I) se comprueba como sigue:

1. Actividades antifúngicas in vitro

5 Las actividades antifúngicas in vitro de los aerotricinos representativos, del presente estudio, se evaluó determinando la concentración inhibitoria del 80% (IC₈₀), la cual se calculó como la concentración más baja de un antifúngico para inhibir el crecimiento de hongos hasta un 20%
10 de turbidez comparada con el crecimiento del control exento de fármaco, espectrofotométricamente.

Los valores de IC₈₀ se determinaron mediante el procedimiento de microdilución del caldo, basado sobre el NCCLS Approved Standard ("Estándar aprobado por la NCCLS) con las
15 siguientes pequeñas modificaciones ("Comité Nacional para Estándares Clínicos de Laboratorio") (1997). Un método de referencia para el ensayo de la susceptibilidad antifúngica por dilución del caldo, para levaduras. Estándar aprobado. Documento M27-A"). Se empleó el "Yeast Nitrogen Base" ("Ba-
20 se de nitrógeno para levaduras") (YNB; Difco Lab.) suplementado con 1% de glucosa y 0,25% de K₂HPO₄, como medio de ensayo para levaduras, y el mismo medio solidificado con 0,2% de agarosa de bajo punto de fusión (BRL), se empleó para los hongos filamentosos. El tamaño del inóculo fue de
25 1-3 x 10³ células/ml, y la incubación se efectuó durante 1-2 días a 35°C.

Tabla 2: Actividad antifúngica in vitro, IC₉₀ (µg/ml)

	Candida albicans	Aspergillus fumigatus	Scedosporium
	CY1002	CF1003	apiospermum
			CF1077
5	Aerotricino 132	0,28	2,9
	Aerotricino 134	0,37	0,58
	Aerotricino 135	0,41	0,37
	Aerotricino 136	0,33	0,37
		0,38	0,34

2. Eficacia antifúngica in vitro

10 2-1: Candidiasis sistémica en ratones.

La eficacia antifúngica in vivo de los aerotricinos de la presente invención contra la candidiasis sistémica, se muestra en la siguiente tabla 3-1. Se emplearon ratones de una cepa de ratón inmunocompetente convencional, Crj:CD-1 (ICR), para modelos de una infección experimental de candidiasis sistémica. Se emplearon ratones Crj:CD-1 (ICR) de 4 semanas de edad, para la candidiasis sistémica mediante la inyección de *Candida albicans* 5x10⁶ conidios/ratón en la vena caudal. Los compuestos de ensayo se administraron por vía intravenosa (i.v.), en una sola vez, inmediatamente después de la infección para la candidiasis sistémica. El día 7, se calcularon, para cada dosis, los valores del 50% de la dosis efectiva (ED₅₀), a partir del número de supervivientes.

25 Tabla 3-1: Actividad antifúngica in vivo, contra la candidiasis sistémica en ratones,

ED₅₀ (mg/kg) el día 7

Aerotricino 132	0,43
Aerotricino 133	0,35

Aerotricino 135 0,35

2-2: Aspergillosis pulmonar en ratones

La eficacia antifúngica in vivo de los aerotricinos de la presente invención contra la aspergillosis pulmonar, se muestra en la siguiente tabla 3-2. La aspergillosis pulmonar en ratones fue creada en ratones macho ICR tratados con cortisona (250 mg/kg, tratamiento subcutáneo en dos veces, en los 3 días antes y el mismo día de la infección). Se infectaron conidios de *A. fumigatus* ($2,5 \times 10^5$) intratraquealmente en estos ratones, y los tratamientos se efectuaron una vez diariamente durante 4 días. La eficacia de cada fármaco se determinó por el número de supervivientes, y se calculó el 50% de la dosis efectiva (ED_{50}) a partir del número de supervivientes en cada dosis a los 14 días.

Tabla 3-2: Actividad antifúngica in vivo contra la aspergillosis pulmonar en ratones,

ED_{50} (mg/kg) el día 14

Aerotricino 132	5,2
Aerotricino 134	5,8
Aerotricino 137	5,2
Aerotricino 3	> 15

3. Ensayo de hepatotoxicidad in vitro

Se aislaron hepatocitos de ratón mediante digestión con collagenasa y se cultivaron en placas de microtitulación. Las monocapas de hepatocitos se expusieron al ensayo con aerotricinos en el sistema de cultivo durante 1 día. Después del período de cultivo, los hepatocitos fueron observados con un microscopio y evaluados morfológicamente.

El grado de alteración morfológica (degeneración) de los hepatocitos en el ensayo de aerotricinos se comparó con WF11243 y LY303366.

Tabla 4: Citotoxicidad para los hepatocitos (µg/ml)

5	Aerotricino 132	> 100
	Aerotricino 134	> 100
	Aerotricino 135	> 100
	WF11243	100
	(= Aerotricino 3)	
10	LY303366	10

5 mg/kg y 30 mg/kg de administración de aerotricino 132 (una vez al día: i.v.) a ratones durante 2 semanas no mostraron ninguna toxicidad grave.

Por lo tanto, los nuevos aerotricinos de fórmula (I) así como las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos tienen una potente actividad antifúngica contra varias infecciones fúngicas, incluyendo la aspergillosis, en ratones en un amplio margen de dosificaciones y son útiles como agentes antifúngicos. Además, los aerotricinos proporcionados por esta invención son mucho menos citotóxicos para los hepatocitos que los conocidos derivados peptídicos cíclicos (WF11243 y LY303366).

Los aerotricinos de la presente invención pueden también ser útiles para la inhibición o alivio de las infecciones por Pneumocistis carinii en pacientes inmunocomprometidos.

La presente invención se refiere además a las composiciones farmacéuticas que contienen los nuevos aero-

trícinos de fórmula (I) así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los nuevos aerotricinos de fórmula (I) así como sus sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son agentes activos altamente fungicidas. Son activos contra una gran variedad de especies fúngicas incluyendo *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Scedosporium* ssp., *Mucor* ssp., y *Absidia* spp..

Así, los aerotricinos de la presente invención son útiles para tratamiento tópico y sistémico de micosis en animales así como en humanos. Por ejemplo, son de utilidad en el tratamiento tópico y mucósico de infecciones fúngicas causadas por *Candida* spp., *Trichophyton* spp., y *Microsporum* spp.. Pueden emplearse también en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas causadas por ejemplo, por *Candida* ssp., *Aspergillus* spp., ó *Scedosporium* spp..

Para el empleo clínico, los nuevos aerotricinos de fórmula (I) así como las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden ser administrados solos, aunque generalmente serán administrados en una mezcla farmacéutica formulada como apropiada para el uso particular y propósito deseado, mezclando el excipiente, agente aglomerante, lubricante, agente desintegrante, material de recubrimiento, emulsionante, agente para la suspensión, disolvente, estabilizante, potenciador de la absorción y/o base para ungüentos. La mezcla puede emplearse para administración oral, inyectable, nasal, rectal o tópica.

Las formulaciones farmacéuticas de los aerotrici-

nos para administración oral, pueden ser gránulos, comprimido, comprimido con recubrimiento de azúcar, cápsula, píldora, suspensión o emulsión. Para la inyección parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea, los

5 aerotricinos de fórmula (I) pueden emplearse en forma de una solución acuosa estéril la cual puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o glucosa para hacer la solución isotónica. Estas composiciones pueden ser presentadas también en una forma de dosificación unitaria en ampo-

10 llas o en envases multidosis, de preferencia con conservantes añadidos. Alternativamente, los ingredientes activos pueden ser en forma de polvo para ser reconstituídos con un vehículo adecuado antes de la administración. Los aerotricinos pueden ser administrados también en forma de un supo-

15 sitorio o pesario, o pueden ser aplicados tópicamente en forma de una loción, solución, crema, ungüento o polvo fino.

El nivel de dosificación diario de los aerotricinos de fórmula (I) es de 0,1 a 50 mg/kg (en dosis divididas) cuando son administrados tanto por una ruta oral como por una

20 ruta parenteral. Así, los comprimidos y cápsulas de aerotricinos pueden contener apropiadamente de 5 a 0,5 g de compuesto activo para la administración de uno solo, o dos o más a la vez. En cualquier caso, la dosificación real

25 puede determinarse por el médico y puede variarse según la edad, peso y respuesta del paciente particular.

Cuando los aerotricinos son para empleo antifúngico, puede emplearse cualquier método de administración. Para el

tratamiento de infecciones micóticas, se emplea habitualmente la administración oral o intravenosa.

Cuando los aerotricinos son para emplear para el control de infecciones pneumocísticas, es deseable tratar directamente el pulmón y los bronquios. Por esta razón, se prefieren los métodos de inhalación. Para la administración mediante inhalaciones o por vía nasal, los aerotricinos de la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de spray aerosol a partir de recipientes presurizados o nebulizadores. El sistema de suministro preferido para la inhalación o vía nasal es un aerosol para inhalación de dosis medida, la cual puede formularse como un polvo, suspensión o solución de un compuesto de fórmula (I) en propelentes adecuados tales como los fluorocarbonos o hidrocarburos.

Aunque los aerotricinos de la presente invención pueden ser empleados como comprimidos, cápsulas, composiciones tópicas, polvos para insuflación, supositorios y similares, la solubilidad de los aerotricinos de la presente invención en el agua y medios acuosos los convierten en adaptables para el empleo en formulaciones inyectables y también en composiciones líquidas adecuadas para sprays de aerosol.

Los siguientes ejemplos ilustran los métodos preferidos para la preparación de los aerotricinos de la presente invención, los cuales no se pretende que limiten el ámbito de la invención a los mismos.

En los siguientes ejemplos, los productos se analizaron y purificaron mediante HPLC empleando una columna de

fase invertida seleccionada de las que figuran en la relación de más adelante. El disolvente mezclado consistió en ácido trifluoroacético 0,05% - agua: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo, con la proporción adecuada descrita en cada ejemplo de trabajo.

Columnas de HPLC:

- Columna A: CAPCELL PAK C18, UG-120, 4,6 x 250 mm
- Columna B: CAPCELL PAK C18, UG-120, 10 x 250 mm
- Columna C: CAPCELL PAK C18, UG-80, 20 x 250 mm
- 10 Columna D: CAPCELL PAK C18, SG-120, 4,6 x 250 mm
- Columna E: CAPCELL PAK C18, SG-120, 10 x 250 mm
- Columna F: TSK GEL ODS-80Ts, 20 x 250 mm

En los siguientes ejemplos de trabajo, los aerotricinos se obtuvieron como sales de ácido tricloroacético, a no ser que se indique otra cosa.

Ejemplo de referencia 1

Preparación de los aerotricinos 1, 2 y 3

a) Fermentación sólida

Una porción de 0,1 ml del cultivo congelado de Deuteromycotina NR 7379 (FERM BP-6391) en 10% (v/v) de solución de glicerina se descongeló e inoculó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml de un medio consistente en glucosa 2%, almidón de patata 1%, glicerina 1,5%, Toast soya 1% (Nissin Seiyu), 0,35% de extracto de levadura
25 (Nippon Seiyaku), 0,25% de Polypepton (Nihon Seiyaku), 0,3% de NaCl, 0,5% de CaCO₃, 0,005% de ZnSO₄.7H₂O, 0,0005% de CuSO₄.5H₂O, y 0,0005% de MnSO₄.4H₂O. El pH del medio no se ajustó. El cultivo sembrado se incubó en un agitador rota-

tivo a 27°C durante 7 días a 220 rpm. 2 ml de cultivo sembrado se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 3 litros que contenía un medio sólido consistente en 200 g de cebada prensada, 0,12 g de extracto de levadura (Difco), 0,06 g de tartrato de sodio, 0,06 g de KH_2PO_4 y 120 ml de agua. La fermentación se efectuó a 27°C en condición estática. La producción alcanzó un máximo a alrededor de las 240 horas de fermentación y el cultivo se sometió al procedimiento de aislamiento de los aerotricinos 1, 2 y 3.

10 Al sólido cultivado (10 kg) obtenido, se le añadió metanol (40 litros) y la mezcla se agitó eliminándose a continuación por filtración para obtener el extracto de metanol (39 litros). El extracto de metanol así obtenido se concentró hasta sequedad a presión reducida, y el residuo
15 (64,8 g) se añadió a acetato de etilo (1 litro) y agua (1 litro). Y la mezcla se agitó, seguido por la eliminación de la capa de acetato de etilo.

Además, la capa acuosa se lavó igualmente con acetato de etilo (1 litro) dos veces. La capa acuosa restante se
20 extrajo con n-butanol (1 litro) tres veces: Los extractos así obtenidos se combinaron y concentraron a sequedad a presión reducida, y el residuo (28,5 g) se disolvió en una mezcla (250 ml) de acetonitrilo - ácido trifluoroacético acuoso 0,1% (1:1). Después de eliminar los materiales insolubles por centrifugación, la solución así obtenida se eva-
25 poró hasta sequedad a presión reducida y el residuo se añadió a metanol (300 ml) y la mezcla se agitó, seguido de la eliminación por filtración para obtener la solución en metanol

(280 ml). Los materiales solubles en metanol (9,3 g) así obtenidos fueron sometidos a continuación a una cromatografía de columna sobre sílica gel de fase invertida C18 (1 litro). La columna se eluyó en etapas empleando una mezcla
5 de metanol - ácido trifluoroacético acuoso 0,1% (2:8, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, y 8:2). Los aerotricinos 1, 2 y 3 eluidos en esta orden con metanol - ácido trifluoroacético acuoso 0,1% (7:3) se concentraron a sequedad al vacío para obtener un polvo blanco de la sal del ácido trifluoroacético del aerotricino 3 (731 mg) y la sal del ácido trifluoroacético del aerotricino 1 (747 mg), respectivamente. Las fracciones que
10 contenían el aerotricino 2 se concentraron a presión reducida y a continuación se purificaron por HPLC bajo las siguientes condiciones: columna: Capcell Pak C18 (d.i. 30 x 250 mm, Shiseido Co., LTD.); fase móvil: acetonitrilo - ácido trifluoroacético acuoso 0,1% (45:55); velocidad de flujo: 40 ml/minuto; detección: UV 220 nm). Los eluatos apropiados obtenidos en las condiciones antes mencionadas, se concentraron a sequedad al vacío para obtener un polvo
15 blanco de la sal del ácido trifluoroacético y el aerotricino 2 (42 mg).

b) Fermentación en matraz

Una porción de 2 ml del cultivo congelado del *Deuteromycotina* NR 7379 (FERM BP-6391) en solución al 10% (v/v)
25 con glicerina, se descongeló e inoculó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml de un medio consistente en 1% de glucosa, 1% de harina de avena, 4% de pasta de tomate, 0,5% de extracto de germen de trigo (*Ando kasei*), 0,001% de

FeSO₄.7H₂O, 0,001% de MnSO₄.4H₂O, 0,0001% de CaCl₂, 0,0002% de ZnSO₄.7H₂O, 0,00002% de (NH₄)₆MoO₂.4H₂O, y 0,00006% de H₃BO₃. El pH del medio se ajustó a 6,8 antes de la esterilización. El cultivo sembrado se incubó en un agitador rotativo a 27°C durante 3 días a 220rpm. 2 ml del primer cultivo sembrado se transfirió a matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml del mismo medio y se incubaron en un agitador rotativo en las mismas condiciones durante 3 días. 2 ml del segundo cultivo sembrado se inoculó en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de un medio consistente en 8,5% de glicerina, 1% de pectina de citrus, 0,4% de polvo de cacahuete, 0,4% de caseína de leche exenta de vitaminas, 0,4% de pasta de tomate, 0,4% de extracto de germen de trigo (Ando kasei), 0,2% de glicina, y 0,2% de KH₂PO₄. El pH del medio se ajustó a 7,0 antes de la esterilización. La fermentación se efectuó a 27°C con agitación a 220 rpm. Después de 10 días de cultivo, la producción alcanzó un máximo y todo el cultivo se sometió al procedimiento de aislamiento de los aerotricinos 1, 2 y 3.

20 c) Fermentación en tinajas

Una porción de 2 ml de cultivo congelado de *Deuteromycotina* NR 7379 (FERM BP-6391) en solución al 10% de glicerina (v/v) se descongeló y se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml del mismo medio de siembra como el descrito más arriba. El matraz se sacudió a 220 rpm durante 3 días a 27°C. 2 ml del primer cultivo sembrado se transfirió en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml del mismo medio de siembra y se incubó en un

agitador rotativo en las mismas condiciones durante 3 días. Seiscientos ml del segundo cultivo de siembra se inocularon en una tinaja de fermentación de 50 litros que contenía 30 litros del mismo medio de producción como se ha descrito más arriba y 0,4% de disfoam (Nissan Disfoam CA-123). La fermentación se efectuó a 27°C, con una aireación de 30 litros/minuto y una agitación de 400 rpm. La producción alcanzó un máximo alrededor de las 168 horas de fermentación, y todo el cultivo se sometió al procedimiento de aislamiento de los aerotricino 1, 2 y 3.

Aerotricino 1

- 1) Aspecto:
Sólido blanco
- 2) Peso molecular (método FAB-MS):
15 m/z 1547 (M+H)⁺
- 3) Fórmula molecular:
 $C_{72}H_{118}N_{14}O_{23}$
- 4) Espectroscopia de masas de alta resolución
(para M+H)⁺:
20 Encontrado: 1547.8568
Calculado para $C_{72}H_{118}N_{14}O_{23}$: 1547.8572
- 5) Espectro UV (fig. 1): en metanol:
 $\lambda(\epsilon)_{\max}(\text{en MeOH}): 225 \pm 5$ (10600 sh), 270 ± 5 (2000),
 278 ± 5 (2100)
25 $\lambda(\epsilon)_{\max}(\text{en NaOH N/10-MeOH}): 240 \pm 5$ (7700), 268 ± 5
(1800), 298 ± 5 (1800)
- 6) Espectro IR (KBr) (fig. 2):
Los números de onda (cm^{-1}) de la absorción princi-

pal son como sigue:

3379, 2927, 2855, 1740, 1660, 1535, 1453, 1203,
1139, 837

7) Espectro ^1H -RMN (fig. 3):

5 400 MHz, en CD_3OD

8) Espectro ^{13}C -RMN (fig. 4):

100 MHz, en CD_3OD

9) Solubilidad:

Soluble: agua, metanol, sulfóxido de dimetilo

10 10) Reacción coloreada:

Positivo: ninhidrina, anisaldehído-ácido sulfúrico,
vapores de yodo, vainillina-ácido sulfúrico,
reactivo de Rydon-Smith, ácido molibdofosfórico

15 Negativo: reactivo de Sakaguchi, verde de bromo-
cresol, 2,4-dinitrofenilhidrazina-ácido sulfúrico

11) Cromatografía en capa fina (TLC):

Soporte	Disolvente	R _f
Silicagel F254 ¹	n-BuOH:acetona:AcOH:H ₂ O (4:5:1:1)	0,74
	MeOH:H ₂ O (95:5)	0,12

20

¹ E. Merck AG., Alemania

12) Cromatografía líquida de alta resolución:

Soporte: Capcell Pak C18 gel S120A, 4,6x250mm
(fabricada por Shiseido, Co., LTD)

25 Fase móvil: acetonitrilo: ácido trifluoroacético
acuoso 0,05%

Velocidad de flujo: 1 ml/minuto

R_t = 12,1 ± 0,5

13) Análisis de aminoácidos:

Se calentó el aerotricino 1 a 120°C en HCl 6N durante 24 horas, y a continuación se sometió al análisis de aminoácidos para detectar la treonina, 3 unidades de allo-treonina, glicina, alanina, valina, tirosina, ornitina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, 3-hidroxiglutamina.

Aerotricino 2

- 1) Aspecto:
Sólido blanco
- 2) Peso molecular (método FAB-MS):
 m/z 1549 $(M+H)^+$
- 3) Fórmula molecular:
 $C_{71}H_{116}N_{14}O_{24}$
- 4) Espectroscopia de masas de alta resolución
(para $M+H$)⁺:
Encontrado: 1549.8384
Calculado para $C_{71}H_{117}N_{14}O_{24}$: 1549.8365
- 5) Espectro UV (fig. 5): en metanol:
 $\lambda(\epsilon)_{\max}$ (en MeOH): 225±5 (10200 sh), 275±5 (1900), 278±5 (2000)
 $\lambda(\epsilon)_{\max}$ (en NaOH N/10-MeOH): 240±5 (7700), 293±5 (2000)
- 6) Espectro IR (KBr) (fig. 6):
Los números de onda (cm^{-1}) de la absorción principal son como sigue:
3323, 2928, 2856, 1740, 1670, 1531, 1450, 1203, 1137, 837

- 7) Espectro ^1H -RMN (fig. 7):
400 MHz, en CD_3OD
- 8) Espectro ^{13}C -RMN (fig. 8):
100 MHz, en CD_3OD
- 5 9) Solubilidad:
Soluble: agua, metanol, sulfóxido de dimetilo
- 10 10) Reacción coloreada:
Positivo: ninhidrina, anisaldehído-ácido sulfúrico, vapores de yodo, vainillina-ácido sulfúrico, reactivo de Rydon-Smith, ácido molibdofosfórico
Negativo: reactivo de Sakaguchi, verde de bromocresol, 2,4-dinitrofenilhidrazina-ácido sulfúrico
- 11) Cromatografía en capa fina (TLC):
- | | Soporte | Disolvente | Rf |
|----|------------------------------|---|------|
| 15 | Silicagel F254 ^{*1} | n-BuOH:acetona:AcOH:H ₂ O
(4:5:1:1) | 0,29 |
| | | MeOH:H ₂ O (95:5) | 0,15 |
- ^{*1} E. Merck AG., Alemania
- 12) Cromatografía líquida de alta resolución:
- 20 Soporte: Capcell Pak C18 gel S120A, 4,6 x 250mm
(fabricada por Shiseido, Co., LTD)
Fase móvil: acetonitrilo: ácido trifluoroacético acuoso 0,05% = 1:1
Velocidad de flujo: 1 ml/minuto
- 25 Rt = 9,9 ± 0,5
- 13) Análisis de aminoácidos:
Se calentó el aerotricino 2 a 120°C en HCl 6N durante 24 horas, y a continuación se sometió al análisis de

aminoácidos para detectar la treonina, 3 unidades de allo-treonina, glicina, alanina, valina, 3-hidroxitirosml (DOPA), ornitina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, 3-hidroxi glutamina.

5 Aerotricino 3

1) Aspecto:

Sólido blanco

2). Peso molecular (método FAB-MS):

m/z 1533 (M+H)⁺

10 3) Fórmula molecular:

C₇₁H₁₁₆N₁₄O₂₃

4) Espectro UV: en metanol:

λ(ε)max (en MeOH): 225±5 (11000 sh), 275±5 (2000),
280±5 (1900)

15 λ(ε)max (en NaOH N/10-MeOH): 243±5 (7800), 295±5
(1800)

5) Espectro IR (KBr):

Los números de onda (cm⁻¹) de la absorción principal son como sigue:

20 3334, 2928, 2852, 1742, 1662, 1520, 1449, 1202,
1136, 836

6) Solubilidad:

Soluble: agua, metanol, sulfóxido de dimetilo

7) Reacción coloreada:

25 Positivo: ninhidrina, anisaldehído-ácido sulfúrico, vapores de yodo, vainillina-ácido sulfúrico, reactivo de Rydon-Smith, ácido molibdofosfórico
Negativo: reactivo de Sakaguchi, verde de bromo-

cresol, 2,4-dinitrofenilhidrazina-ácido sulfúrico

8) Cromatografía en capa fina (TLC):

	Soporte	Disolvente	Rf
	Silicagel F254 ¹	n-BuOH:acetona:AcOH:H ₂ O	0,26
5		(4:5:1:1)	
		MeOH:H ₂ O (95:5)	0,12

¹ E. Merck AG., Alemania

9) Cromatografía líquida de alta resolución:

Soporte: Capcell Pak C18 gel S120A, 4,6x250 mm
(fabricada por Shiseido, Co., LTD)
Fase móvil: acetonitrilo: ácido trifluoroacético
acuoso 0,05% = 1:1
Velocidad de flujo: 1 ml/minuto
Rt = 9,1 ± 0,5

10) Análisis de aminoácidos:

Se calentó el aerotricino 3 a 120°C en HCl 6N durante 24 horas, y a continuación se sometió al análisis de aminoácidos para detectar la treonina, 3 unidades de allo-treonina, glicina, alanina, valina, tirosina, ornitina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, 3-hidroxiglutamina.

Ejemplo 1

Preparación del aerotricino 132

(a) A una mezcla de aerotricino 3 (500 mg, 0,326 mmoles) y trietilamina (628 µl, 4,89 mmoles) en MeOH (10 ml), se añadió acrilonitrilo (214 µl, 3,27 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de evaporar el disolvente al vacío, se

disolvió el residuo en n-butanol y se lavó con ácido clorhídrico diluido y agua sucesivamente. La capa orgánica se evaporó al vacío. El residuo crudo se purificó mediante HPLC invertida preparativa, y las condiciones detalladas de la misma se muestran más adelante. Las fracciones apropiadas se juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 207 mg de aerotricino 120 (compuesto de fórmula (I) en donde R^2 y R^3 son hidrógeno y R_1 es (2-cianoetil)-amino) en forma de un sólido amorfo incoloro.

10 HPLC (T.r.) 27,5 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 53,47); FAB-MS (m/z): 1586 [M+H]⁺.

(b) A una solución agitada de Boc-L-Orn(Boc)-OH (46 mg, 0,138 mmoles) en DMF (2 ml) se añadió reactivo BOP (62 mg, 0,14 mmoles), HOBT hidrato (22 mg, 0,144 mmoles) y N-etildiidisopropilamina (24 µl, 0,138 mmoles). Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadió una solución de aerotricino 120 (100 mg, 0,063 mmoles) y N-etildiidisopropilamina (24 µl, 0,138 mmoles) en DMF (2 ml) a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 20 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó al vacío.

Una solución del residuo crudo obtenido más arriba en TFA (3 ml) se agitó a 0°C durante 30 minutos. El recipiente de reacción se abrió y se evaporó el TFA en una corriente de nitrógeno seco. El residuo se purificó mediante HPLC de fase invertida preparativa, las condiciones detalladas de la cual se muestran más adelante. Las fracciones puras se

juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 60,5 mg del compuesto 1 en forma de un sólido amorfo incoloro.

HPLC (T.r.) 20,7 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 57:43); FAB-MS (m/z):1700 [M+H]⁺.

(c) A una mezcla del compuesto 1 (60,5 mg, 0,0356 mmoles) en dioxano (2 ml) y agua (2 ml) se añadió paladio 10% sobre carbón (10 mg), y el recipiente de reacción se llenó con hidrógeno. Después de agitar durante 14 horas a temperatura ambiente, la mezcla se filtró a través de un filtro de membrana (tamaño de poro: 0,2 mm) y el disolvente se evaporó al vacío. El residuo crudo se purificó mediante HPLC invertida preparativa, cuyas condiciones detalladas se indican a continuación. Las fracciones apropiadas se juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 27,8 mg de aerotricino 132 en forma de un sólido amorfo incoloro.

HPLC (T.r.) 18,9 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 60:40); FAB-MS (m/z):1704 [M+H]⁺.

Ejemplo 2

Preparación del aerotricino 134

(a) A una solución agitada de Fmoc-L-Orn(Boc)-OH (379 mg, 0,834 mmoles) en DMF (6 ml) se añadió reactivo BOP (368 mg, 0,832 mmoles), HOBT hidrato (128 mg, 0,836 mmoles) y N-etildiidisopropilamina (145 µl, 0,832 mmoles). Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadió

una solución de aerotricino 120 (600 mg, 0,378 mmoles) y N-etildiidisopropilamina (145 µl, 0,832 mmoles) en DMF (3 ml) a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 18 horas a temperatura ambiente, se añadió piperidina (3 ml) a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó al vacío. El residuo se lavó con diclorometano y dietiléter para eliminar los reactivos. El producto crudo se utilizó para el próximo paso sin purificación posterior.

10 (b) A una solución del producto crudo (320 mg) obtenido más arriba en MeOH (10 ml) se añadieron éster terciutílico del ácido (2-oxo-etil)carbámico (crudo, 530 mg), AcOH (2 ml) y NaBH₄CN (210 mg, 3,342 mmoles) en MeOH (4 ml). Después de agitar la mezcla durante 20 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se disolvió en n-butanol y se lavó con ácido clorhídrico diluido y agua sucesivamente. La capa orgánica se evaporó al vacío.

Una solución del residuo crudo obtenido más arriba en TFA (6 ml) se agitó a 0°C durante 30 minutos. El recipiente de reacción se abrió y se evaporó el TFA en una corriente de nitrógeno seco. El residuo se purificó mediante HPLC invertida preparativa, cuyas condiciones detalladas se muestran más adelante. Las fracciones apropiadas se juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 88,2 mg del compuesto 2 en forma de un sólido amorfo de color blanco.

HPLC (T.r.) 22,4 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: áci-

do trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 60:40);

(c) A una mezcla del compuesto 2 (88,2 mg, 0,0494 mmoles) en dioxano (1,5 ml) y agua (1,5 ml) se añadió paladio 10% sobre carbón (20 mg), y el recipiente de reacción se llenó con hidrógeno. Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, la mezcla se filtró a través de un filtro de membrana (tamaño de poro: 0,2 mm) y el disolvente se evaporó al vacío. El residuo crudo se purificó mediante HPLC invertida preparativa, cuyas condiciones detalladas se indican a continuación. Las fracciones apropiadas se juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 22,0 mg de aerotricino 134 en forma de un sólido amorfo incoloro.

HPLC (T.r.) 25,7 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 63:37); FAB-MS (m/z):1790 [M+H]⁺.

Ejemplo 3

Preparación del aerotricino 135

El aerotricino 135 se preparó de acuerdo con un método similar al descrito en el ejemplo 2:

HPLC (T.r.) 25,5 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 63:37); FAB-MS (m/z):1790 [M+H]⁺.

Ejemplo 4

Preparación del aerotricino 136

(a) A una solución agitada de Fmoc-L-Orn(Boc)-OH (379 mg, 0,834 mmoles) en DMF (6 ml) se añadió reactivo BOP (368

mg, 0,832 mmoles), HOBT hidrato (128 mg, 0,836 mmoles) y N-etildiisopropilamina (145 μ l, 0,832 mmoles). Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadió una solución de aerotricino 120 (600 mg, 0,378 mmoles) y N-etildiisopropilamina (145 μ l, 0,832 mmoles) en DMF (3 ml) a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 18 horas a temperatura ambiente, se añadió piperidina (3 ml) a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó al vacío. El residuo se lavó con diclorometano y dietiléter para eliminar los reactivos. El producto crudo se utilizó para el próximo paso sin purificación posterior.

(b) A una solución del producto crudo (300 mg) obtenido más arriba en EtOH (10 ml) se añadieron acrilonitrilo (110 μ l, 1,68 mmoles) y N-etildiisopropilamina (44 μ l, 0,253 mmoles). Después de agitar la mezcla durante 14 horas a temperatura ambiente, se añadieron acrilonitrilo (440 μ l, 6,72 mmoles) y N-etildiisopropilamina (44 μ l, 0,253 mmoles). Después de agitar la mezcla durante 22 horas a temperatura ambiente, se añadieron acrilonitrilo (220 μ l, 3,36 mmoles) y N-etildiisopropilamina (44 μ l, 0,253 mmoles). Después de agitar la mezcla durante 6 horas a temperatura ambiente, se concentró al vacío la mezcla de reacción. El residuo se lavó con diclorometano y dietiléter para eliminar los reactivos.

Una solución del residuo crudo obtenido más arriba en TFA (3 ml) se agitó a 0°C durante 30 minutos. El recipiente de reacción se abrió y se evaporó el TFA en una corriente

de nitrógeno seco. El residuo se purificó mediante HPLC invertida preparativa, cuyas condiciones detalladas se muestran más adelante. Las fracciones apropiadas se juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 104,6 mg del compuesto 3 en forma de un sólido amorfo de color blanco.

HPLC (T.r.) 27,8 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 57:43).

(c) A una mezcla del compuesto 3 (104,6 mg, 0,0596 mmoles) en dioxano (3 ml) y agua (3 ml) se añadió paladio 10% sobre carbón (25 mg), y el recipiente de reacción se llenó con hidrógeno. Después de agitar durante 16 horas a temperatura ambiente, la mezcla se filtró a través de un filtro de membrana (tamaño de poro: 0,2 mm) y el disolvente se evaporó al vacío. El residuo crudo se purificó mediante HPLC invertida preparativa, cuyas condiciones detalladas se indican a continuación. Las fracciones apropiadas se juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 40,3 mg de aerotricino 136 en forma de un sólido amorfo incoloro.

HPLC (T.r.) 25,8 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 63:37); FAB-MS (m/z):1761 [M+H]⁺.

Ejemplo 5

Preparación del aerotricino 133

(a) A una solución de la sal de aerotricino 3 de mono TFA (2,5 g), en DMF (10 ml) se añadieron Fmoc-D-Orn(Boc)OH (850 mg), BOP (180 mg), HOBT (279 mg) y N-etildisopropil-

amina (0,795 ml). Después de agitar la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente, se añadió piperidina (4,0 ml). La agitación se continuó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se evaporó el disolvente al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano, y la adición gota a gota de éter proporcionó el producto crudo en forma de un polvo amorfo de color blanco. Se lavó con éter y se empleó en el próximo paso sin posterior purificación.

10 (b) El producto crudo obtenido más arriba, se disolvió en DMF (20 ml). A esta solución se añadió Boc-L-Orn(Boc)OH (656 mg), BOP (872 mg), HOBT (302 mg) y N-etildiisopropilamina (0,793 ml). Después de agitó la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente, el disolvente se
15 evaporó al vacío.

 (c) Se añadió TFA (15 ml) a 0°C al residuo obtenido más arriba. Después de agitar la mezcla durante 30 minutos a 0°C, se añadió éter gota a gota, obteniéndose un precipitado de color blanco. Se lavó con éter y se purificó mediante HPLC preparativa de fase invertida. Las fracciones puras se juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 515 mg de aerotricino 133 en forma de un sólido amorfo incoloro.

 HPLC (T.r.) 19,7 minutos (columna F, velocidad de
25 flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05%: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 60:40); FAB-MS (m/z):1761 [M+H]⁺.

Ejemplo 6

Preparación del aerotricino 137

(a) A una solución de la sal de aerotricino 3 de mono TFA (622 mg), en diclorometano (16 ml) y MeOH (4 ml) se añadieron N-Boc-aminoetanal (120 mg) y N-etildiisopropilamina (0,072 ml). Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadió a la mezcla de reacción cianoborohidruro de sodio (48 mg) y ácido sulfúrico (0,04 ml). Después de agitar la mezcla de reacción durante 72 horas a temperatura ambiente, se evaporó el disolvente al vacío y a continuación se añadió HCl 0,1 N. Se extrajo con nBuOH y se concentró.

(b) El residuo se disolvió en DMF (6 ml) al cual se había añadido ácido 2-(S)-[bis-(2-Boc-aminoetil)amino]-5-Boc-pentanoico (294 mg), HOAt (77 mg), HBTU (215 mg) y N-etildiisopropilamina (0,148). Después de agitar durante 48 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó al vacío, y el residuo se disolvió en diclorometano. A esta solución se añadió éter obteniéndose un precipitado de color blanco. Se lavó con éter y se empleó en el próximo paso sin posterior purificación.

(c) A continuación, se añadió TFA (3 ml) al compuesto obtenido más arriba a 0°C. Después de agitar durante 30 minutos a 0°C, se añadió éter a la mezcla de reacción, obteniéndose un precipitado de color blanco. Se lavó con éter y se purificó mediante HPLC preparativa de fase invertida. Las fracciones puras se juntaron, se congelaron y liofilizaron obteniéndose 95 mg de aerotricino 137 en forma de un sólido amorfo incoloro.

HPLC (T.r.) 14,6 minutos (columna F, velocidad de flujo: 10 ml/min, eluyente: ácido trifluoroacético 0,05% - agua: ácido trifluoroacético 0,05% - acetonitrilo = 61:39); FAB-MS (m/z): 1776 $[M+H]^+$.

5

Ejemplo A

Se prepararon soluciones inyectables conteniendo cada una de ellas los siguientes ingredientes, en la forma convencional per se:

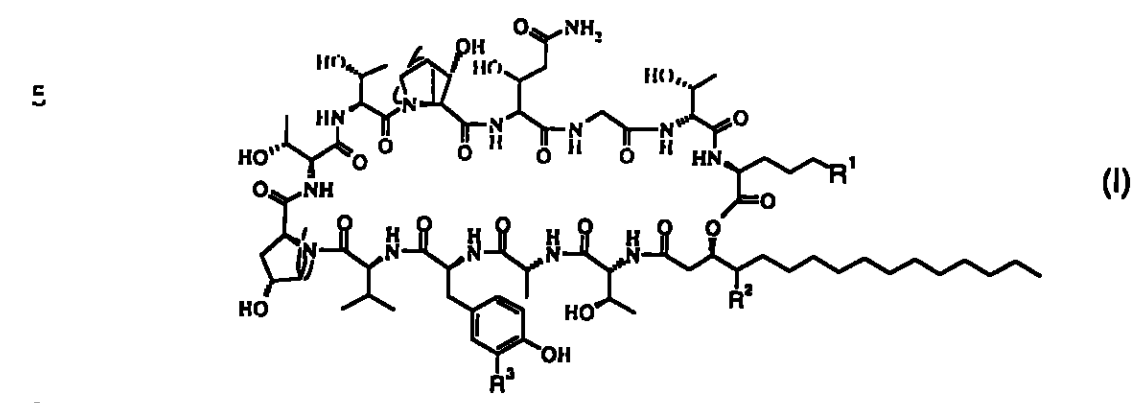
	Aerotricino 132	20	mg
10	Fosfato disódico, anhidro	7,6	mg
	Difosfato de sodio dihidrato	2,0	mg
	Alcohol etílico	150	mg
	Agua destilada, desionizada, estéril	850	mg
	Total	1029,6	mg

15

★ ★ ★ ★ ★

REIVINDICACIONES

1. Aerotricinos representados por la fórmula (I),



en donde

R¹ es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril] amino, N-(3-aminopropil)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-amino-
15 [N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[-5-amino-2-
[N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino, N-(2-aminoetil)-N-
[-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino u ornitil-ornitilamino;

R² es hidrógeno o metilo;

R³ es hidrógeno o hidroxilo;

20 y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. Aerotricino de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R¹ es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-
25 aminoetil)amino] valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino, N-(2-aminoetil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-

aminoetil)amino]valeril]amino, ó (L)-ornitil-(D)-ornitil-amino.

3. Aerotricinos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde R^2 y R^3 son hidrógeno.

5 4. Aerotricino de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril]amino.

5. Aerotricino de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R^1 es (L)-ornitil-(D)-
10 ornitilamino.

6. Aerotricino de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino.

7. Aerotricino de acuerdo con una cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 3, en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino.

8. Aerotricino de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino.

20 9. Aerotricino de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R^1 es N-(2-aminoetil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino.

10. Aerotricino de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde R^1 es N-(3-aminopropil)-N-
25 [(2S)-2,5-diaminovaleril]amino, y R^2 y R^3 son hidrógeno.

11. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la reivindicación 4, el cual procedimiento comprende (a) la N-alquilación de un compuesto de fórmula (II)

[en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido en la reivindicación 1] con acrilonitrilo, (b) acilación del compuesto resultante con ornitina N-protegida, (c) eliminación de los grupos de protección de los radicales amino (P_1 y P_2) y (d) reducción del grupo ciano.

12. Un procedimiento para la preparación de los compuestos de las reivindicaciones 6 y 7, el cual procedimiento comprende (a) la N-alquilación de un compuesto de fórmula (II) [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido en la reivindicación 1] con acrilonitrilo, (b) acilación del compuesto resultante con ornitina N-protegida, (c) eliminación del grupo de protección del radical amino adyacente al grupo cetónico (P_1), (d) N-alquilación reductora con amino-acetaldehído N-protegido, (e) eliminación del grupo de protección del radical amino restante (P_2), y (f) reducción del grupo ciano.

13. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la reivindicación 9, el cual procedimiento comprende (a) la N-alquilación reductora de un compuesto de fórmula (II) [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido en la reivindicación 1] con amino-acetaldehído N-protegido, (b) acilación del compuesto resultante con ornitina N-protegida, (c) eliminación del grupo de protección del radical amino adyacente al grupo cetónico (P_1), (d) N-alquilación reductora con amino-acetaldehído N-protegido, (e) eliminación del grupo de protección del radical amino restante (P_2), y (f) reducción del grupo ciano.

14. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la reivindicación 8, el cual procedimiento comprende (a) la N-alquilación de un compuesto de fórmula (II) [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido en la reivindicación 1] con acrilonitrilo, (b) acilación del compuesto resultante con ornitina N-protegida, (c) eliminación del grupo de protección del radical amino, adyacente al grupo cetónico (P_1), (d) N-alquilación con acrilonitrilo, (e) eliminación del grupo de protección del radical amino restante (P_2), y (f) reducción del grupo ciano.

15. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la reivindicación 5, el cual procedimiento comprende (a) la acilación de un compuesto de fórmula (II) [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 son como se ha definido en la reivindicación 1] con ornitina N-protegida, (b) eliminación del grupo de protección del radical amino adyacente al grupo cetónico (P_1), (c) acilación con ornitina N-protegida, y (d) eliminación del grupo de protección del radical amino restante (P_2).

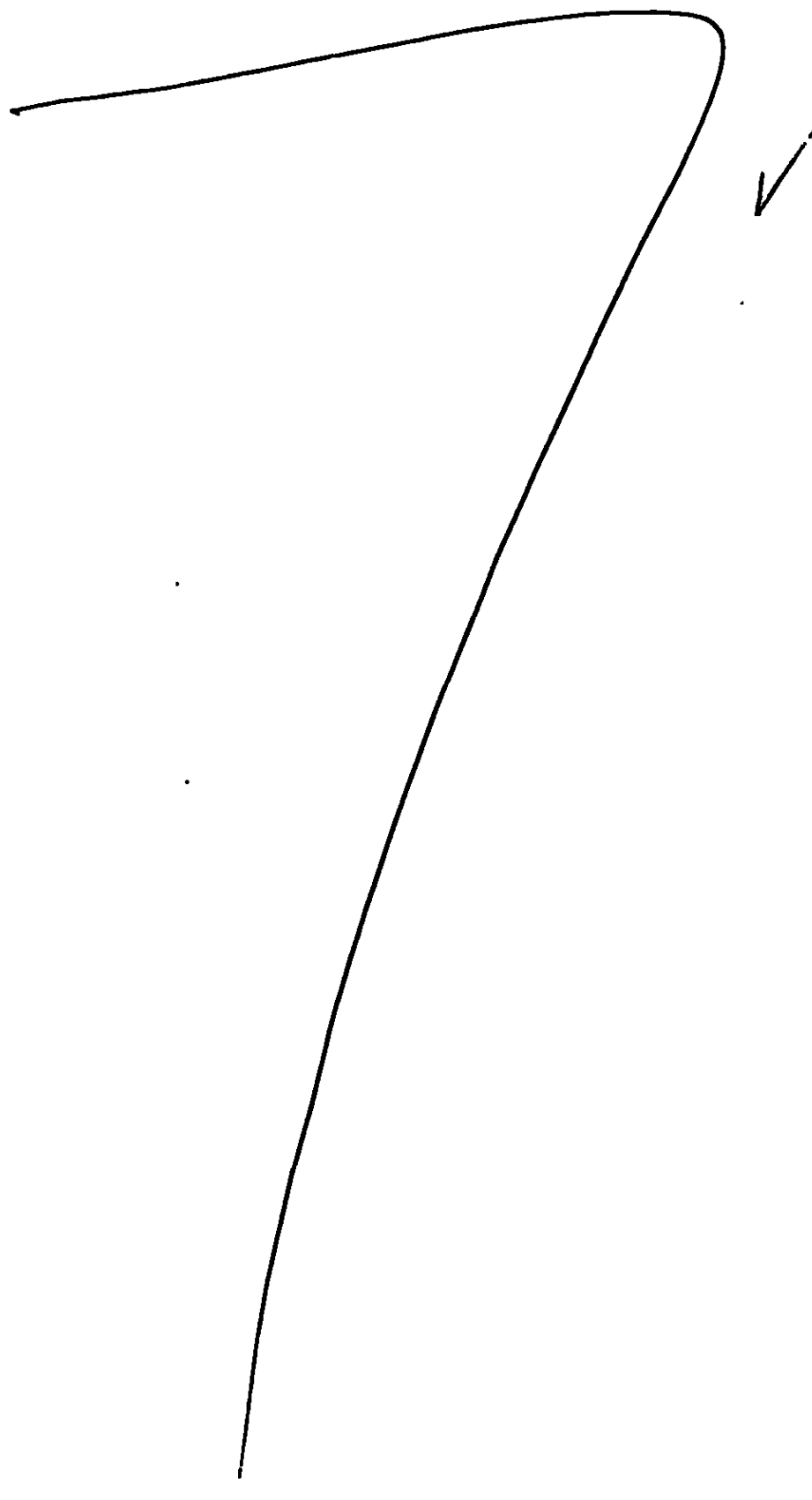
20 16. Aerotricinos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para el empleo en terapia médica.

17. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y una carga farmacéuticamente aceptable.

25 18. El empleo de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la preparación de medicamentos para el tratamiento o profilaxis de micosis.

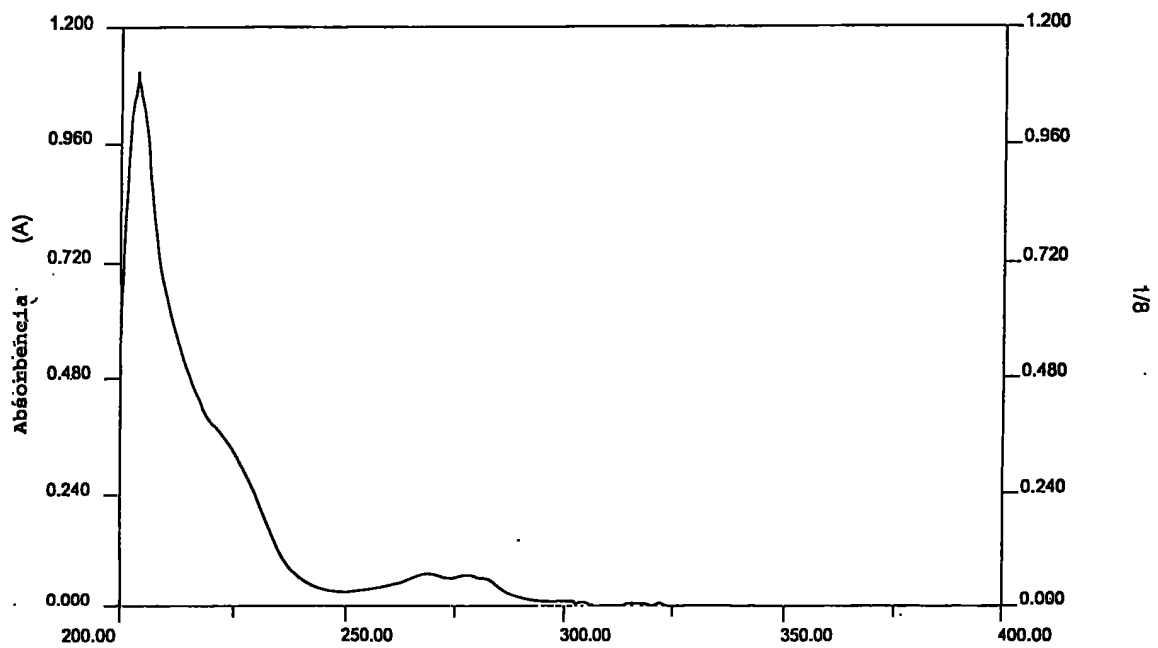
19. Un método para el tratamiento profiláctico y/o

terapéutico de enfermedades infecciosas causadas por micro-organismos patogénicos, el cual comprende la administración de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, a un ser humano o un animal.



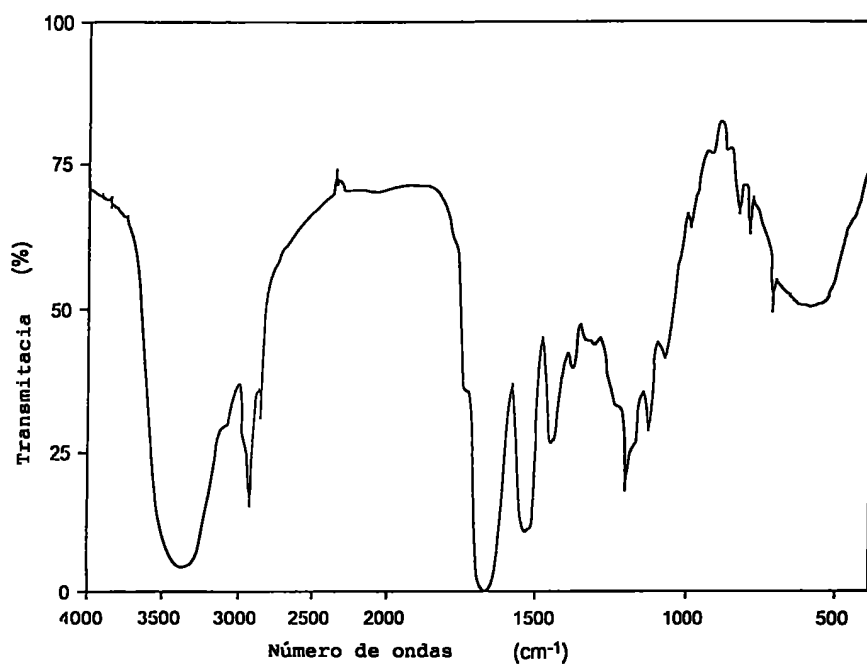
57

Fig. 1



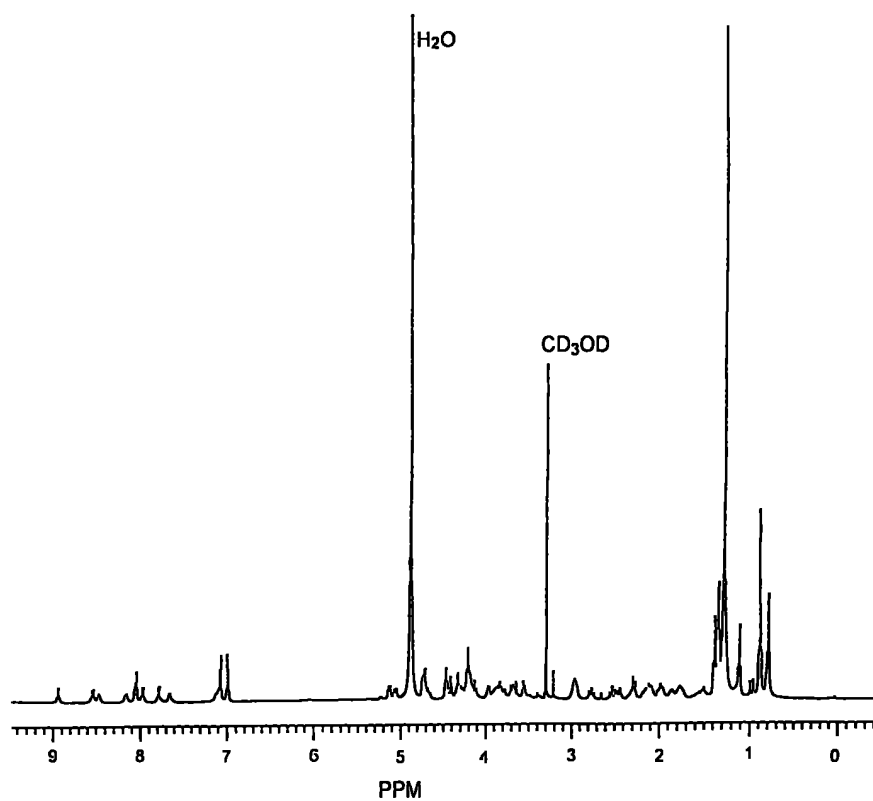
58

Fig. 2



59

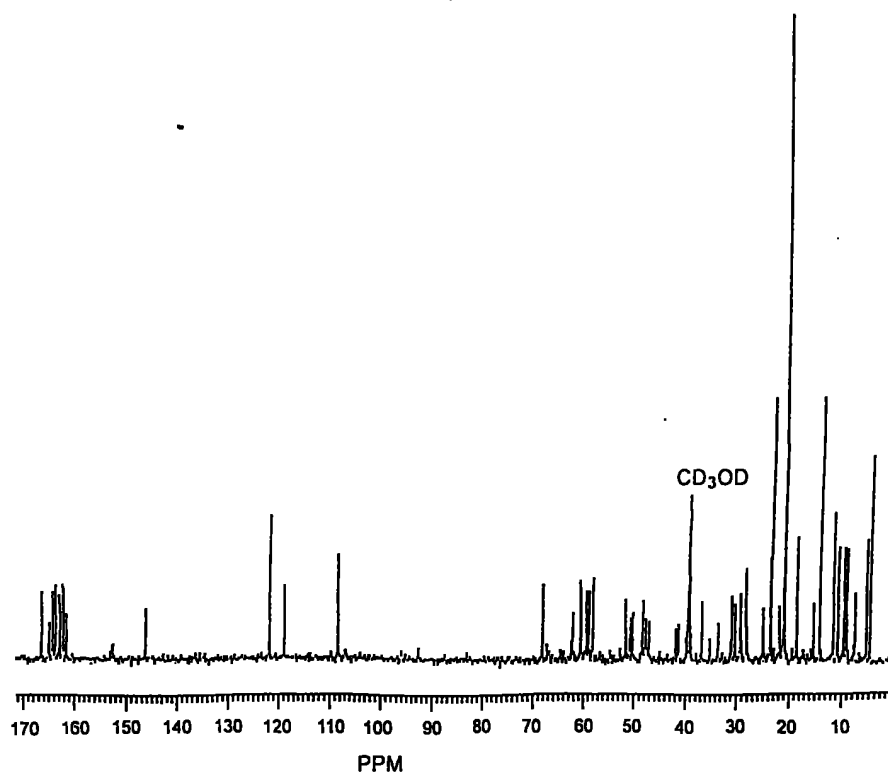
Fig. 3



3/8

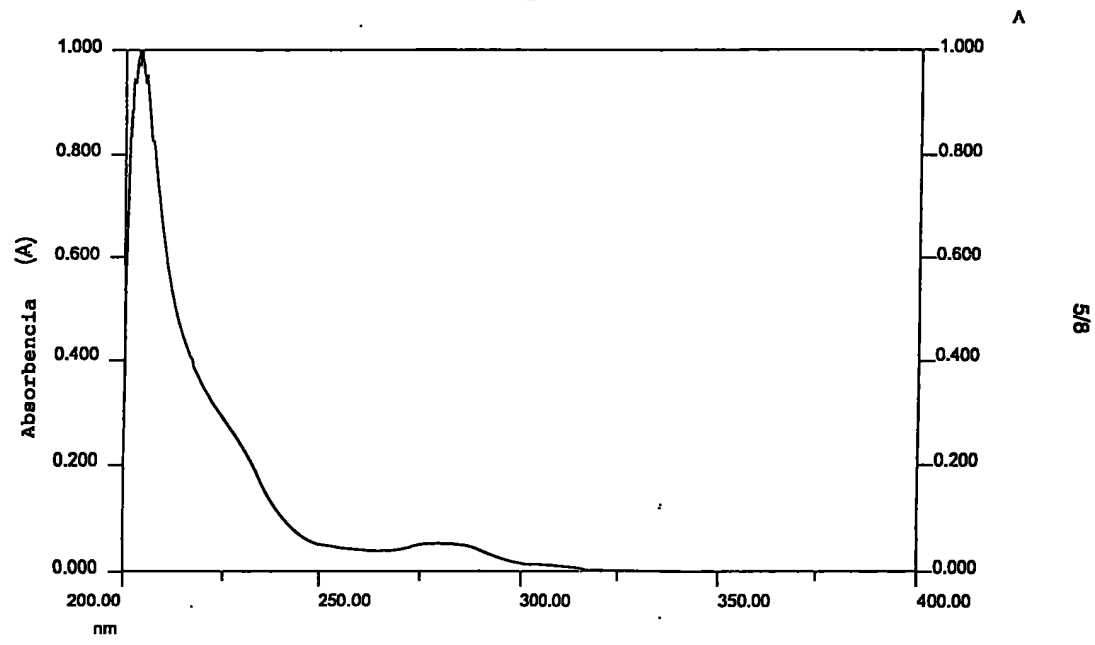
59

Fig. 4



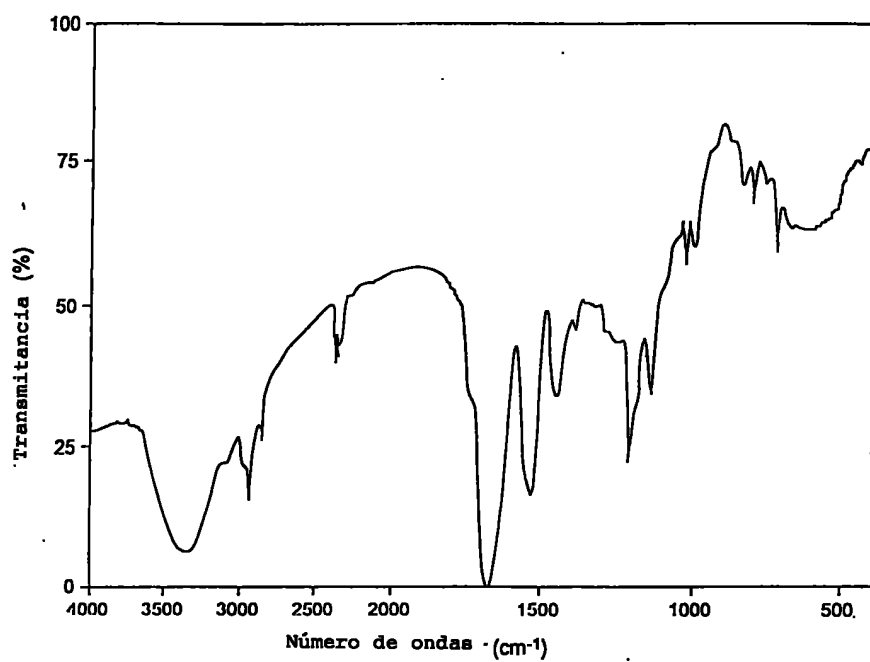
~~60~~

Fig. 5



10

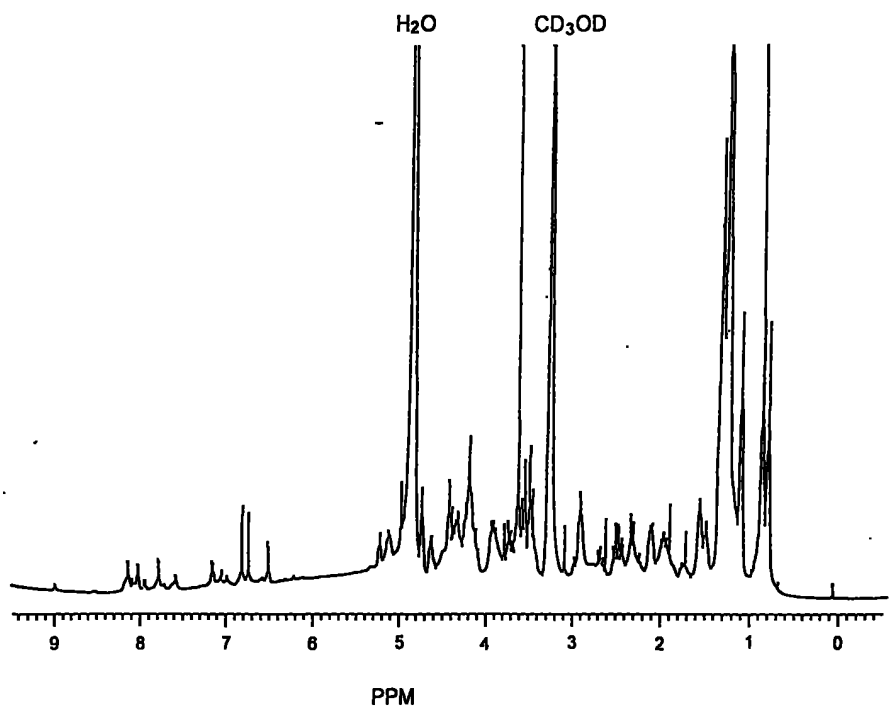
Fig. 6



8/9

20

Fig. 7

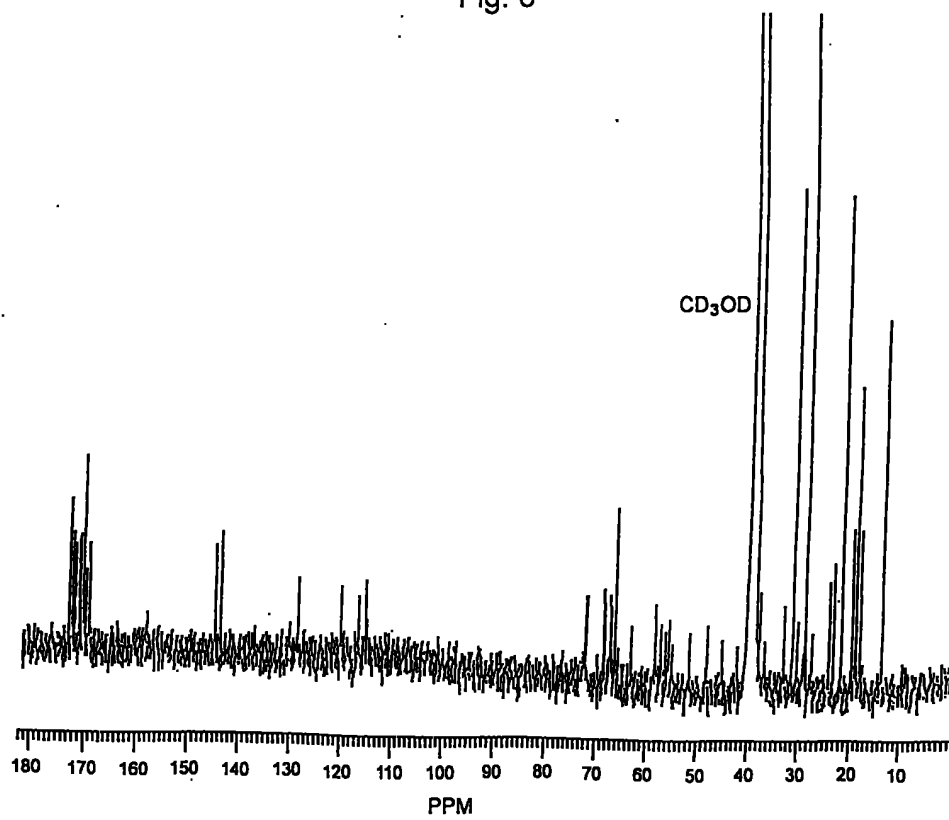


7/8

83

64

Fig. 8



8/8

68

Foto 65
Para publicação
202050 Nov 5 2002.

Foto 66467
targetor
Aiz

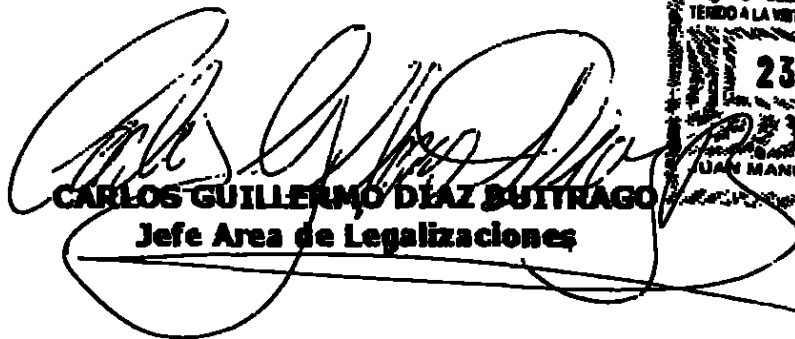
**EL SUSCRITO JEFE DEL AREA DE
LEGALIZACIONES DEL MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES**

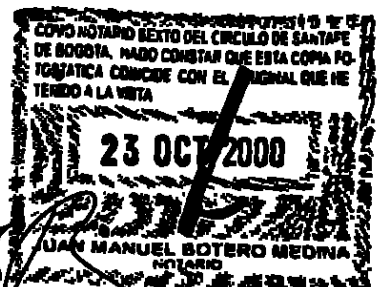
C E R T I F I C A

Que revisados los registros que se llevan en la oficina de Legalizaciones aparece la firma de la señora **MARIA LUISA DE BRIGARD DE RESTREPO**, como traductora e intérprete oficial para los idiomas **INGLES - ESPAÑOL, ESPAÑOL-INGLES**, según resolución 0793 del 21 de marzo de 1958

La anterior certificación se expide a solicitud de la interesada quien se identificó con cédula de ciudadanía No. 20.024.691 expedida en Santa Fe de Bogotá.

Dada en Santa Fe de Bogotá, D.C. a los veinticinco (25) días de marzo de 1999


CARLOS GUILLERMO DIAZ BUITRAGO
Jefe Area de Legalizaciones



66 89
F. Hoffmann
20532

TRADUCCION OFICIAL No. 5.794

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación se sella con el sello
del Traductor al mismo tiempo que la presente. -

Oficina Europea de Patentes
Certificado

TRADUCCION OFICIAL No. 5.794
Marta Lores Brizuela
Intérprete Oficial
antes del Sr. de la Haya

Los documentos anexos son copias exactas de la solicitud de patente europea descrita en
las páginas siguientes, tal como fue presentada originalmente.

Solicitud de Patente No. 00100807.7 ✓

Por el Presidente de la Oficina Europea de
Patentes

(Firma)

LLC. HATTEN-BECKMAN

LA HAYA, 1/11/00 ✓

PAGINA 2 DEL CERTIFICADO

Solicitud No. 00100807.7

Fecha de Presentación: 17/1/00

Solicitantes:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

4070 Basilea

SUIZA

Título de la Invención:

Compuestos cíclicos novedosos

20
67

PROSECUTOR, OFFICIAL NO. 5.794
Eduardo Luján Rodríguez de Roldán
Intervención Oficial
Cm. No. 0758 del Mto. de Justicia

Prioridades reivindicadas:

Estado

Fecha

No. de Registro:

Clasificación Internacional de Patentes:

**Estados contratantes designados en la fecha de presentación: AT/BE/CH/CY/DE/
DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE**

Anotaciones:

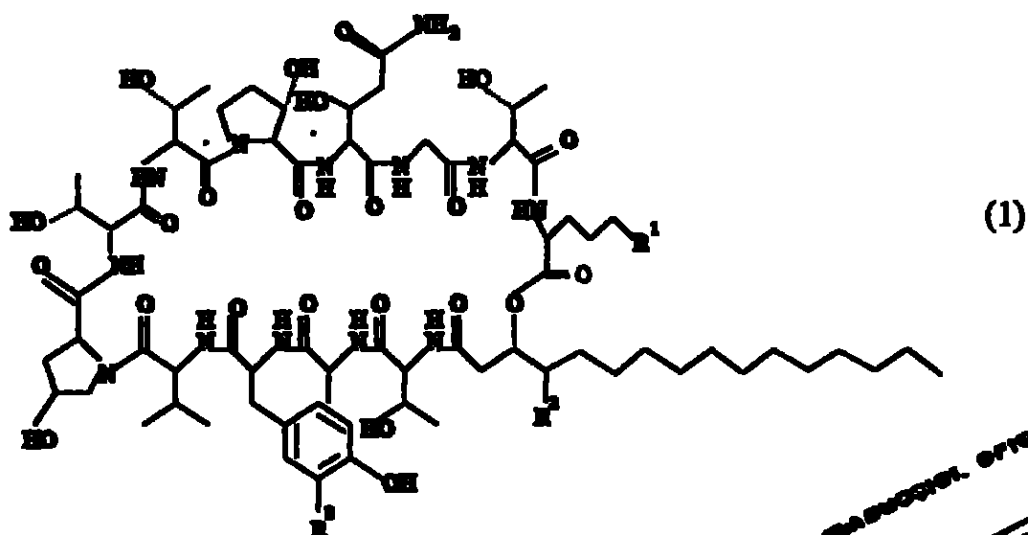
17-01-2000

EP00100807.7

REIVINDICACIONES

Reivindicaciones

Aerotricinas representadas por la Fórmula (1),



PROCESO PATENTARIO OFICIAL NO. 5.794
 María Luisa Briceño de Rodríguez
 Intermediaria General
 de la Oficina del Registro de la Propiedad Industrial

en donde

R^1 es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[-5-amino-2-[N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino, N-(2-aminoetil)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino u ornitil-ornitilamino;

R^2 es hidrógeno o metilo;

R^3 es hidrógeno o hidroxilo;

y sales farmacéuticamente aceptables de ellas.

2. Aerotricinas acordes con la Reivindicación 1 en las que R¹ es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino, N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino, N-(2-aminoetil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino o (L)ornitil-(D)-ornitilamino.
3. Aerotricinas acordes con cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2 en las que R³ son hidrógeno.
4. Aerotricinas acordes con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en las que R¹ es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleril]amino.
5. Aerotricinas acordes con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en las que R¹ es (L)-ornitil-(D)-irnitilamino.
6. Aerotricinas acordes con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en las que R¹ es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino.
7. Aerotricinas acordes con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en las que R¹ es N-(3-aminopropil)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino.
8. Aerotricinas acordes con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en las que R¹ es N-(3-aminopropil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropil)amino]valeril]amino.

INDECOPI. OFICIAL Nº 5794
 María Luján Rodríguez
 Intendente Oficial
 C.A. No. 0128 del MIn. de Justicia

9. Aerotricinas acordes con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en las que R^1 es N-(2-aminoetil)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoetil)amino]valeril]amino.
10. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la Reivindicación 4, que comprende: (a) N-alquilación de un compuesto de la Fórmula II [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 corresponden a las definiciones dadas en la Reivindicación 1) con alquilonitrilo, (b) acilación del compuesto resultante con ornitina N-protegida, (c) remoción de los grupos que protegen el amino (P_1 , P_2) y (d) reducción del grupo ciano. 5794
11. Un procedimiento para la preparación de los compuestos de las Reivindicaciones 6 y 7, que comprende: (a) N-alquilación de un compuesto de la Fórmula II [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 corresponden a las definiciones dadas en la Reivindicación 1) con alquilonitrilo, (b) acilación del compuesto resultante con ornitina N-protegida, (c) remoción del grupo protector del amino, adyacente al grupo ceto (P_1), (d) N-alquilación reductora con amino-acetaldehído N-protegido, (e) remoción del grupo protector del amino restante (P_2), y (f) reducción del grupo ciano.
12. Un procedimiento para la preparación de compuesto de la Reivindicación 9, que comprende: (a) N-alquilación de un compuesto de la Fórmula II [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 corresponden a las definiciones dadas en la Reivindicación 1) con aminoacetilo N-protegido, (b) acilación del compuesto resultante con ornitina N-protegida, (c) remoción del grupo protector del amino,

adyacente al grupo ceto (P_1), (d) N-alquilación reductora con amino-acetaldehído N-protegido, (e) remoción del grupo protector del amino restante (P_2), y (f) reducción del grupo ciano.

13. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la Reivindicación 8 que comprende: (a) N-alquilación de un compuesto de la Fórmula II [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 corresponden a las definiciones dadas en la Reivindicación 1) con alquilonitrilo, (b) acilación del compuesto resultante con ornitina N-protegida, (c) remoción del grupo protector del amino, adyacente al grupo ceto (P_1), (d) N-alquilación con acrilonitrilo, (e) remoción del grupo protector del amino restante (P_2), y (f) reducción del grupo ciano.

14. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la Reivindicación 5 que comprende: (a) acilación de un compuesto de la Fórmula II [en donde R^1 es un grupo amino; R^2 y R^3 corresponden a las definiciones dadas en la Reivindicación 1) con ornitina N-protegida, (b) remoción del grupo protector del amino, adyacente al grupo ceto (P_1), (c) acilación con ornitina N-protegida, y (d) remoción del grupo protector del amino restante (P_2).

15. Aerotricinas de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 para usarlas en terapia médica.

16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 75
72
- 17 El uso de un compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de medicamentos que comprenden un compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 para el tratamiento o profilaxis de micosis.
18. Un método para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos, que comprende administrar un compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 un ser humano o un animal.
19. La invención descrita aquí antes.

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual queda copia en los archivos de esta oficina de traducciones, para su confrontación y a la que me remito.

Derechos de Traducción: 63.000,00

BOGOTA, 9 DE DICIEMBRE DEL 2000.

TRADUCCION OFICIAL No. 5.794

Maria Leda Brizard de Restrepo
Maria Leda Brizard de Restrepo
Intérprete Oficial
Cm. No. 0788 del Min. de Justicia



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

MANUOSCHI, OFFICIAL NO. 5.794
Maria Josefa de Restrepo
Intérprete Oficial
Cm. No. 0792 del Min. de Justicia

Patentanmeldung Nr.

Patent application No.

Demande de brevet

00100807.7

Der Präsident des Europäischen Patentamts:
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE, 01/11/00
LA HAYE, LE



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

77
74

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: 00100807.7 ✓

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt: 17/01/00 ✓

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
4070 Basel
SWITZERLAND

PROSECUTOR. OFFICIAL NO. 5.794
Gloria Luisa Briceo de Rodriguez
Interventor Oficial
Cm. No. 0708 del Min. de Justicia

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Novel cyclic compounds

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

/

Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GM/IE/IT/LU/LC/MC/NL/PT/SE/TR
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

F. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basle, Switzerland

EPO - Munich Case 20532
24

17. Jan. 2000

Novel Cyclic Compounds

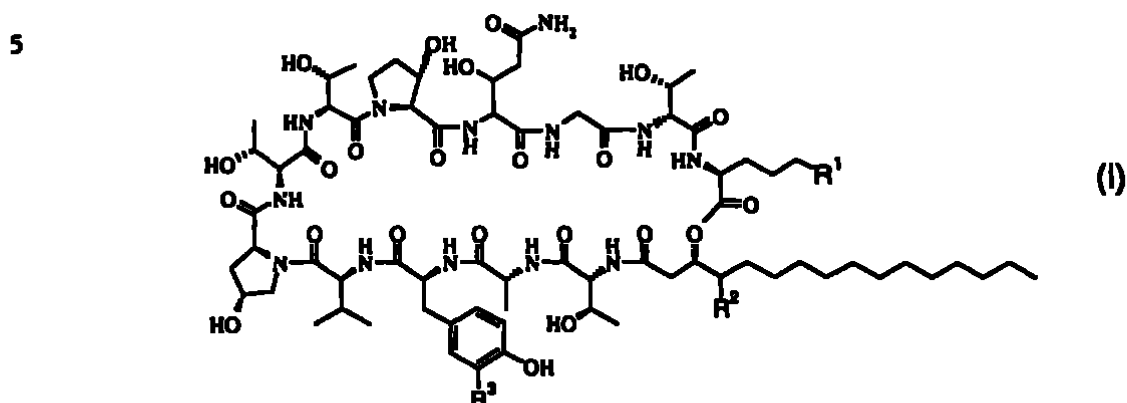
The present invention relates to novel cyclic compounds having antifungal activity (hereinafter referred to as Aerothricins), the use of Aerothricins in the medical therapy, pharmaceutical compositions containing Aerothricins as well as to processes for the preparation of Aerothricins.

Azole antifungal agents are currently widely used for the treatment of systemic mycoses. However, long term prophylactic use of azole antifungals resulted in generation of azole resistant *Candida spp.* due to their fungistatic action. Therefore, fungicidal agents are particularly important for treatment of severe systemic mycoses, especially against pulmonary aspergillosis. Furthermore, the currently available antifungal agents are not effective against *Scedosporium spp.* which is one of the emerging pathogens among immunocompromised patients. Amphotericin B is a highly effective fungicidal agent currently used clinically, but its therapeutic index (effective dose vs. toxic dose) is rather narrow. Certain cyclic compounds such as LY303366 (EP 736 541), WF11243 (EP 584 360) are known to show fungicidal activity through inhibition of β -1,3-glucan synthase. However, they have still some disadvantages in terms of antifungal spectrum and/or safety profile. Thus, development of new fungicidal agents with better safety profile and efficacy against major systemic pathogens including *Aspergillus fumigatus* and *Scedosporium spp.* is urgently required.

Bro/12.01.2000

- 2 -

In particular, the present invention relates to novel Aerothricins represented by the Formula (I),



10 wherein

R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[-5-amino-2-[N-(3-aminopropyl)amino]valeryl]amino, N-(2-aminoethyl)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino or ornityl-ornitylamino;

15

R^2 is hydrogen or methyl;

R^3 is hydrogen or hydroxy;

and pharmaceutically acceptable salts thereof.

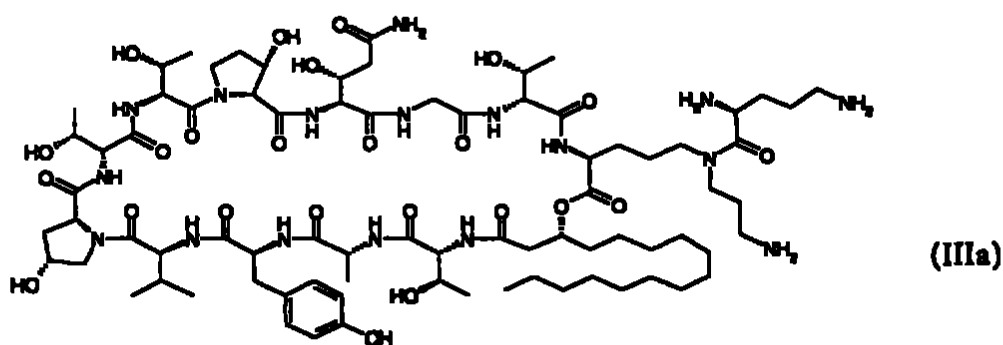
20 The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising an Aerothricin of Formula (I) and a pharmaceutically acceptable carrier. Furthermore, the present invention relates to the use of such Aerothricins for the preparation of medicaments, as well as to processes for the preparation of the Aerothricins of Formula (I). Additionally, the present invention relates to a method for the prophylactic and/or

25 therapeutic treatment of infectious diseases caused by pathogenic microorganisms.

76

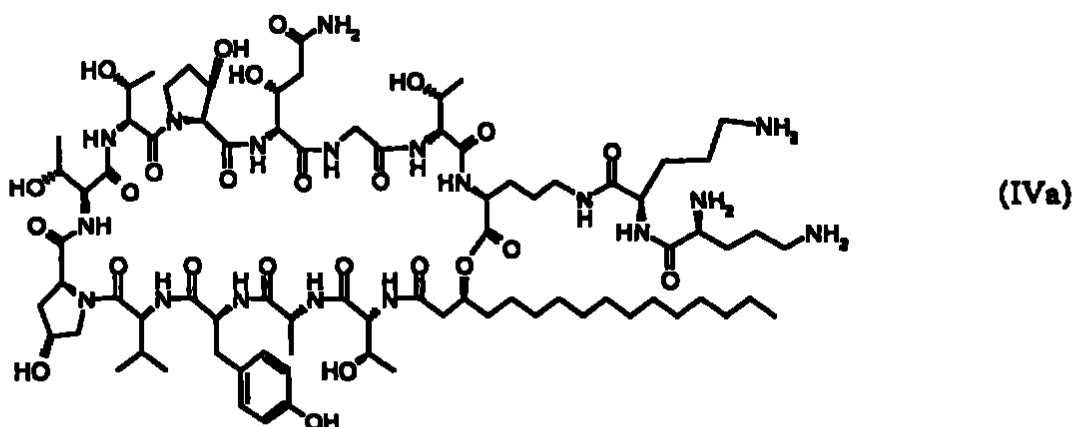
In a preferred embodiment, the present invention relates to Aerothricins of Formula (I), wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropyl)amino]valeryl]amino, N-(2-aminoethyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino or (L)-ornityl-(D)-ornitylamino; R^2 is hydrogen or methyl, preferably hydrogen; R^3 is hydrogen or hydroxy, preferably hydrogen; and pharmaceutically acceptable salts thereof.

10 In another preferred embodiment, the present invention relates to a compound of Formula (I), wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleryl]amino, and R^2 and R^3 are hydrogen atoms; namely of the Formula (IIIa)



and pharmaceutically acceptable salts thereof.

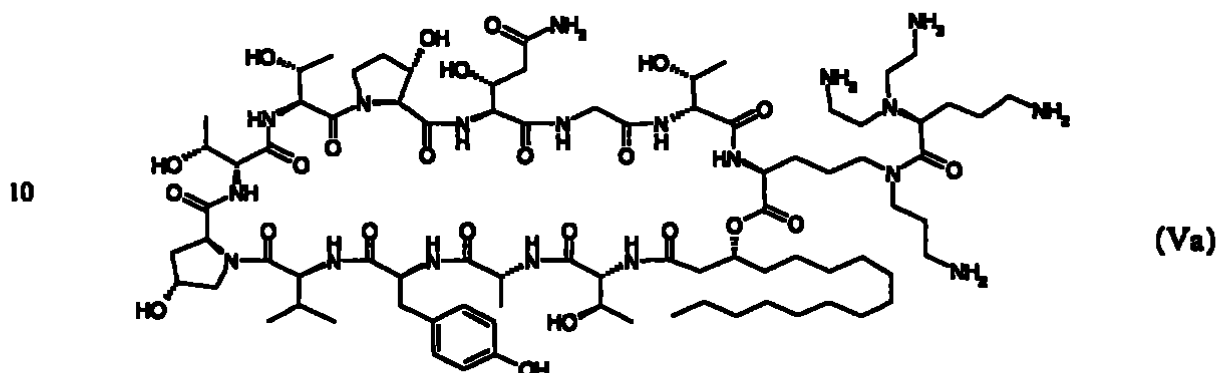
15 In another preferred embodiment, the present invention relates to a compound of the Formula (I), wherein R^1 is (L)-ornityl-(D)-ornitylamino, and R^2 and R^3 are hydrogen atoms; namely of the Formula (IVa)



- 4 -

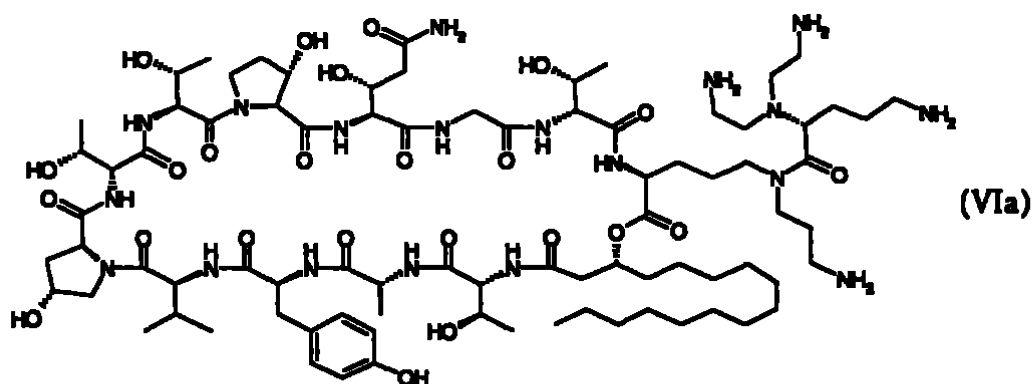
and pharmaceutically acceptable salts thereof.

- In another preferred embodiment, the present invention relates to a compound of
5 Formula (I), wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, and R^2 and R^3 are hydrogen atoms; namely of the Formula (Va)



and pharmaceutically acceptable salts thereof.

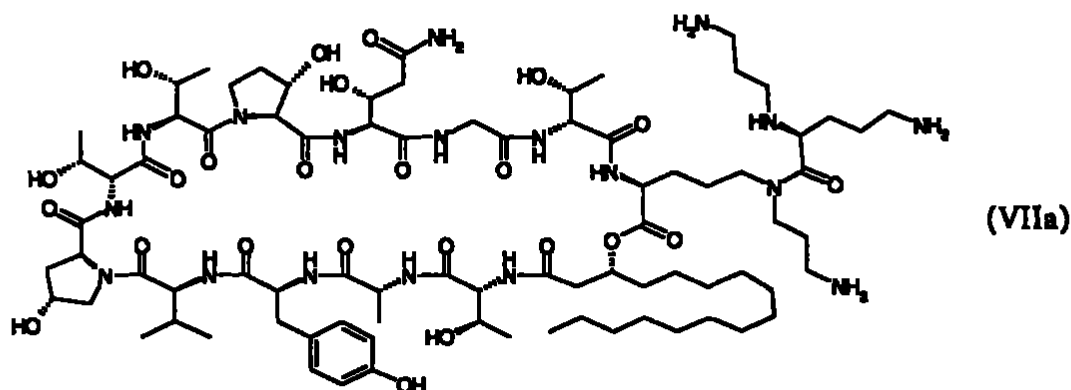
- 15 In another preferred embodiment, the present invention relates to a compound of Formula (I), wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, and R^2 and R^3 are hydrogen atoms; namely of the Formula (VIa)



- 20 and pharmaceutically acceptable salts thereof.

In another preferred embodiment, the present invention relates to a compound of Formula (I), wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropyl)amino]valeryl]amino, and R^2 and R^3 are hydrogen atoms; namely of the

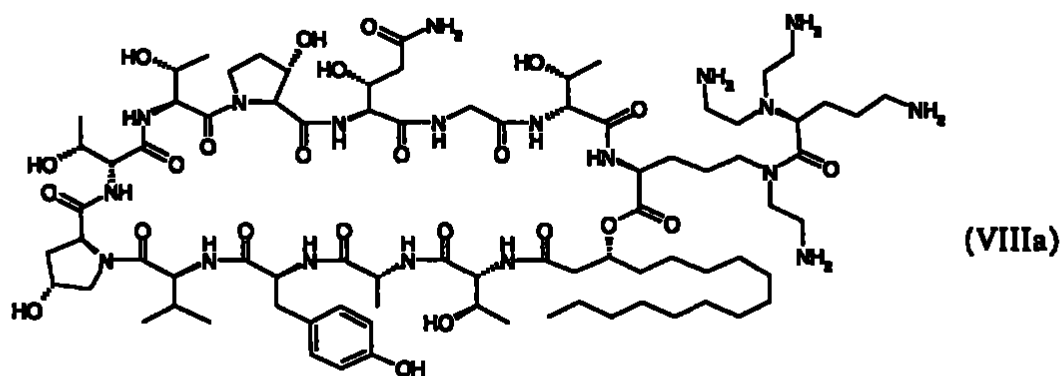
5 Formula (VIIa)



and pharmaceutically acceptable salts thereof.

In another preferred embodiment, the present invention relates to a compound of Formula (I), wherein R^1 is N-(2-aminoethyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, and R^2 and R^3 are hydrogen atoms; namely of the

15 Formula (VIIIa)



and pharmaceutically acceptable salts thereof.

Aerothricins in accordance with the present invention are Aerothricins exemplified

25 in the following Table 1.

5

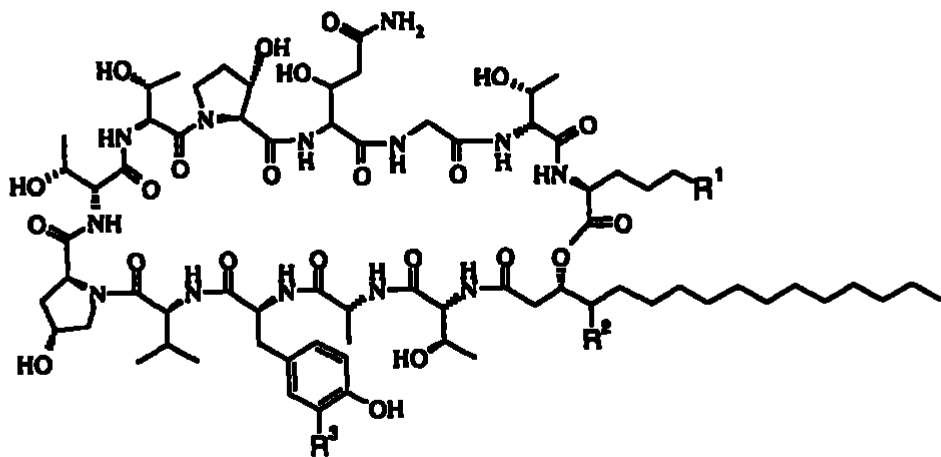


Table 1

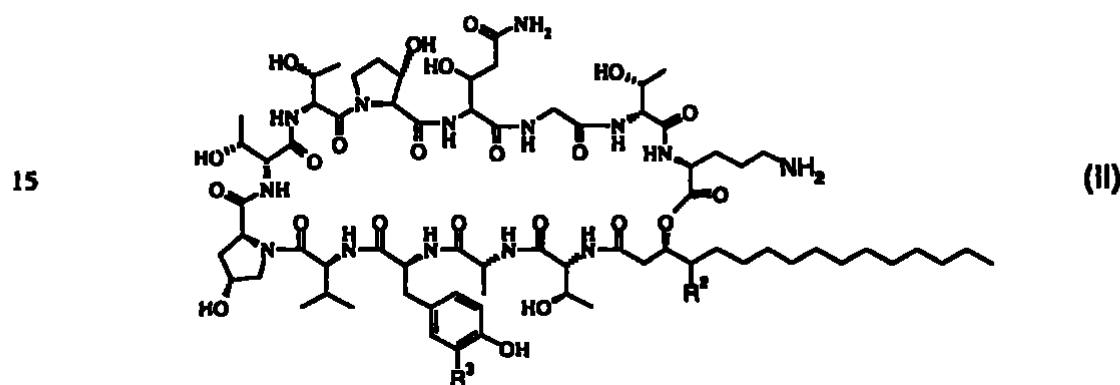
Compound name	R ¹	R ²	R ³
Aerothricin 1 (starting material)	NH ₂	CH ₃	H
Aerothricin 2 (starting material)	NH ₂	H	OH
Aerothricin 3 (starting material)	NH ₂	H	H
Aerothricin 132	$\begin{array}{c} \text{NCO-CH}^{\text{**}}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H
Aerothricin 133	$\begin{array}{c} \text{NCO-CH}^{\text{*}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{NHCOCH}^{\text{**}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	H	H
Aerothricin 134	$\begin{array}{c} \text{NCO-CH}^{\text{**}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{N}((\text{CH}_2)_2\text{NH}_2)_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H
Aerothricin 135	$\begin{array}{c} \text{NCO-CH}^{\text{*}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{N}((\text{CH}_2)_2\text{NH}_2)_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H
Aerothricin 136	$\begin{array}{c} \text{NCO-CH}^{\text{**}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H
Aerothricin 137	$\begin{array}{c} \text{NCO-CH}^{\text{**}}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \\ \\ \text{N}((\text{CH}_2)_2\text{NH}_2)_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \end{array}$	H	H

* (R) configuration, ** (S) configuration

Aerothricins represented by Formula (I) can be produced from Aerothricin 1, 2 or 3 according to the methods outlined in scheme 1 and 2, wherein amino protecting group P_1 and P_2 can be selected from tert-butoxycarbonyl (Boc), benzyloxycarbonyl (Cbz),
5 fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) and the like; R^2 and R^3 are as defined above.

Process A

The starting compounds, Aerothricins of the Formula (II), can be produced by cultivating a microorganism belonging to *Deuteromycotina* capable of producing
10 Aerothricins 1, 2 and 3 [Aerothricin 3 (= WF11243) is described in Reference Example 1] under aerobic conditions in an aqueous or a solid medium and isolating Aerothricins 1, 2 and/or 3 from the culture.

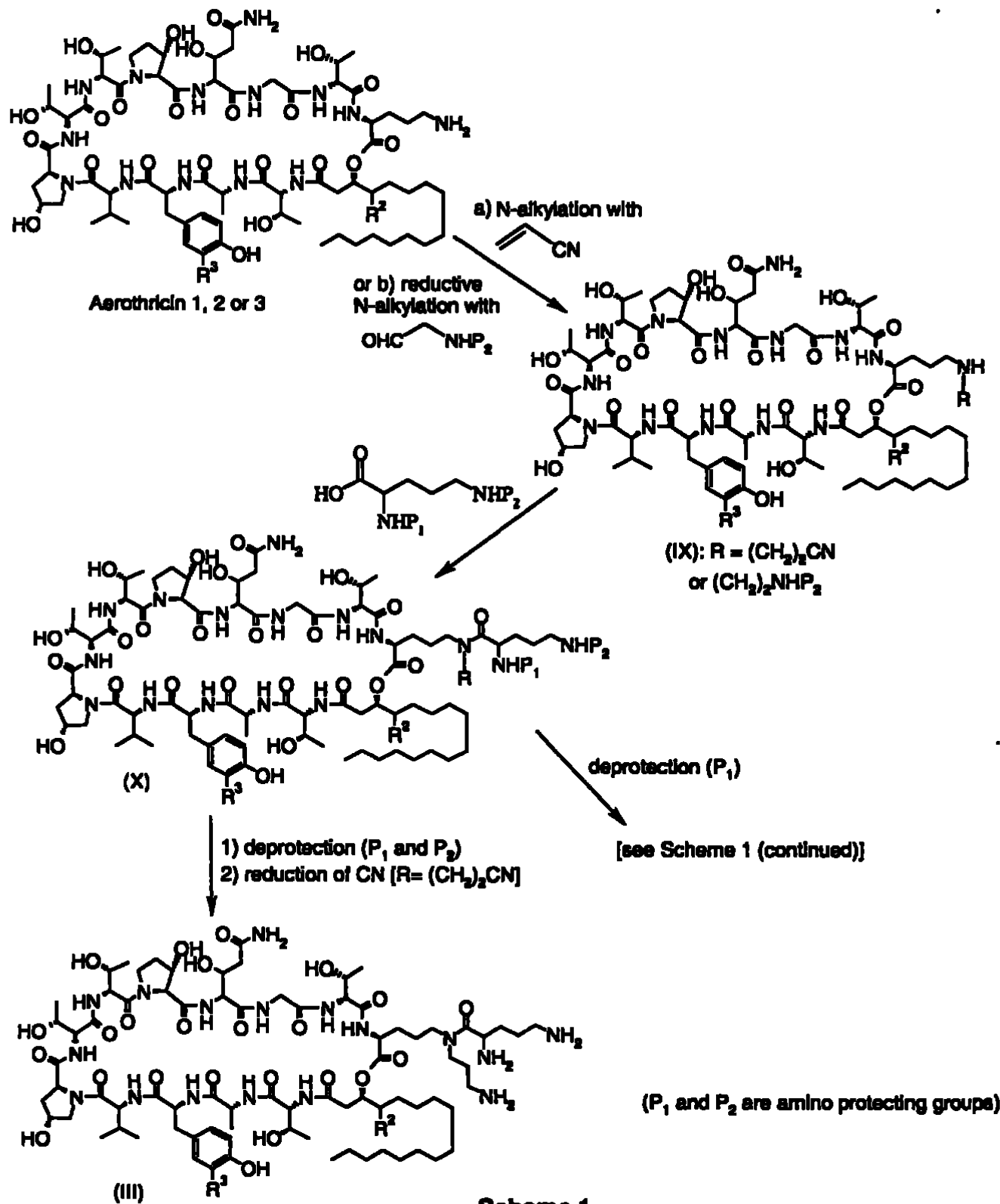


[wherein R^2 is hydrogen or methyl; R^3 is hydrogen or hydroxy]

20

The compounds of Formula II can be converted into compounds of Formula I by the following processes B or C:

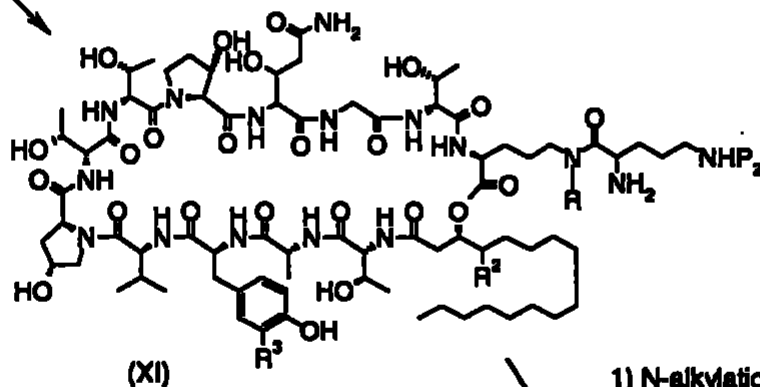
Process B



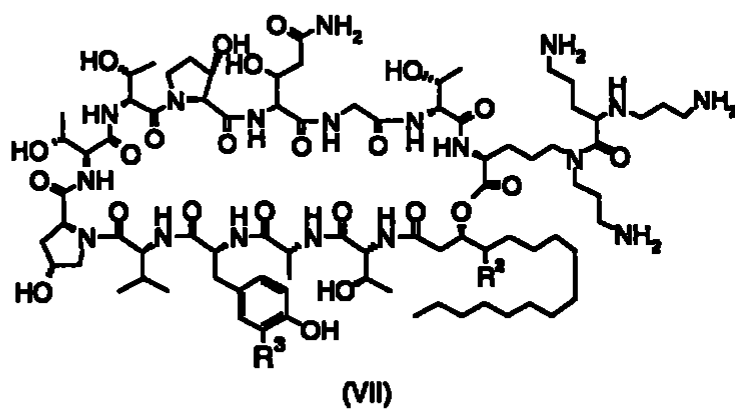
Scheme 1

Compound (X)
[see Scheme 1]

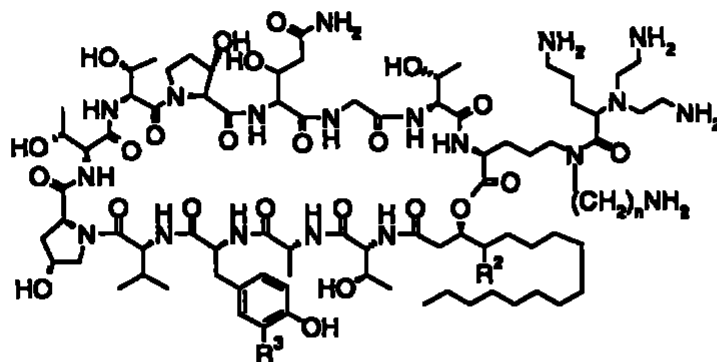
deprotection (P_1)



1) N-alkylation with $\text{CH}_2=\text{CHCN}$
2) deprotection (P_2)
3) reduction of CN [$R = (\text{CH}_2)_2\text{CN}$]



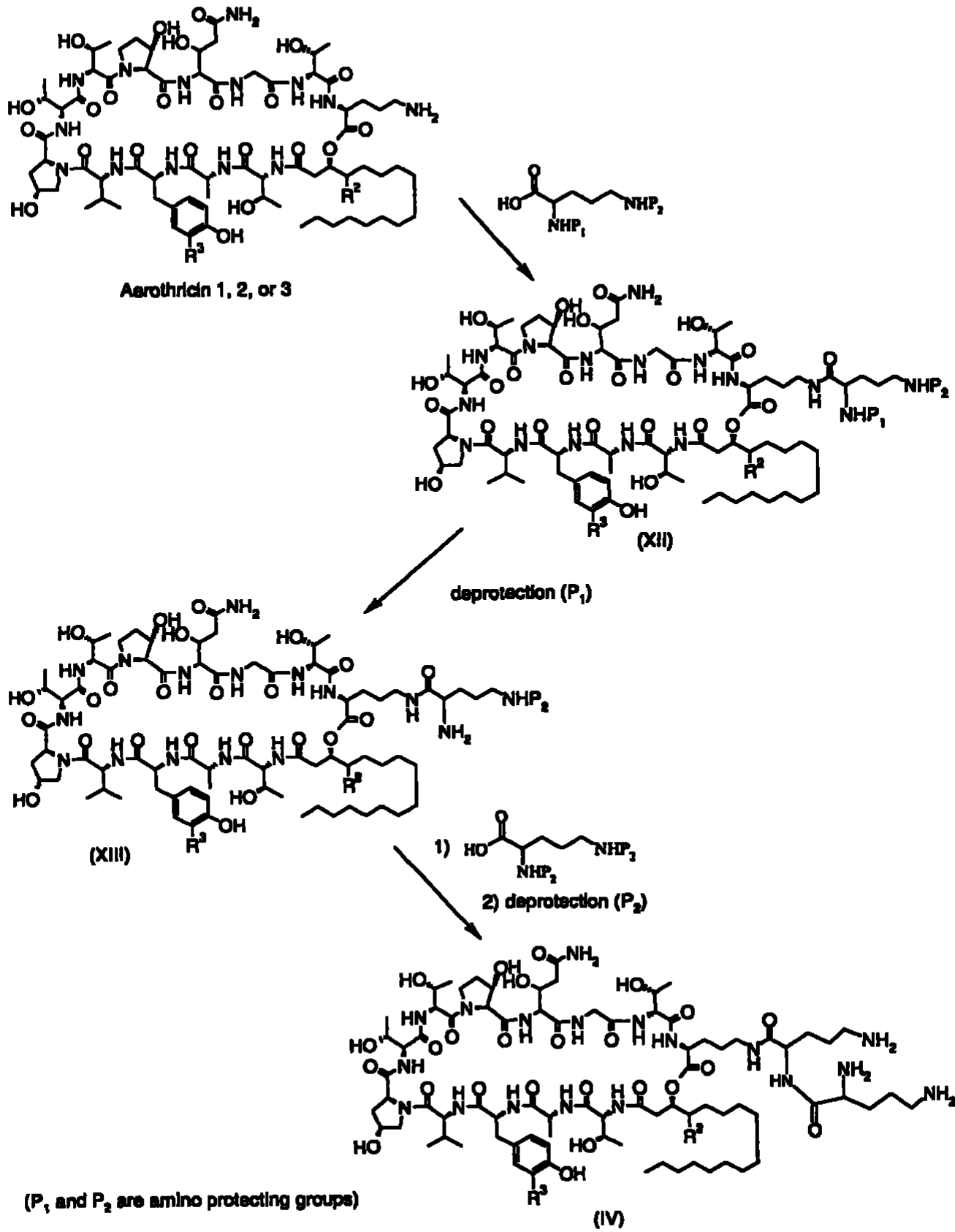
1) reductive alkylation with $\text{OHC-CH}_2\text{-NHP}_2$
2) deprotection (P_2),
followed by reduction of CN [when $R = (\text{CH}_2)_2\text{CN}$]



(P_1 and P_2 are amino protecting groups)

Scheme 1 (continued)

Process C



Scheme 2

The Processes A to C can be illustrated in more detail as follows:

Process A

The microorganism used in the present invention can be any strains including mutants and variants belonging to *Deuteromycotina* capable of producing Aerothricins 1, 2
5 and 3. Especially preferred is strain NR 7379 which was isolated from fallen leaves collected at Kagoshima pref. in Japan, and identified as a strain belonging to *Deuteromycotina*.

The cultural and morphological characteristics of strain NR 7379 are as follows:

1. Cultural characteristics

Corn meal agar (CMA): Growth was not extensive. The colonies reached 11 mm in
10 diameter from inoculum (4.5 mm diam. agar plug) after 14 days at 25°C. They were plane and pale cream yellow. The reverse side was pale cream yellow. Colorless and mucilaginous exudates were present.

Miura's medium (LCA): Growth was not extensive. The colonies reached 11 mm in
15 diameter from inoculum after 14 days at 25°C. They were plane and pale cream yellow. The reverse side was pale cream yellow. Exudates were absent.

Malt extract agar (MEA): Growth was not extensive. The colonies were pustuliform and attained a diameter of 18 mm from inoculum after 14 days at 25°C. The color of colonies was light yellowish brown. The reverse side was of the same color. Exudates were colorless and mucilaginous.

20 Potato-dextrose agar (PDA): Growth was not extensive. The colonies were pustuliform and reached 14 mm in diameter from inoculum after 14 days at 25°C. The color and texture of colonies were similar to those on MEA. Exudates were colorless and mucilaginous.

Germination was observed between 5°C and 30°C on CMA, LCA, MEA, and PDA.

25 2. Morphological characteristics

Mycelia were partly immersed, partly superficial, branched, septate, and pale brown to cream yellow. Conidiophores were formed from immersed mycelium. They were hyaline, septate, branched, irregular. Conidiogenous cells were on distinct conidiophores or irregular hyphae. They were enteroblastic, phialidic, terminal or subterminal. Terminal
30 or subterminal phialides were variable in length and shape. They were cylindrical to lageniform and their length and width were up to 5.5 to 10 µm and 2.5 to 5.5 µm

- 12 -

respectively. Irregularly filiform Conidiophores with lateral conidiogenous cells immediately below septa were often formed. Conidia were one-celled, hyaline, smooth, globose to subglobose, 2.0 to 5.5 μm in length and 2.0 to 5.0 μm in width.

On the basis of these distinct cultural and morphological characteristics, the present
5 strain belonged to *Deuteromycotina* designated as *Deuteromycotina* NR 7379.

The strain denoted as *Deuteromycotina* NR 7379 has been deposited with the National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan in the name of Nippon Roche K.K., of 6-1, Shiba 2-chome, Minato-ku Tokyo, 105 Japan on June 16, 1998 under the Budapest Treaty as follows:
10 *Deuteromycotina* NR 7379 (FERM BP-6391).

The cultivation in accordance with the process provided by the present invention can be carried out in a culture medium which contains customary nutrients usable by the microorganism being cultivated. As carbon sources there can be mentioned, for example, glucose, sucrose, starch, glycerol, molasses, dextrin and mixtures thereof. Nitrogen sources
15 are, for example, soybean meal, cottonseed meal, meat extract, peptone, dried yeast, yeast extract, corn steep liquor, ammonium sulfate, sodium nitrate and mixtures thereof. Moreover, there may be added to the culture medium other organic or inorganic substances for promoting the growth of the microorganism and for increasing the production of Aerothricin 1. Examples of such substances are inorganic salts, such as
20 calcium carbonate, sodium chloride, phosphates and the like.

The cultivation is carried out under aerobic conditions preferably in a liquid medium by submerged fermentation, or in a solid medium by static fermentation. A temperature of 20°C to 30°C, with an optimal temperature of 27°C is suitable for cultivation. The cultivation is preferably carried out at a pH of 3 to 9. The cultivation time
25 depends on the conditions under which the cultivation is carried out. In general, it is sufficient to carry out the cultivation for 20 to 360 h.

For harvesting the objective Aerothricins 1, 2 and 3 from the cultures, separation methods which are usually employed to isolate metabolites produced by microbes from
30 their cultures can be properly used. For example, Aerothricin 1, which is a methanol extractable amphoteric substance, is recovered advantageously by the following procedures.

That is, the whole culture solid obtained by solid state fermentation is extracted with an appropriate solvent to recover the proposed product. The solvents which can be used to

extract the objective compound from the whole cultured solid include water-soluble organic solvents or hydrous solutions of water-soluble organic solvents, such as methanol, ethanol and hydrous alcohols.

For removing salts, water soluble substances, etc. from the resulting extract, use is made of, with advantage, solvent partition between water and water-immiscible organic solvents, such as *n*-butanol, ethyl acetate, etc. For removing coloring substances, fat-soluble substance or the like from the extract, use is made of, with advantage, solvent purification by methanol, ethanol, a mixture of acetonitrile-0.1% aqueous trifluoroacetic acid, etc.

For complete purification of Aerothricins, column chromatography is used with advantage. Carriers which can be used in such a column chromatography are such as YMC-GEL ODS (Yamamura Chemical Laboratories, Japan) or Preparative C18 (Waters Millipore Corporation). As an eluent, use is made of a solvent system consisting a mixture of aqueous trifluoroacetic acid and appropriate water-soluble organic solvents such as methanol, ethanol, acetonitrile, etc. The eluate fraction thus purified, which contains each component, can be subjected to concentration or freeze-drying to pulverize Aerothricins 1, 2 and 3.

Aerothricins 1, 2 and 3 were isolated as a trifluoroacetic acid salt, but the free Aerothricins 1, 2 and 3 can be prepared by the following procedure. Namely, Aerothricins 1, 2 and 3 trifluoroacetic acid salt are dissolved in water, to which was added one equivalent of sodium hydroxide, and the mixture is subjected to Sephadex LH-20 column Chromatography, followed by elution with a hydrous alcohol such as methanol-water, etc. to thereby obtain Aerothricins 1, 2 and 3 (free form), respectively.

25 Process B

The compound of Formula (III) can be prepared from Aerothricins of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined above] in 4 steps: (1) N-alkylation with acrylonitrile, (2) acylation with N-protected ornitine, (3) removal of amino protecting groups (P_1 and P_2), and (4) reduction of cyano group.

30 The compound of Formula (V, VI) can be prepared from Aerothricins of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined above] in 6 steps: (1) N-alkylation with acrylonitrile, (2) acylation with N-protected ornitine, (3) removal of amino protecting group (P_1), (4) reductive N-alkylation with N-protected amino-acetaldehyde, (5) removal of amino protecting group (P_2), and (6) reduction of cyano group.

The compound of Formula (VIII) can be prepared from Aerothricins of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined above] in 6 steps: (1) reductive N-alkylation with N-protected amino-acetaldehyde, (2) acylation with N-protected ornitine, (3) removal of amino protecting group (P_1), (4) reductive N-alkylation with N-protected amino-acetaldehyde, (5) removal of amino protecting group (P_1), and (6) reduction of cyano group.

The compound of Formula (VII) can be prepared from Aerothricins of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined above] in 6 steps: (1) N-alkylation with acrylonitrile, (2) acylation with N-protected ornitine, (3) removal of amino protecting group (P_1), (4) N-alkylation with acrylonitrile, (5) removal of amino protecting group (P_2), and (6) reduction of cyano group.

Process C

The compound of Formula (IV) can be prepared from Aerothricins of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined above] in 4 steps: (1) acylation with N-protected ornitine, (2) removal of amino protecting group (P_1), (3) acylation with N-protected ornitine, and (4) removal of amino protecting group (P_2).

In the above processes B and C;

(a) N-monoalkylation of an amino group can be done using acrylonitrile according to the method described in Organic Synthesis col. Vol. III, page 93.

(b) N-alkylation of the primary or secondary amino group can be done by the conventional reductive alkylation with N-protected aminoacetaldehyde using a reducing agent such as sodium cyanoborohydride in the presence or absence of weak acid such as acetic acid. The reaction can be carried out at room temperature in a solvent such as methanol, ethanol, acetic acid and the like.

(c) The reduction of the nitrile group can be achieved by catalytic hydrogenation or reduction with sodium borohydride/cobalt chloride, borane-methylsulide complex and the like [cf. J. Med. Chem., 37, 222 (1994)].

(d) N-acylation of an amino group can be done with N-protected ornitine using condensation agents such as dicyclohexylcarbodiimide, BOP, HBTU, TNTU, PyBroPTM, PyBOPTM, TBTU, TSTU, HOBt and the like, or the combination of two of them. The reaction can be carried out in a solvent such as methanol, ethanol, pyridine, N,N-dimethylformamide, N-methylpyrrolidone and the like in the presence or absence of a

base such as triethylamine, di-isopropylethylamine, pyridine and the like at a temperature between -20°C and +50°C, preferably at 0°C to +25°C.

- (e) The removal of the amino protecting group can be done by the method known to those skilled in the art, e.g. treatment with trifluoroacetic acid for Boc group, or piperidine
5 for Fmoc group.

The present invention is also concerned with acid addition salts of Aerothricins. The acid addition salt can be obtained as trifluoroacetic acid salt after normal course of isolation. The salt thus obtained may be dissolved in water and passed through an anion
10 exchange column bearing the desired anion. The eluate containing the desired salt may be concentrated to recover the salt as a solid product.

The Aerothricins of Formula (I) may be converted to a corresponding salt by virtue of the presence of the tertiary nitrogen atoms.

The acid addition salt of Aerothricins of Formula (I) can be obtained by treatment of
15 the free base of Aerothricins with at least a stoichiometric amount of an appropriate acid, such as mineral acids, e.g., hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid, and the like, and organic acids, e.g., acetic acid, propionic acid, glycolic acid, pyruvic acid, oxalic acid, malic acid, malonic acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, mandelic acid, methanesulfonic
20 acid, ethanesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, salicylic acid, and the like. Typically, the free base is dissolved in an inert organic solvent such as ethanol, methanol, and the like, and the acid added in a similar solvent. The temperature is maintained at about 40°C. The resulting salt precipitates spontaneously or may be brought out of solution with a less polar solvent.

25 The acid addition salts of the Aerothricins of Formula (I) may be converted to the corresponding free base by treatment with at least a stoichiometric amount of a suitable base such as sodium or potassium hydroxide, potassium carbonate, sodium bicarbonate, ammonia, and the like.

Aerothricins provided by the present invention exhibit broad fungicidal activity
30 against various fungi and can be used as agents for treatment and prophylaxis of fungal infectious diseases. The *in vitro* and *in vivo* antifungal activity (see Tables 2, 3-1 and 3-2) as well as the toxicity to hepatocytes (see Table 4) of the representative Aerothricins of Formula (I) are shown as follows:

1. In vitro antifungal activities

The *in vitro* antifungal activities of the representative *Aerothricins* of the present study were evaluated by determining the 80% inhibitory concentration (IC₈₀), which was calculated as the lowest concentration of an antifungal to inhibit the growth of fungus to 20% turbidity compared with the drug-free control growth spectrophotometrically.

The IC₈₀ values were determined by the broth micro-dilution procedure based on NCCLS Approved Standard with the following minor modifications (National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Approved standard. Document M27-A). Yeast Nitrogen Base (YNB; Difco Lab.) supplemented with 1% glucose and 0.25% K₂HPO₄ was used as testing medium for yeasts, the same medium solidified with 0.2% low melting point agarose (BRL) was used for filamentous fungi. Inoculum size was 1-3 x 10³ cells/ml, and incubation was performed for 1-2 days at 35°C.

Table 2: *In vitro* Antifungal activity, IC₈₀ (µg/ml)

	<i>Candida albicans</i> CY1002	<i>Aspegillus fumigatus</i> CF1003	<i>Scedosporium apiospermum</i> CF1077
Aerothricin 132	0.28	2.9	0.38
Aerothricin 134	0.37	0.58	0.37
Aerothricin 135	0.41	0.37	0.35
Aerothricin 136	0.33	0.38	0.34

2. In vivo antifungal efficacy

2-1: Murine systemic candidiasis

In vivo antifungal efficacy of *Aerothricins* of the present invention against systemic candidiasis is shown in the following Table 3-1. Mice of a conventional immunocompetent mouse strain, Crj: CD-1 (ICR) were used for experimental infection models of systemic candidiasis. 4 weeks old Crj: CD-1 (ICR) mice were used for systemic candidiasis by injecting *Candida albicans* 5x10⁶ conidia/mouse via the tail vein. Test compounds were intravenously (i.v.) given once just after infection for systemic candidiasis. 50% of effective dose (ED₅₀) values were calculated from the survival number at each dose on day 7.

Table 3-1: *In vivo* antifungal activity against systemic candidiasis in mice,
ED₅₀ (mg/kg) on day 7

Aerothricin 132	0.43
Aerothricin 133	0.35
Aerothricin 135	0.35

2-2: Murine pulmonary aspergillosis

5 *In vivo* antifungal efficacy of Aerothricins of the present invention against pulmonary aspergillosis is shown in the following Table 3-2. Murine pulmonary aspergillosis was created in cortisone-treated (250mg/kg, twice sub-cutaneous treatments on 3 days before and on the infection day) ICR male mouse. Conidia of *A.fumigatus* (2.5×10^5 conidia/mouse) were infected intratracheally to these mice, and treatments were carried
10 out once daily for 4 days. The efficacy of each drug was determined from the survival number, and 50% of effective dose (ED₅₀) was calculated from the survival number at each dose on the 14 days.

Table 3-2: *In vivo* antifungal activity against pulmonary aspergillosis in mice,
ED₅₀ (mg/kg) on day 14

Aerothricin 132	5.2
Aerothricin 134	5.8
Aerothricin 137	5.2
Aerothricin 3	>15

15

3. *In vitro* hepatotoxicity test

The mouse hepatocytes were isolated by a collagenase digestion and cultured in microtest plates. The hepatocyte monolayers were exposed to the test Aerothricins in the culture system for 1 day. After the culture period, the hepatocytes were observed under a
20 microscope and evaluated morphologically. The degree of the morphological alteration (degeneration) of the hepatocytes by the test Aerothricins were compared with WF11243 and LY303366.

Table 4: Cytotoxicity to hepatocyte (µg/ml)

Aerothricin 132	>100
Aerothricin 134	>100
Aerothricin 135	>100
WF11243 (= Aerothricin 3)	100
LY303366	10

5 mg/kg and 30 mg/kg of Aerothricin 132 administration (once daily: i.v.) to mice for 2 weeks showed no acute toxicity.

5

Therefore, the novel Aerothricins of Formula (I) as well as pharmaceutically acceptable salts thereof exhibit potent antifungal activity against various fungal infections, including Aspergillosis, in mice over a wide range of dosages and are useful as antifungal agents. Moreover, the Aerothricins provided by this invention are much less cytotoxic to
10 hepatocytes than the known cyclic peptide derivatives (WF11243 and LY303366).

Aerothricins of the present invention may also be useful for inhibiting or alleviating *Pneumocystis carinii* infections in immune-compromised patients.

The present invention further relates to the pharmaceutical compositions containing the novel Aerothricins of Formula (I) as well as pharmaceutically acceptable salts thereof.

15 The novel Aerothricins of Formula (I) as well as pharmaceutically acceptable salts thereof are highly active fungicidal agents. They are active against a variety of fungal species including *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Scedosporium spp.*, *Mucor spp.* and *Absidia spp.*.

20 Thus, Aerothricins of the present invention are useful for topical and systemic treatment of mycoses in animals as well as humans. For example, they are useful in treating topical and mucosal fungal infections caused by *Candida spp.*, *Trichophyton spp.*, and *Microsporum spp.*. They may also be used in the treatment of systemic fungal infections caused by, for example, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, or *Scedosporium spp.*.

25 For clinical use, the novel Aerothricins of Formula (I) as well as pharmaceutically acceptable salts thereof can be administered alone, but will generally be administered in pharmaceutical admixture formulated as appropriate to the particular use and purpose desired, by mixing excipient, binding agent, lubricant, disintegrating agent, coating

material, emulsifier, suspending agent, solvent, stabilizer, absorption enhancer and/or ointment base. The admixture can be used for oral, injectable, nasal, rectal or topical administration.

Pharmaceutical formulations of Aerothricins for oral administration may be granule, tablet, sugar coated tablet, capsule, pill, suspension or emulsion. For parenteral injection, for example, intravenously, intramuscularly or subcutaneously, Aerothricins of Formula (I) may be used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example, salts or glucose to make the solution isotonic. These compositions also may be presented in unit dosage form in ampoules or in multidose containers, preferable with added preservatives. Alternatively, the active ingredients may be in powder form for reconstituting with a suitable vehicle prior to administration. Aerothricins can also be administered in the form of a suppository or pessary, or they may be applied topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder.

The daily dosage level of Aerothricins of Formula (I) is from 0.1 to 50 mg/kg (in divided doses) when administered by either the oral or parenteral route. Thus tablets or capsules of Aerothricins can be expected to contain from 5 mg to 0.5 g of active compound for administration singly or two or more at a time as appropriate. In any event the actual dosage can be determined by the physician and it may be varied upon the age, weight and response of the particular patient.

When Aerothricins are for antifungal use any method of administration may be employed. For treating mycotic infections, oral or intravenous administration is usually employed.

When Aerothricins are to be employed for control of pneumocystis infections it is desirable to directly treat lung and bronchi. For this reason inhalation methods are preferred. For administration by inhalation or nasal, Aerothricins of the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or nebulisers. The preferred delivery system for inhalation or nasal is a metered dose inhalation aerosol, which may be formulated as a powder, suspension or solution of a compound of Formula (I) in suitable propellants, such as fluorocarbons or hydrocarbons.

Although Aerothricins of the present invention may be employed as tablets, capsules, topical compositions, insufflation powders, suppositories, and the like, the solubility of Aerothricins of the present invention in water and aqueous media render them adaptable for use in injectable formulations and also in liquid compositions suitable for aerosol sprays.

The following Examples illustrate the preferred methods for the preparation of Aerothricins of the present invention, which are not intended to limit the scope of the invention thereto.

In the following Examples, the products were analyzed and purified by HPLC using a reverse phase column selected from those listed below. The mixed solvent consisted of 0.05% trifluoroacetic acid-water : 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile with the appropriate ratio described in each working Example.

HPLC columns:

- Column A: CAPCELL PAK C18, UG-120, 4.6x250mm
- Column B: CAPCELL PAK C18, UG-120, 10x250mm
- Column C: CAPCELL PAK C18, UG-80, 20x250mm
- Column D: CAPCELL PAK C18, SG-120, 4.6x250mm
- Column E: CAPCELL PAK C18, SG-120, 10x250mm
- Column F: TSK GEL ODS-80Ts, 20x250mm

In the following working Examples, Aerothricins were obtained as trifluoroacetic acid salts unless otherwise indicated.

Reference Example 1

5 Preparation of Aerothricins 1, 2 and 3

a) Solid fermentation

A 0.1 ml portion of the frozen culture of *Deuteromycotina* NR 7379 (FERM BP-6391) in 10% (v/v) glycerol solution was defrosted and inoculated into a 500-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of a medium consisting of 2% glucose, 1% potato starch, 1.5% glycerol, 1% Toast soya (Nissin Seiyu), 0.35% yeast extract (Nippon Seiyaku), 0.25% Polypepton (Nihon Seiyaku), 0.3% NaCl, 0.5% CaCO₃, 0.005% ZnSO₄·7H₂O, 0.0005% CuSO₄·5H₂O, and 0.0005% MnSO₄·4H₂O. The pH of the medium was not adjusted. The seed culture was incubated on a rotary shaker at 27°C for 7 days at 220 rpm. 2 ml of the seed culture was transferred into a 3-liter Erlenmeyer flask containing a solid medium consisting of 200 g pressed barley, 0.12 g yeast extract (Difco), 0.06 g sodium tartarate, 0.06 g KH₂PO₄, and 120 ml water. The fermentation was carried out at 27°C under static condition. The production reached maximum at around 240 h of fermentation and the culture was subjected to the isolation procedure of Aerothricins 1, 2 and 3.

20

The cultured solid (10 kg) obtained was added methanol (40 L) and the mixture was stirred, followed by removal filtration to obtain methanol extract (39 L). The methanol extract thus obtained was concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue (64.8 g) was added ethyl acetate (1 L) and water (1 L). And the mixture was stirred, followed by removal of the ethyl acetate layer.

25

Furthermore, the aqueous layer was likewise washed with ethyl acetate (1 L) twice. The remaining aqueous layer was extracted with *n*-butanol (1 L) three times. The extracts thus obtained were combined and concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue (28.5 g) was dissolved into a mixture (250 ml) of acetonitrile-0.1% aqueous trifluoroacetic acid (1:1). After removal of the insoluble materials by centrifugation, the solution thus obtained was evaporated to dryness under reduced pressure, and the residue was added methanol (300 ml) and the mixture was stirred, followed by removal filtration

30

- 22 -

to obtain the methanol solution (280 ml). The methanol soluble materials (9.3 g) thus obtained were then subjected to a column chromatography on reversed phase silica gel C18 (1 L). The column was eluted stepwise using a mixture of methanol-0.1% aqueous trifluoroacetic acid (2:8, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, and 8:2). The Aerothricins 1, 2 and 3 eluted in this order with methanol-0.1% aqueous trifluoroacetic acid (7:3) were concentrated to dryness *in vacuo* to obtain white powdery Aerothricin 3 trifluoroacetic acid salt (731 mg) and Aerothricin 1 trifluoroacetic acid salt (747 mg), respectively. The fractions containing Aerothricin 2 was concentrated under reduced pressure and further purified by HPLC under the following conditions: column: Capcell Pak C18 (i.d. 30 x 250 mm, Shiseido Co., LTD.); mobile phase: acetonitrile-0.1% aqueous trifluoroacetic acid (45:55); flow rate: 40 ml/min.; detection: UV 220 nm. The appropriate eluates obtained under the above conditions were concentrated to dryness *in vacuo* to obtain white powdery Aerothricin 2 trifluoroacetic acid salt (42 mg).

15 b) Flask fermentation

A 2 ml portion of the frozen culture of *Deuteromycotina* NR 7379 (FERM BP-6391) in 10% (v/v) glycerol solution was defrosted and inoculated into a 500-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of a medium consisting of 1% glucose, 1% oat flour, 4% tomato paste, 0.5% corn steep liquor (Ando kasei), 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% CaCl_2 , 0.0002% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00002% $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and 0.00006% H_3BO_3 . The pH of the medium was adjusted to 6.8 before sterilization. The seed culture was incubated on a rotary shaker at 27°C for 3 days at 220 rpm. 2 ml of the first seed culture was transferred into 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the same medium and incubated on a rotary shaker under the same conditions for 3 days. 2 ml of the second seed culture was inoculated into 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the medium consisting of 8.5% glycerol, 1% pectin from citrus, 0.4% peanuts powder, 0.4% casein from milk vitamin-free, 0.4% tomato paste, 0.4% corn steep liquor (Ando kasei), 0.2% glycine, and 0.2% KH_2PO_4 . The pH of the medium was adjusted to 7.0 before sterilization. The fermentation was conducted at 27°C with agitation of 220 rpm. After 10 days cultivation, the production reached maximum and the whole culture was subjected to the isolation procedure of Aerothricins 1, 2 and 3.

c) Jar fermentation

A 2 ml portion of the frozen culture of *Deuteromycotina* NR 7379 (FERM BP-6391) in 10% (v/v) glycerol solution was defrosted and inoculated into a 500-ml Erlenmeyer flask

containing 100 ml of the same seed medium as described above. The flask was shaken at 220 rpm for 3 days at 27°C. 2 ml of the first seed culture was transferred into 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the same seed medium and incubated on a rotary shaker under the same conditions for 3 days. Six hundred ml of the second seed culture
5 was inoculated into 50-liter jar fermentor containing 30 liters of the same production medium as described above and 0.4% disfoam (Nissan Disfoam CA-123). The fermentation was carried out at 27°C, with aeration of 30 liters/min. and agitation of 400 rpm. The production reached maximum at around 168 h of fermentation and the whole culture was subjected to the isolation procedure of Aerothricins 1, 2 and 3.

10

Aerothricin 1

- 1) Appearance:
white solid
- 2) Molecular weight (FAB-MS method):
15 m/z 1547 (M+H)⁺
- 3) Molecular formula:
 $C_{72}H_{118}N_{14}O_{23}$
- 4) High resolution mass spectroscopy (for M+H)⁺:
Found: 1547.8568
20 Calculated for $C_{72}H_{119}N_{14}O_{23}$: 1547.8572
- 5) UV spectrum (Fig. 1): in methanol:
 $\lambda(\epsilon)_{\text{max}}$ (in MeOH): 225±5 (10600 sh), 270±5 (2000), 278±5 (2100)
 $\lambda(\epsilon)_{\text{max}}$ (in N/10 NaOH-MeOH): 240±5 (7700), 268±5 (1800), 298±5 (1800)
- 6) IR spectrum (KBr) (Fig. 2):
25 Main absorption wave numbers (cm⁻¹) are as follows:
3379, 2927, 2855, 1740, 1660, 1535, 1453, 1203, 1139, 837
- 7) ¹H-NMR spectrum (Fig. 3):
400 MHz, in CD₃OD
- 8) ¹³C-NMR spectrum (Fig. 4):
30 100 MHz, in CD₃OD
- 9) Solubility:
Soluble: water, methanol, dimethylsulfoxide

10) Color reaction:
Positive: ninhydrin, anisaldehyde-sulfuric acid, iodine vapor, vanillin-sulfuric acid,
Rydon-Smith reagent, molybdophosphoric acid
Negative: Sakaguchi reagent, Bromocresol green, 2,4-dinitrophenylhydrazine-
sulfuric acid

11) Thin-layer chromatography (TLC):

Carrier	Solvent	Rf
silica gel F254 ^{*1}	n-BuOH: acetone:AcOH:H ₂ O (4:5:1:1)	0.74
	MeOH: H ₂ O (95:5)	0.12

^{*1} E. Merck AG., Germany

12) High Performance Liquid Chromatography:
Carrier: Capcell Pak C18 gel S120A, 4.6x250 mm (manufactured by Shiseido, Co., LTD.)

Mobile phase: Acetonitrile : 0.05% aqueous trifluoroacetic acid = 1:1

Flow rate: 1 ml/min.

Rt = 12.1±0.5

13) Amino acid analysis:
Aerothricin 1 was heated at 120°C in 6N HCl for 24 h, followed by subjecting to amino acid analysis to detect threonine, 3 units of allo-threonine, glycine, alanine, valine, tyrosine, ornithine, 3-hydroxyproline, 4-hydroxyproline, 3-hydroxyglutamine.

Aerothricin 2

1) Appearance:
white solid

2) Molecular weight (FAB-MS method):
m/z 1549 (M+H)⁺

3) Molecular formula:
C₇₁H₁₁₆N₁₄O₂₄

4) High resolution mass spectroscopy (for M+H)⁺:
Found: 1549.8384
Calculated for C₇₁H₁₁₇N₁₄O₂₄: 1549.8365

5) UV spectrum (Fig. 5): in methanol:
λ(e)max (in MeOH): 225±5 (10200 sh), 275±5 (1900), 278±5 (2000)
λ(e)max (in N/10 NaOH-MeOH): 240±5 (7700), 293±5 (2000)

- 6) IR spectrum (KBr) (Fig. 6):
Main absorption wave numbers (cm^{-1}) are as follows:
3323, 2928, 2856, 1740, 1670, 1531, 1450, 1203, 1137, 837
- 7) ^1H -NMR spectrum (Fig. 7):
5 400 MHz, in CD_3OD
- 8) ^{13}C -NMR spectrum (Fig. 8):
100 MHz, in CD_3OD
- 9) Solubility:
Soluble: water, methanol, dimethylsulfoxide
- 10) Color reaction:
Positive: ninhydrin, anisaldehyde-sulfuric acid, Iodine vapor, vanillin-sulfuric acid,
Rydon-Smith reagent, molybdophosphoric acid
Negative: Sakaguchi reagent, bromocresol green, 2,4-dinitrophenylhydrazine-sulfuric acid
- 11) Thin-layer chromatography (TLC):
- | Carrier | Solvent | Rf |
|-------------------------------|---|------|
| Silica gel F254 ^{*1} | <i>n</i> -BuOH: acetone:AcOH:H ₂ O (4:5:1:1) | 0.29 |
| | MeOH: H ₂ O (95:5) | 0.15 |
- ^{*1} E. Merck AG., Germany
- 12) High Performance Liquid Chromatography:
Carrier: Capcell Pak C18 gel S120A, 4.6x250 mm (manufactured by Shiseido, Co., LTD.)
Mobile phase: Acetonitrile : 0.05% aqueous trifluoroacetic acid = 1:1
Flow rate: 1 ml/min.
Rt = 9.9±0.5
- 13) Amino acid analysis:
Aerothricin 2 was heated at 120°C in 6N HCl for 24 h, followed by subjecting to amino acid analysis to detect threonine, 3 units of allo-threonine, glycine, alanine, valine, 3-hydroxytyrosine (DOPA), ornithine, 3-hydroxyproline, 4-hydroxyproline, 3-hydroxyglutamine.

Aerothricin 3

- 1) Appearance:
white solid

- 2) Molecular weight (FAB-MS method):
m/z 1533 (M+H)⁺
- 3) Molecular formula:
C₇₁H₁₁₆N₁₄O₂₃
- 5 4) UV spectrum: in methanol
λ(e)max (in MeOH): 225±5 (11000 sh), 275±5 (2000), 280±5 (1900)
λ(e)max (in N/10 NaOH-MeOH): 243±5 (7800), 295±5 (1800)
- 5) IR spectrum (KBr):
Main absorption wave numbers (cm⁻¹) are as follows:
10 3334, 2928, 2852, 1742, 1662, 1520, 1449, 1202, 1136, 836
- 6) Solubility:
Soluble: water, methanol, dimethylsulfoxide
- 7) Color reaction:
Positive: ninhydrin, anisaldehyde-sulfuric acid, Iodine vapor, vanillin-sulfuric acid,
15 Rydon-Smith reagent, molybdophosphoric acid
Negative: Sakaguchi reagent, bromocresol green, 2,4-dinitrophenylhydrazine-sulfuric acid
- 8) Thin-layer chromatography (TLC):
- | Carrier | Solvent | Rf |
|----------------------------------|---|------|
| 20 silica gel F254 ^{*1} | n-BuOH: acetone:AcOH:H ₂ O (4:5:1:1) | 0.26 |
| | MeOH: H ₂ O (95:5) | 0.09 |
- ^{*1} E. Merck AG., Germany
- 9) High Performance Liquid Chromatography:
Carrier: Capcell Pak C18 gel S120A, 4.6x250 mm (manufactured by Shiseido, Co.,
25 LTD.)
Mobile phase: Acetonitrile : 0.05% aqueous trifluoroacetic acid = 1:1
Flow rate: 1 ml/min.
Rt = 9.1±0.5
- 10) Amino acid analysis:
30 Aerothricin 3 was heated at 120°C in 6N HCl for 24 h, followed by subjecting to amino acid analysis to detect threonine, 3 units of allo-threonine, glycine, alanine, valine, tyrosine, ornithine, 3-hydroxyproline, 4-hydroxyproline, 3-hydroxyglutamine.

- 27 -

Example 1

Preparation of Aerothricin 132

(a) To a mixture of Aerothricin 3 (500 mg, 0.326 mmol) and triethylamine (682 μ l, 4.89 mmol) in MeOH (10 ml) was added acrylonitrile (214 μ l, 3.27 mmol) at room
5 temperature. The mixture was stirred for 20 hours at room temperature. After the solvent was evaporated *in vacuo*, the residue was dissolved in *n*-butanol and washed with diluted hydrochloric acid and water successively. The organic layer was evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by preparative reverse HPLC, the detailed condition of which is shown below. The appropriate fraction were combined, frozen and lyophilized to give 207
10 mg of Aerothricin 120 as a colorless amorphous solid.

HPLC(Rt) 27.5 min (column F, flow rate: 10 ml/min, eluent: 0.05% Trifluoroacetic acid : 0.05% Trifluoroacetic acid-Acetonitrile = 53:47); FAB-MS (m/z) : 1586 [M+H]⁺.

(b) To a stirred solution of Boc-L-Orn(Boc)-OH (46 mg, 0.138 mmol) in DMF (2 ml)
15 were added BOP reagent (62 mg, 0.14 mmol), HOBT hydrate (22 mg, 0.144 mmol) and N-ethyl-diisopropylamine (24 μ l, 0.138 mmol). After being stirred for 2 h at room temperature, a solution of Aerothricin 120 (100 mg, 0.063 mmol) and N-ethyl-diisopropylamine (24 μ l, 0.138 mmol) in DMF (2 ml) was added to the reaction mixture. After being stirred for 20 h at room temperature, the solvent was evaporated *in*
20 *vacuo*.

A solution of the crude residue obtained above in TFA (3 ml) was stirred at 0°C for 30 min. The reaction vessel was opened and TFA was evaporated under a stream of dry nitrogen. The residue was purified by preparative reverse phase HPLC, the detailed condition of which is shown below. The pure fractions were combined, frozen and
25 lyophilized to give 60.5 mg of the compound-1 as a white amorphous solid.

HPLC(Rt) 20.7 min (column F, flow rate: 10 ml/min, eluent: 0.05% Trifluoroacetic acid : 0.05% Trifluoroacetic acid-Acetonitrile = 57:43); FAB-MS (m/z) : 1700 [M+H]⁺.

(c) To a mixture of the compound-1 (60.5 mg, 0.0356 mmol) in dioxane (2 ml) and water
30 (2 ml) was added 10% palladium on charcoal (10 mg), and the reaction vessel was filled with hydrogen. After being stirred for 14 hours at room temperature, the mixture was filtered through membrane filter (pore size : 0.2 mm) and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by preparative reverse HPLC, the detailed condition

- 28 -

of which is shown below. The appropriate fraction were combined, frozen and lyophilized to give 27.8 mg of Aerothricin 132 as a colorless amorphous solid.

HPLC(Rt) 18.9 min (column F, flow rate: 10 ml/min, eluent: 0.05% Trifluoroacetic acid : 0.05% Trifluoroacetic acid-Acetonitrile = 60:40); FAB-MS (m/z) : 1704 [M+H]⁺.

5

Example 2

Preparation of Aerothricin 134

(a) To a stirred solution of Fmoc-L-Orn(Boc)-OH (379 mg, 0.834 mmol) in DMF (6 ml) were added BOP reagent (368 mg, 0.832 mmol), HOBT hydrate (128 mg, 0.836 mmol) and
10 N-ethyl-diisopropylamine (145 µl, 0.832 mmol). After being stirred for 2 h at room temperature, a solution of Aerothricin 120 (600 mg, 0.378 mmol) and N-ethyl-diisopropylamine (145 µl, 0.832 mmol) in DMF (3 ml) was added to the reaction mixture. After being stirred for 18 h at room temperature, piperidine (3 ml) was added to the mixture. The reaction mixture was stirred for 10 minutes at room temperature. The
15 solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was washed with dichloromethane and diethylether to remove the reagents. The crude product was used for the next step without further purification.

(b) To a solution of the crude product (320 mg) obtained above in MeOH (10 ml) were
20 added (2-oxo-ethyl)carbamic acid *tert*-butylester (crude, 530 mg), AcOH (2 ml) and NaBH₃CN (210 mg, 3.342 mmol) in MeOH (4 ml). After the mixture was stirred for 20 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in *n*-butanol and washed with diluted hydrochloric acid and water successively. The organic layer was evaporated *in vacuo*.

25 A solution of the crude residue obtained above in TFA (6 ml) was stirred at 0°C for 30 min. The reaction vessel was opened and TFA was evaporated under a stream of dry nitrogen. The residue was purified by preparative reverse HPLC, the detailed condition of which is shown below. The appropriate fraction were combined, frozen and lyophilized to give 88.2 mg of the compound-2 as a white amorphous solid.

30 HPLC(Rt) 22.4 min (column F, flow rate: 10 ml/min, eluent: 0.05% Trifluoroacetic acid : 0.05% Trifluoroacetic acid-Acetonitrile = 60:40)

- (c) To a mixture of the compound-2 (88.2 mg, 0.0494 mmol) in dioxane (1.5 ml) and water (1.5 ml) was added 10% palladium on charcoal (20 mg), and the reaction vessel was filled with hydrogen. After being stirred for 16 hours at room temperature, the mixture was filtered through membrane filter (pore size : 0.2 mm) and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by preparative reverse HPLC, the detailed condition of which is shown below. The appropriate fraction were combined, frozen and lyophilized to give 22.0 mg of Aerothricin 134 as a colorless amorphous solid.

HPLC(Rt) 25.7 min (column F, flow rate: 10 ml/min, eluent: 0.05% Trifluoroacetic acid : 0.05% Trifluoroacetic acid-Acetonitrile = 63:37); FAB-MS (m/z) : 1790 [M+H]⁺.

10

Example 3

Preparation of Aerothricin 135

Aerothricin 135 was prepared according to the method similar to that described In Example 2:

- 15 HPLC(Rt) 25.5 min (column F, flow rate: 10 ml/min, eluent: 0.05% Trifluoroacetic acid : 0.05% Trifluoroacetic acid-Acetonitrile = 63:37); FAB-MS (m/z) : 1790 [M+H]⁺.

Example 4

Preparation of Aerothricin 136

- 20 (a) To a stirred solution of Fmoc-L-Orn(Boc)-OH (379 mg, 0.834 mmol) in DMF (6 ml) were added BOP reagent (368 mg, 0.832 mmol), HOBT hydrate (128 mg, 0.836 mmol) and N-ethyldiisopropylamine (145 μ l, 0.832 mmol). After being stirred for 2 h at room temperature, a solution of Aerothricin 120 (600 mg, 0.378 mmol) and N-ethyldiisopropylamine (145 μ l, 0.832 mmol) in DMF (3 ml) was added to the reaction mixture. After being stirred for 18 h at room temperature, piperidine (3 ml) was added to the mixture. The reaction mixture was stirred for 10 minutes at room temperature. The solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was washed with dichloromethane and diethylether to remove the reagents. The crude product was used for the next step without further purification.
- 25

30

- 30 -

(b) To a solution of the crude product (300 mg) obtained above in EtOH (10 ml) were added acrylonitrile (110 μ l, 1.68 mmol) and N-ethyl-diisopropylamine (44 μ l, 0.253 mmol). After the mixture was stirred for 14 h at room temperature, acrylonitrile (440 μ l, 6.72 mmol) and N-ethyl-diisopropylamine (44 μ l, 0.253 mmol) were added. After the mixture
5 was stirred for 22 h at room temperature, acrylonitrile (220 μ l, 3.36 mmol) and N-ethyl-diisopropylamine (44 μ l, 0.253 mmol) were added. After the mixture was stirred for 6 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was washed with dichloromethane and diethylether to remove the reagents.

A solution of the crude residue obtained above in TFA (3 ml) was stirred at 0°C for 30
10 min. The reaction vessel was opened and TFA was evaporated under a stream of dry nitrogen. The residue was purified by preparative reverse HPLC, the detailed condition of which is shown below. The appropriate fraction were combined, frozen and lyophilized to give 104.6 mg of the compound-3 as a white amorphous solid.

HPLC(Rt) 27.8 min (column F, flow rate: 10 ml/min, eluent: 0.05% Trifluoroacetic acid :
15 0.05% Trifluoroacetic acid-Acetonitrile = 57:43)

(c) To a mixture of the compound-3 (104.6 mg, 0.0596 mmol) in dioxane (3 ml) and water (3 ml) was added 10% palladium on charcoal (25 mg), and the reaction vessel was filled with hydrogen. After being stirred for 16 hours at room temperature, the mixture was
20 filtered through membrane filter (pore size : 0.2 μ m) and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by preparative reverse HPLC, the detailed condition of which is shown below. The appropriate fraction were combined, frozen and lyophilized to give 40.3 mg of Aerothricin 136 as a colorless amorphous solid.

HPLC(Rt) 25.8 min (column F, flow rate: 10 ml/min, eluent: 0.05% Trifluoroacetic acid :
25 0.05% Trifluoroacetic acid-Acetonitrile = 63:37); FAB-MS (m/z) : 1761 [M+H]⁺.

Example 5

Preparation of Aerothricin 133

(a) To a solution of Aerothricin 3 monoTFA salt (2.5g) in DMF (10 ml) was added Fmoc-
30 D-Orn(Boc)OH (850 mg), BOP (180 mg), HOBT (279 mg) and N-ethyl-diisopropylamine (0.795 ml). After the mixture being stirred for 3 hrs. at room temperature, piperidine (4.0 ml) was added. The stirring was continued for 30 min. at room temperature, and then the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in dichloromethane, and

dropwise addition of ether gave the crude product as white amorphous powder. It was washed with ether and used in the next step without further purification.

(b) The crude product obtained above was dissolved in DMF (20 ml). To this solution was added Boc-L-Orn(Boc)OH (656 mg), BOP (872 mg), HOBT (302 mg) and N-ethyl-diisopropylamine (0.793 ml). After the mixture was stirred for 3 hrs. at room temperature, the solvent was evaporated *in vacuo*.

(c) TFA (15 ml) was added at 0° C to the residue obtained above. After the mixture was stirred for 30 min. at 0° C, ether was added dropwise to give a white precipitate. It was washed with ether and purified by preparative reverse phase HPLC. The pure fractions were combined, frozen and lyophilized to give 515 mg of Aerothricin 133 as a colorless amorphous solid:

HPLC(Rt): 19.7 min. (column F, flow rate: 10 ml/min., eluent: 0.05% trifluoroacetic acid-water : 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile = 60:40); FAB-MS (m/z): 1761 [MH⁺].

15

Example 6

Preparation of Aerothricin 137

(a) To a solution of Aerothricin 3 monoTFA salt (622 mg) in dichloromethane (16 ml) and MeOH (4 ml) was added N-Boc-aminoethanal (120 mg) and N-ethyl-diisopropylamine (0.072 ml). After being stirred for 1 hr at room temperature, to the reaction mixture was added sodium cyanoborohydride (48 mg) and sulfuric acid (0.04 ml). After the reaction mixture was stirred for 72 hr at room temperature, the solvent was evaporated *in vacuo* and then 0.1N HCl was added. It was extracted with nBuOH and concentrated.

(b) The residue was dissolved in DMF (6 ml), to which was added 2-(S)-[bis-(2-Boc-aminoethyl)amino]-5-Boc-aminopentanoic acid (294 mg), HOAt (77 mg), HBTU (215 mg) and N-ethyl-diisopropylamine (0.148 ml). After being stirred for 48 hr at room temperature, the solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was dissolved in dichloromethane. To this solution was added ether to give a white precipitate. It was washed with ether and used in the next step without further purification.

(c) To the compound obtained above was then added TFA (3 ml) at 0°C. After being stirred for 30 min. at 0°C, ether was added to the reaction mixture to give a white precipitate. It was washed with ether and purified by preparative reverse phase HPLC. The pure fractions were combined, frozen and lyophilized to give 95 mg of Aerothricin 137 as a colorless amorphous solid:

- 32 -

HPLC(Rt): 14.6 min. (column F, flow rate: 10 ml/min., eluent: 0.05% trifluoroacetic acid-water : 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile = 61:39); FAB-MS (m/z): 1776 [M+H]⁺.

5

Example A

Injectable solutions each containing the following ingredients were manufactured in the conventional manner per se:

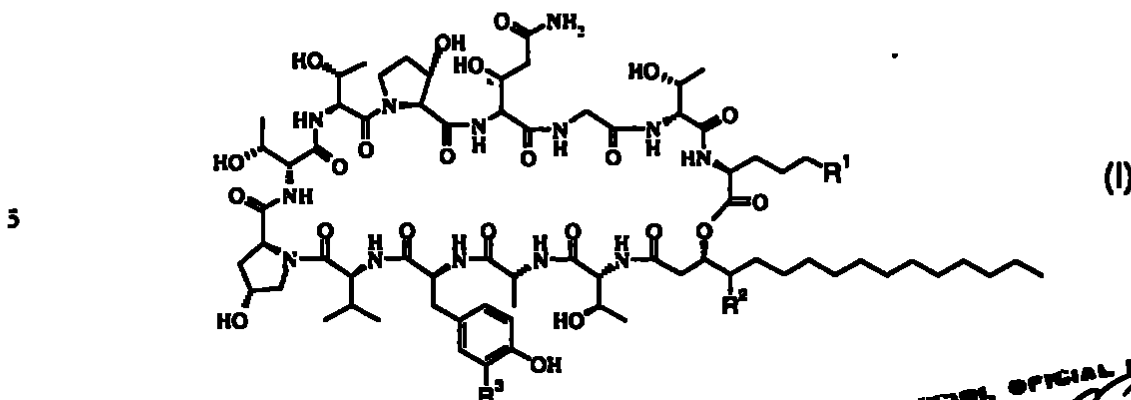
Aerothricin 132	20 mg
di-Sodium hydrogenphosphate, anhydrous	7.6 mg
Sodium diphosphate dihydrate	2.0 mg
Ethyl alcohol	150 mg
Distilled water, deionized, sterile	850 mg
Total	1029.6 mg

Claims

EPO - Munich
24

17. Jan. 2000

1. Aerothricins represented by the Formula (I),



wherein

- 10 R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[-5-amino-2-[N-(3-aminopropyl)amino]valeryl]amino, N-(2-aminoethyl)-N-[-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino or ornityl-ornitylamino;

R^2 is hydrogen or methyl;

- 15 R^3 is hydrogen or hydroxy;

and pharmaceutically acceptable salts thereof.

2. Aerothricin according to Claim 1, wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino, N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropyl)amino]valeryl]amino, N-(2-aminoethyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino or (L)-ornityl-(D)-ornitylamino.
- 20
3. Aerothricins according to any of Claims 1 or 2, wherein R^2 and R^3 are hydrogen.
4. Aerothricin according to any of Claims 1 to 3, wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-2,5-diaminovaleryl]amino.
- 25
5. Aerothricin according to any of Claims 1 to 3, wherein R^1 is (L)-ornityl-(D)-ornitylamino.

- 34 -

6. Aerothricin according to any of Claims 1 to 3, wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino.
7. Aerothricin according to any of Claims 1 to 3, wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2R)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino.
- 5 8. Aerothricin according to any of Claims 1 to 3, wherein R^1 is N-(3-aminopropyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N-(3-aminopropyl)amino]valeryl]amino.
9. Aerothricin according to any of Claims 1 to 3, wherein R^1 is N-(2-aminoethyl)-N-[(2S)-5-amino-2-[N,N-bis(2-aminoethyl)amino]valeryl]amino.
10. A process for the preparation of a compound of Claim 4, which process comprises (a) N-alkylation of a compound of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined in Claim 1] with acrylonitrile, (b) acylation of the resulting compound with N-protected ornitine, (c) removal of the amino protecting groups (P_1 and P_2) and (d) reduction of the cyano group.
11. A process for the preparation of the compounds of Claims 6 and 7, which process comprises (a) N-alkylation of a compound of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined in Claim 1] with acrylonitrile, (b) acylation of the resulting compound with N-protected ornitine, (c) removal of the amino protecting group adjacent to the keto-group (P_1), (d) reductive N-alkylation with N-protected amino-acetaldehyde, (e) removal of the remaining amino protecting group (P_2), and (f) reduction of the cyano group.
12. A process for the preparation of a compound of Claim 9, which process comprises (a) reductive N-alkylation of a compound of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined in Claim 1] with N-protected amino-acetaldehyde, (b) acylation of the resulting compound with N-protected ornitine, (c) removal of the amino protecting group adjacent to the keto-group (P_1), (d) reductive N-alkylation with N-protected amino-acetaldehyde, (e) removal of the remaining amino protecting group (P_2), and (f) reduction of the cyano group.
13. A process for the preparation of a compound of Claim 8, which process comprises (a) N-alkylation of a compound of Formula (II) [wherein R^1 is an amino group; R^2 and R^3 are as defined in Claim 1] with acrylonitrile, (b) acylation of the resulting compound with N-protected ornitine, (c) removal of the amino protecting group adjacent to the keto-group (P_1), (d) N-alkylation with acrylonitrile, (e) removal of the remaining amino protecting group (P_2), and (f) reduction of the cyano group.

- 5.794
 TRANSMISSION. OFFICIAL NO. 5.794
 and of any of the claims of the first and second groups of claims.
 María Luisa López de Castro
 Intérprete Oficial
 C. No. 0702 del M. de Justicia

3

Fig. 1

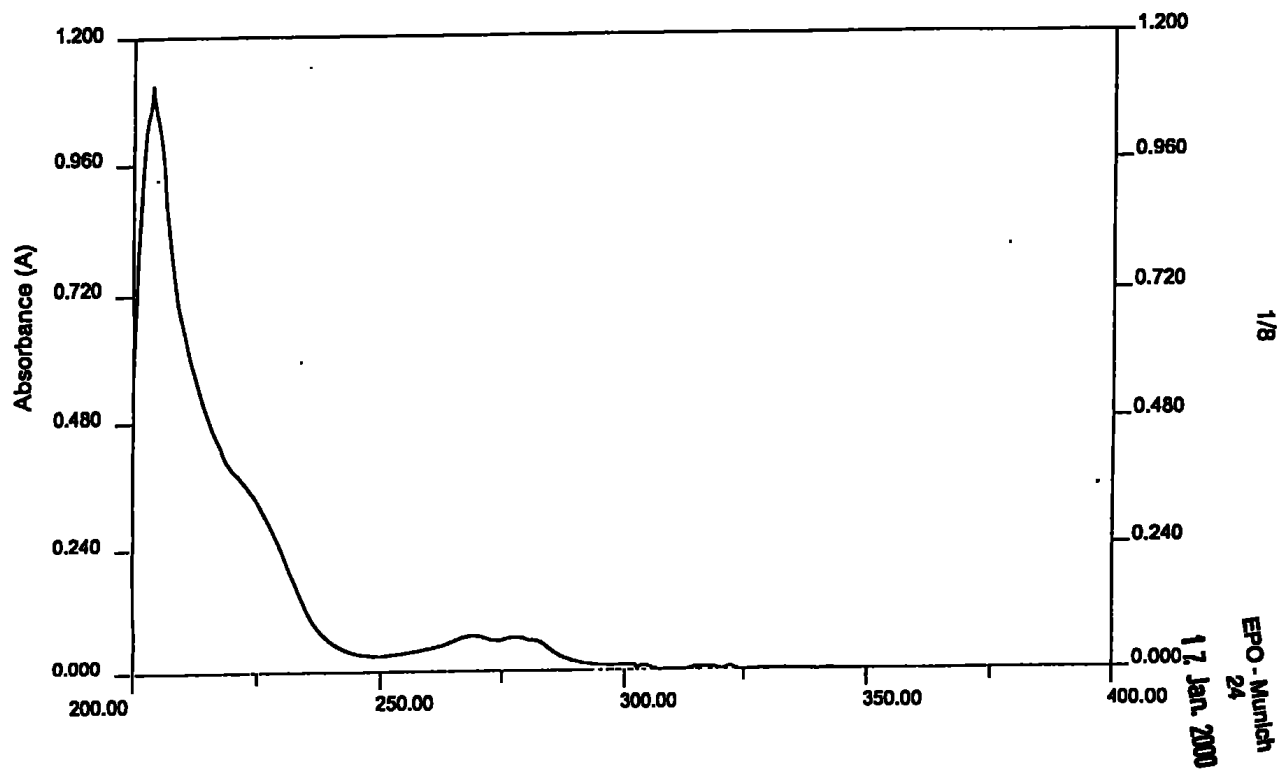
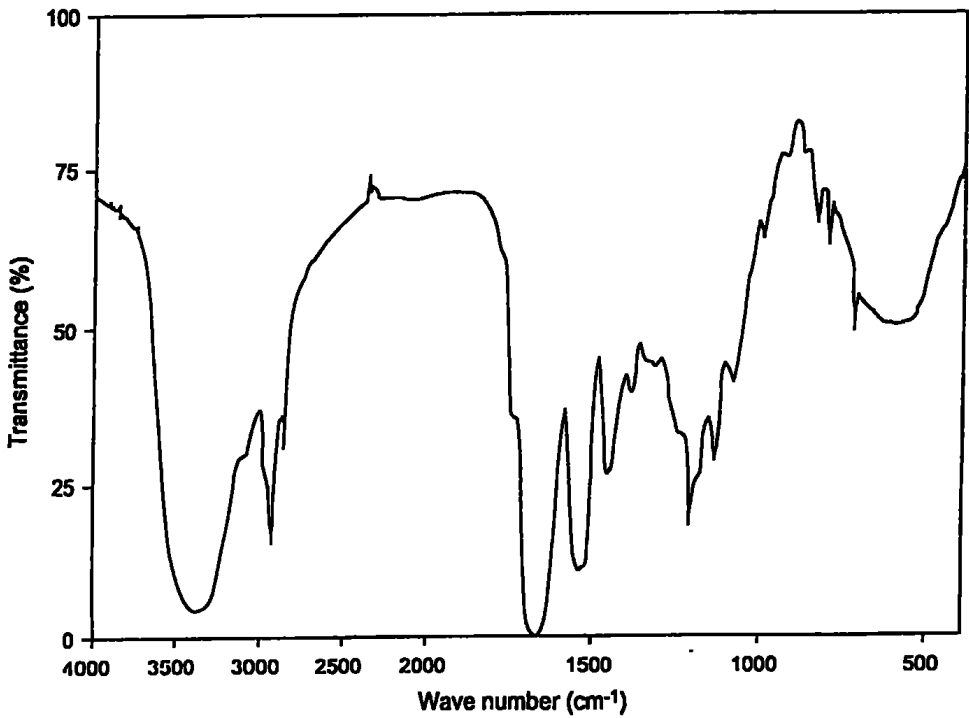


Fig. 2



2/8

94

3/8

Fig. 3

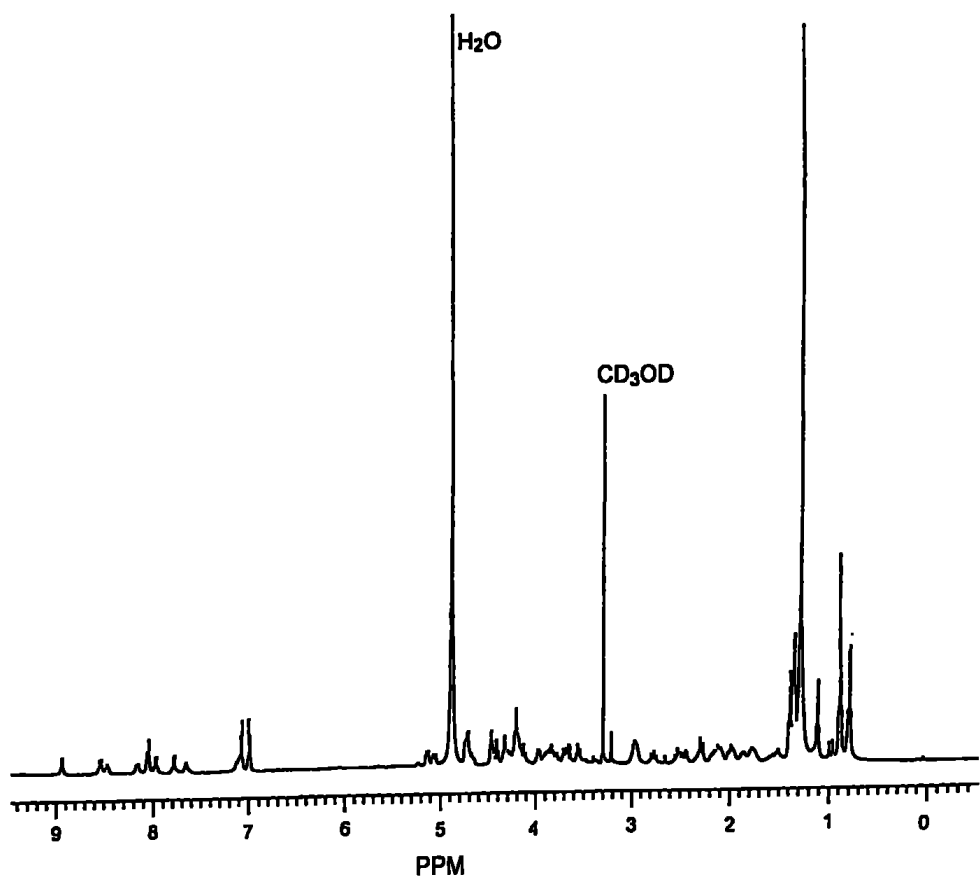
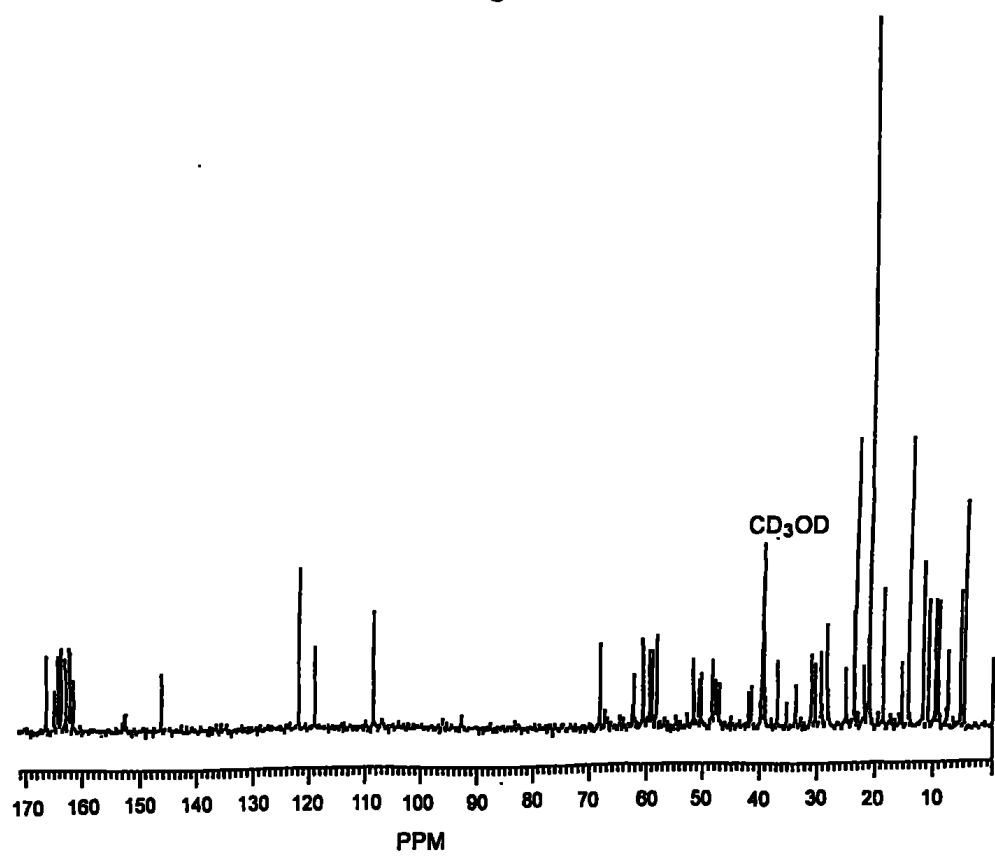


Fig. 4



95

Fig. 5

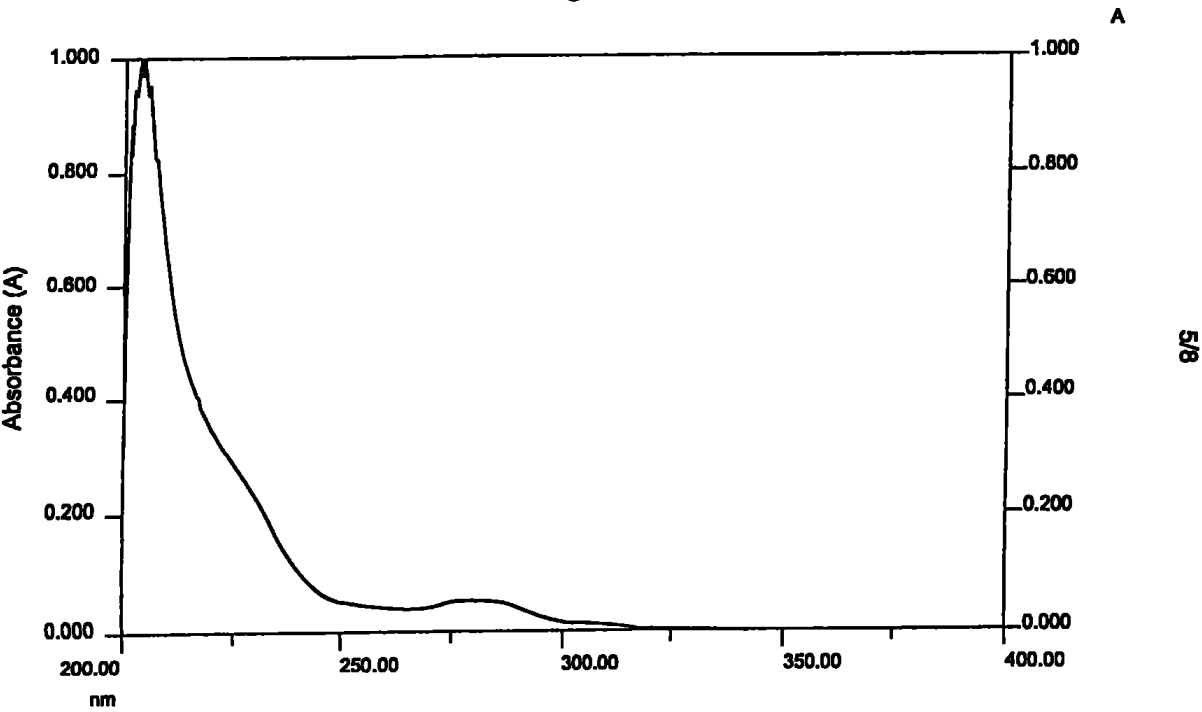
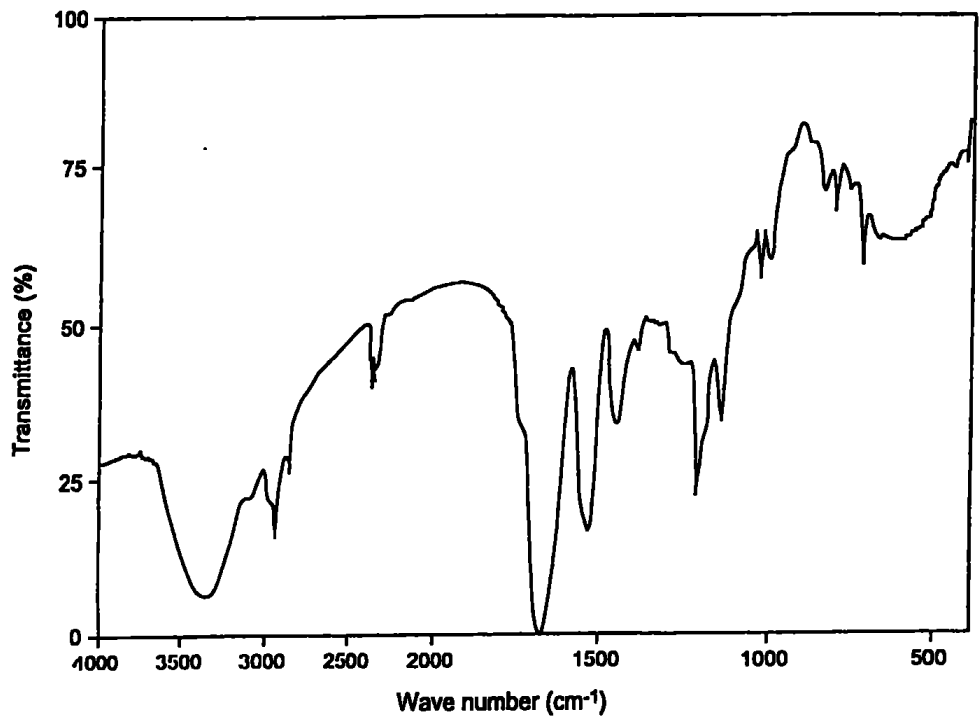


Fig. 6



6/8

7/8

Fig. 7

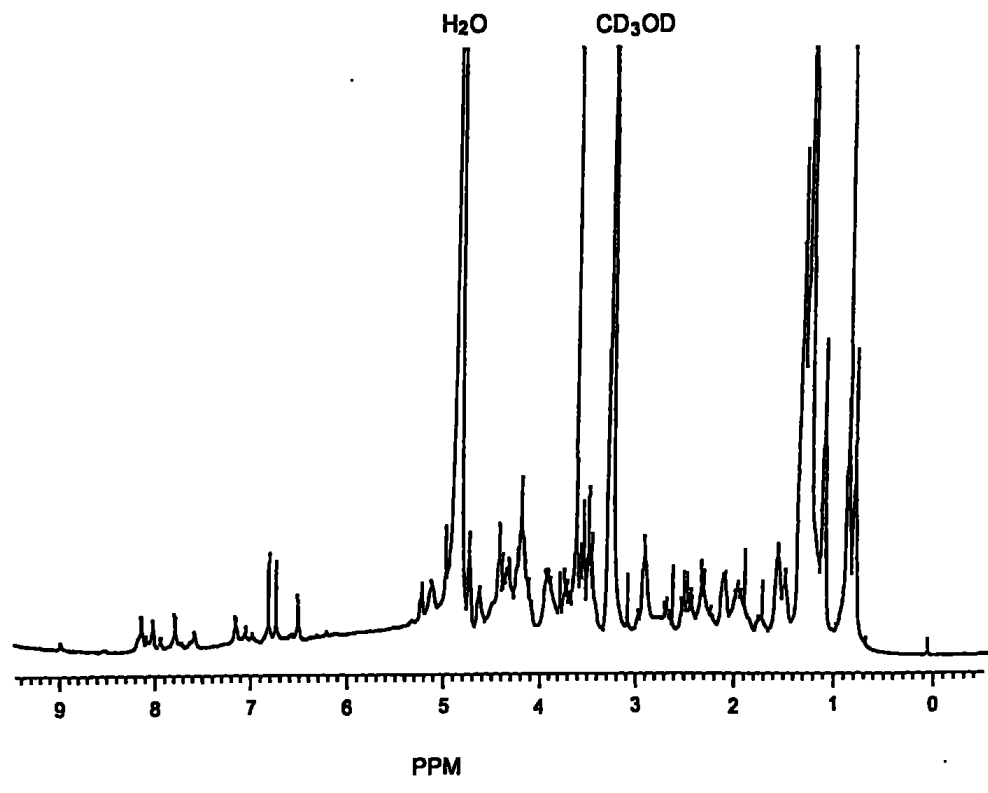
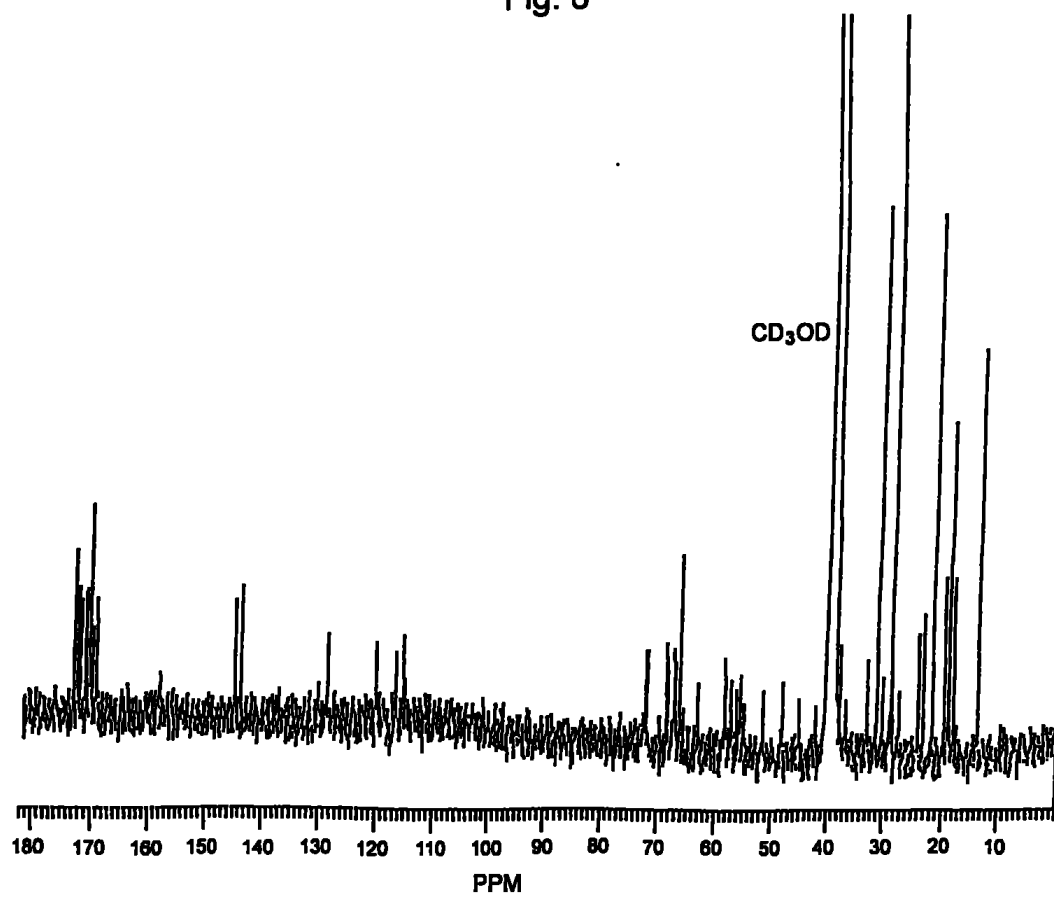


Fig. 8



8/8

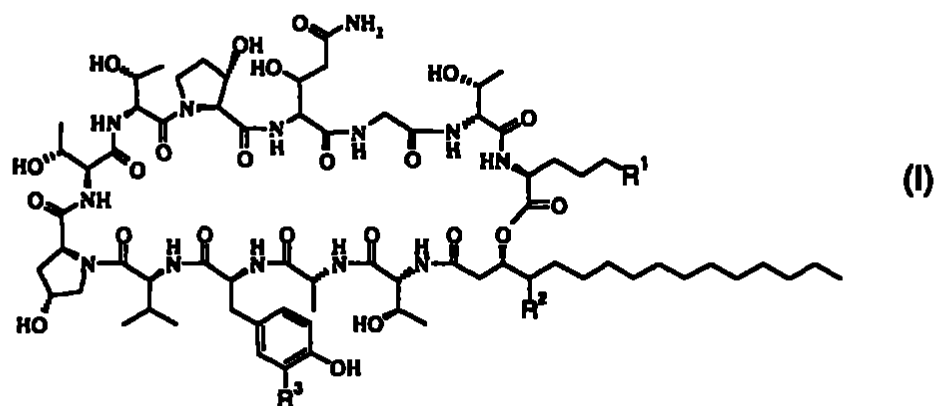
- 36 -

EPO - Munich
24

17. Jan. 2000

Abstract

The present invention relates to novel Aerothricins represented by the Formula (I),



wherein R^1 , R^2 and R^3 are as defined in Claim 1; and pharmaceutically acceptable
5 salts thereof.

The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising an
Aerothricin of the Formula (I) and a pharmaceutically acceptable carrier. Furthermore, the
present invention relates to the use of such Aerothricins for the preparation of
medicaments, as well as to processes for the preparation of the Aerothricins of the Formula
10 (I).

96102

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

REQUISITOS MINIMOS PARA /

Radicación : 01002340 00000000

Folios: 100

Fecha (MM): 2001-01-15 16:12:32

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRAR/ 411 PRESENTAR

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- Descripción de la invención ☒
- Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. ☐
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. ☐

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. ☐
- Representación gráfica del esquema de trazado ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. ☐

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

RC 99 103

INFORME DE PROTOCOLO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Expediente 01-2340

Fecha: 26 de Marzo del 2001.

Se certifica que:

Desde fecha 22 de junio de 1994,
del folio 76.618 al folio 76.623 del
libro de Protocolo N° 259, obra el
documento N° 15.256 conferido por F.
HOFFMANN LA ROCHE A.G.

 domiciliado(a) en Basilea -
Suiza

al doctor JOSE LLORED A CAMACHO y/o ALFONSO
LLORED A CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLORED A

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos

Facultad para desistir SI.

Revisado 202022.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
JOSE ANTONIO LLOREDA
Representante

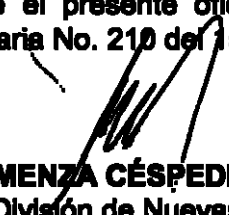
REFERENCIA:	Radicación No.	01-2340
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	0948
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29 MAR. 2001

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia