

OZ-2/P-1918
EX-PO

406311



P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,
sus territorios y plazas de soberanía, a
favor de:

POLITECHNIKA GDAŃSKA

entidad polaca, domiciliada en 11/12,
Majakowskiego Str., Gdańsk, Polonia, re-
lativa a:

"PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE DERIVADOS
DE ANTIBIOTICOS"

=====

Inventores: Leonard Falkowski, Mirosław Bobrowski,
Helena Buluk, Elzbieta Bylec, Barbara
Cybulska, Jerzy Golik, Paweł
Kołodziejczyk, Jan Pawlak, Andrzej
Rudowski, Jan Zieliński, Tadeusz
Zimiński y Edward Borowski

Prioridades: Solicitudes de patente en Polonia
nos. P-149994 de fecha 13 agosto
1971 y P-155167 de fecha 4 mayo
1972.

406311



Int. Cl.: C07G

MEMORIA DESCRIPTIVA

La invención tiene por objeto un procedimiento para la obtención de derivados de antibióticos del grupo macrólidos poliénicos. - - - - -

- 5. Se conoce ya toda una serie de antibióticos del grupo macrólidos poliénicos, tales como la nistatina, la amfotericina B, la tricomicina, la leuvorina y otros, que hallan una amplia aplicación práctica para cuidar las micosis. Se conoce igualmente, por una parte, su propiedad de reducción de la hipertrofia de la glándula prostática y, por otra parte, de hacer bajar el contenido de colesterol en la sangre. - - - - -
- 10.

- 15. El inconveniente de dichos antibióticos consiste en su falta de solubilidad en el agua, eliminada parcialmente por sus complejos a partir de desoxicolanato de sodio o de derivados N-acílicos. Sin embargo, el inconveniente esencial de dichas sustancias consiste en el hecho de que no forman soluciones moleculares sino únicamente soluciones coloidales. - - - - -

- 20. El complejo de amfotericina B con el desoxicolanato de sodio, denominado fungizon, provoca, además, el efecto de lisis de eritrocitos, debido a lo cual se constata la ane

406311



mia en el organismo cuidado con dicho complejo. Además, este complejo presenta componentes no neutros para un organismo viviente. - - - - -

5. Los derivados N-acílicos presentan, a su vez, una actividad biológica menor con respecto a los polienos no substituídos. - - - - -

10. La invención se propone obtener derivados de anti-bióticos del grupo macrólidos poliénicos con mejores propiedades terapéuticas, en particular para cuidar las micosis constitutivas, reduciendo además el contenido de colesterol en la sangre así como la hipertrofia de la glándula prostática. - - - - -

15. Resulta que este objetivo puede alcanzarse de una manera simple combinando por lo menos un grupo amina de una molécula de macrólido, tal como por ejemplo de nistatina, polifungina, amfotericina B, candicidina, pimaricina, tricomicina, leuvorina, rimocidina, con un mono- u oligosacárido de la serie de las aldosas o de las cetosas, tales como por ejemplo, la glucosa, la fructosa, la maltosa, la d-ribosa, 20. la ramnosa y otras, o con sus derivados, tales como por ejemplo, los ácidos glucurónicos y la bromoacetilglucosa. - - -

25. El procedimiento de obtención de derivados según la invención consiste en que se actúa sobre el macrólido poliénico, que contiene por lo menos un grupo amina, en un medio solvente, tal como por ejemplo dimetilformamida, metanol, piri-

40631111 AGO



- dina u óxidos dimetilsulfónicos o en una mezcla de solventes, por medio de un mono- u oligosacárido de la serie de las aldosas o cetosas, o bien por medio de sus derivados capaces de reaccionar con un grupo amina, eventualmente en presencia de un compuesto que forma una sal con la molécula del derivado de macrólido poliénico, dejando reaccionar el conjunto;
5. luego se extrae el producto de la reacción o se le hace pasar eventualmente a sal. Los derivados azucarados de antibióticos del grupo macrólidos poliénicos se utilizan como medicamentos fungicidas o como sustancias que reducen la hipertrofia de la glándula prostática o para disminuir el nivel de colesterol en la sangre. - - - - -
- 10.

La actividad de defensa contra las micosis in vitro de los derivados obtenidos se determinó según dos métodos: -

15. a. determinación de la actividad microbiológica de los antibióticos y de sus derivados en el medio de cultivo sólido - tabla 1 - - - - -
- b. determinación de la actividad microbiológica de los antibióticos y de sus derivados en un medio de cultivo líquido - tabla 2. - - - - -
- 20.

La actividad microbiológica se determinó según el método de dilución en series en el medio de cultivo sólido de la manera siguiente: se disolvió 1 mg de antibiótico en 1 ml de dimetilsulfóxido y el conjunto se disolvió en 9 ml de agua esterilizada. Se prepararon diluciones en serie con

25.

406311¹¹



- agua y se determinó la concentración mínima de detención del crecimiento de cepas normalizadas, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, mezclando en cajas de amasado de un diámetro de 10 cm una solución de 0,5 ml de antibiótico y una cantidad de 9,5 ml de cultivo según Sabouroud, a una temperatura de aproximadamente 60°C. El conjunto, después de haberlo mezclado y dejado solidificar, sembrando superficialmente un germen de bacterias, se dispuso durante un tiempo de 24 horas en un acumulador de calor a la temperatura de 36°C. La concentración mínima de detención del crecimiento se determinó sobre la base de observaciones de falta de crecimiento de dicho microbio. En la tabla 1 se citan los valores para la nistatina y su derivado glucósico. - - - - -
- 5.
- 10.

Tabla 1

Preparación	Concentración mínima de detención del crecimiento en mcg/ml con respecto a	
	<i>Candida albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
nistatina	2	2
20. derivado glucósico de la nistatina	2	4

- La actividad microbiológica de antibióticos y de sus derivados para un medio de cultivo líquido se determinó preparando diluciones en serie de antibióticos de la manera anteriormente descrita, mezclando una solución de 0,5 ml de antibióticos con 4,5 ml de medio de cultivo sembrado de microbios, preparado según Sabouraud, pero sin agar-agar con
- 25.

406311



una adición de tarco cilina en cantidad de 25 mg por litro. Las soluciones permanecieron 48 horas a la temperatura de 32°C. - - - - -

5. La concentración mínima de detención del crecimiento de los microbios se determinó por medio de la perturbación desarrollada por el crecimiento para una extensión de 660 nm y los resultados se cifran en la tabla 2. - - - - -

Tabla 2

10.	Rep. Antibiótico	MIC mcg/ml	Derivado	MIC mcg/ml
	1. pimaricina	2,5	NGL pimaricina	5,0
	2. rimocidina	2,5	NGL rimocidina	2,5
	3. nistatina A ₁	0,5	NGL nistatina A ₁	1,0
			NML "	2,5
			NRL "	2,0
15.	4. polifungina	0,5	NGL polifungina	1,0
			NGU "	5,0
	5. amfotericina B	0,05	NGL amfotericina B	0,2
			NGU "	0,5
20.	6. candidina	0,2	NGL candidina	1,0
	7. micoheptina	2,5	NGL micoheptina	2,5
	8. candicidina	0,001	NGL candicidina	0,005
	9. tricomicina	0,001	NGL tricomicina	0,005
	10. leuvorina	0,05	NGL leuvorina	0,2
25.	11. aureofacina	0,005	NGL aureofacina	0,025
			NGU "	0,025

en donde MIC - concentración mínima de detención de crecimiento

NGL - medio de cultivo derivado de glucosa

30.

NML - medio de cultivo derivado de maltosa

NRL - medio de cultivo derivado de d-ribosa

406311

41 AGO 1972



NGU - medio de cultivo derivado de glucurónicos

Como lo demuestran las determinaciones anteriormente descritas, la actividad antifúngica de los antibióticos del grupo de los macrólidos poliénicos es del mismo orden

5. que la de los antibióticos primarios. - - - - -

Se ha analizado igualmente la actividad de un derivado glucósico de nistatina, comparada con la de la nistatina, con respecto a una serie patogénica de cepas Candida y Geotrichum, aisladas a partir de órganos humanos contaminados. Los resultados de ensayo se cifran en la tabla 3. - - -

10.

Los ensayos biológicos de la fuerte toxicidad (LD₅₀) de dos preparaciones de derivado glucósico de polifungina, se ejecutaron en ratones de un peso del orden de 24 g. Los animales se sometieron a una inyección peritoneal de antibiótico bajo forma de una solución a partir de una solución fisiológica de cloruro de sodio en un volumen de 1,0 ml. Se comparó la fuerte toxicidad de la sal de sodio y la de las sales derivadas de imidazol glucósico de polifungina. Las dos preparaciones se aplicaron una sola vez a los ratones según las dosis siguientes: 4 mg/kg, 12 mg/kg, 36 mg/kg, 60 mg/kg, 80 mg/kg y 300 mg/kg en peso de los animales. Cada grupo comprendía 6 ratones. - - - - -

15.

20.

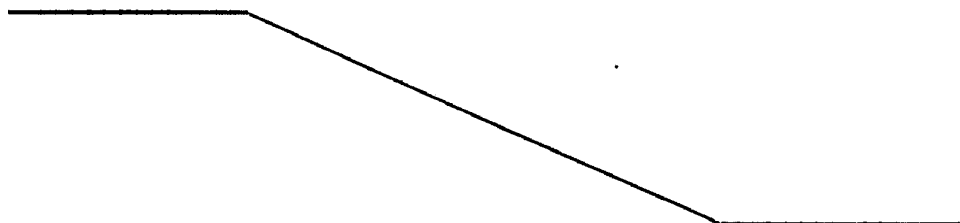
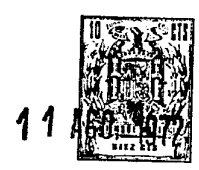




Tabla 3

Microbios	Nº de cepas analizadas	Nº de cepas cuyo crecimiento es detenido por la acción de la nistatina					Nº de cepas cuyo crecimiento es detenido por la acción del derivado glucósido de la nistatina					
		1,56	3,12	6,25	12,5	25,0	50,0	3,12	6,25	12,5	25,0	50,0
		mcg/ml					mcg/ml					
Candida albicans después 24 horas	12	1	11	0	0	0	0	1	11	0	0	0
Candida albicans después 48 horas	12	0	2	10	0	0	0	0	0	12	0	0
Candida sp. después 24 horas	8	2	3	1	2	0	0	2	5	0	1	0
Candida sp. después 48 horas	8	0	3	1	3	1	0	0	2	3	2	1
Geotrichum sp. después 24 horas	12	0	2	10	0	0	0	0	5	7	0	0
Geotrichum sp. después 48 horas	12	0	0	5	7	0	0	0	0	9	3	0

Después del paso de 24 y 48 horas desde el momento de la inyección se observó el número de animales muertos y luego se calcularon los porcentajes acumulativos de los animales vivos y muertos y luego se determinó la LD₅₀. Los resultados se cifran en la tabla 4.



406311

Tabla 4

Nº de animales muertos bajo el efecto del derivado glucósido de polifungina
Observaciones realizadas después de 24 horas Realizadas después de 48 horas

Dosis de antibiótico en mg/kg

	sal de sodio	sal imidazólica	sal de sodio	sal imidazólica
4	0	0	0	0
12	0	0	1	0
36	0	0	0	2
60	0	0	0	0
80	3	3	4	3
100	4	3	5	5
300	6	6	6	6
LD ₅₀	85 mg/kg	89 mg/kg	80 mg/kg	74 mg/kg

406311

11



La elevada toxicidad de las sales de sodio y de las sales del derivado imidazol glucósico de polifungina, expresadas en forma de la LD₅₀, es idéntica y varía en los límites de 80 mg/kg de peso. La sal de sodio es algo más tóxica para una dosis y observación de 24 horas. Sin embargo, para una observación de 48 horas, parece que la sal imidazol de polifungina es más tóxica. - - - - -

5.

La toxicidad según la escala de Berents es igual a 54,7 mg/kg en peso para la sal sódica de glucosa derivada de la polifungina, mientras que el valor es de 52,5 mg/kg para la sal imidazólica. - - - - -

10.

Se realizó la comparación in vivo de la actividad antifúngica de la polifungina insoluble y soluble en el agua de un derivado de polifungina como sal sódica glucósica por vía de ensayo en que se utilizaron ratones blancos de raza "Porton" de un peso del orden de 30 g. Los ratones fueron contaminados por medio de una cepa Candida albicans nº 4477 por vía venosa, inyectando en la vena caudal 0,2 ml de una suspensión que presentaba $3,3 \times 10^6$ células de Candida albicans obtenidas de un cultivo de 48 horas en agar de Sabouraud. - -

15.

20.

La preparación de una sal sódica glucósica del derivado de polifungina se disolvió en una solución al 0,9% de cloruro de sodio, mientras que la polifungina insoluble se preparó bajo forma de una misma suspensión en una misma solución. Los dos antibióticos se aplicaron a los ratones por el peritoneo bajo la forma de una solución de volumen de 0,5 ml

25.



406311

por día durante todo el tiempo de los ensayos. Se aplicaron las dosis siguientes: 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg y 16 mg/kg de antibióticos con relación al peso de los animales. En el grupo de control no se aplicaron antibióticos. Cada grupo comprendía seis ratones. - - - - -

5.

A partir del cuarto día contado desde la contaminación, cada dos días se sacrificó un ratón de cada grupo interrumpiendo la continuidad de la columna vertebral y los ratones fueron seccionados para determinar el número de células *C. albicans* por cada gramo de peso de los riñones. - - - - -

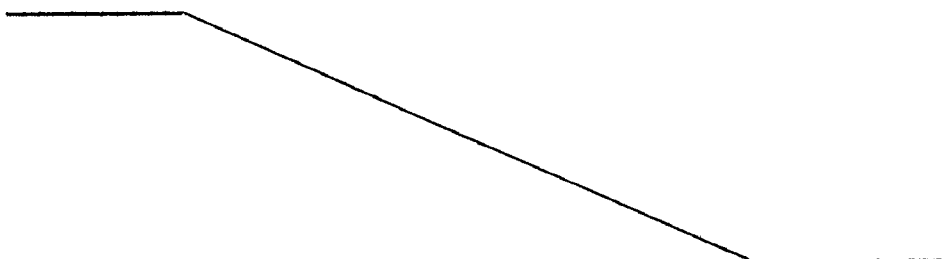
10.

Los riñones se pesaron y homogenizaron en morteros bacteriológicos de vidrio. El producto homogéneo obtenido se diluyó por serie con una solución fisiológica de cloruro de sodio, después de lo cual se sembró un volumen de 0,1 ml de cada preparación homogénea, así como de diluciones, sobre un medio de cultivo sólido de Sabouraud. Después de 48 horas de incubación a la temperatura de 30°C, se contaron las colonias aumentadas y se calculó el número de células de *Candida albicans* que se hallaban por 1 gramo de riñones de los animales examinados. - - - - -

15.

20.

Los resultados de ensayo se cifran en la tabla 5.-



406311



Tabla 5

Antibiótico aplicado	Dosis diaria	Nº de días pasados desde la contaminación						
		4	6	8	10	12	14	
		Nº células Candida albicans / 1 g riñones						
Derivado glucósico de polifungina	0	8,0x10 ⁴	1,9x10 ⁴	1,8x10 ⁶	5,0x10 ⁷	1,4x10 ⁷	1,0x10 ⁶	
	1	4,5 "	5,3 "	7,6 "	1,4 "	2,4 "	1,9 "	
	2	1,0 "	1,6x10 ⁵	3,5x10 ⁵	1,0x10 ⁵	1,0x10 ⁶	4,9x10 ⁵	
	4	2,0 "	3,0x10 ⁴	1,2x10 ⁴	2,9x10 ⁴	1,1x10 ³	4,2x10 ⁴	
	8	1,1 "	1,3x10 ³	0	2,5x10 ⁴	0	0	
	16	9,5x10 ³	0	0	0	0	0	
Polifungina	1	3,3x10 ⁴	8,2x10 ⁵	7,9x10 ⁴	5,2x10 ⁶	1,4x10 ⁵	5,2x10 ⁶	
	2	1,7x10 ⁶	8,2x10 ⁵	2,3x10 ⁵	1,7x10 ⁶	2,6x10 ⁶	4,3x10 ⁵	
	4	8,6x10 ⁵	4,4x10 ⁵	1,0x10 ⁴	4,1x10 ³	1,5x10 ⁶	1,2x10 ⁶	
	8	2,2x10 ⁴	3,7x10 ⁴	3,7x10 ³	6,4x10 ⁴	6,3x10 ⁴	1,3x10 ³	
	16	2,0x10 ⁶	3,9x10 ⁴	3,9x10 ³	4,3x10 ³	1,1x10 ⁴	3,6x10 ³	

Como se observa, según los ensayos ejecutados y sus resultados, la sal sódica del derivado glucósico de polifungina demuestra una actividad mucho más importante in vivo con respecto al antibiótico materno cuando tiene lugar el tratamiento de los ratones con células candidiásicas. - - -

Aplicando un derivado soluble glucósico de polifungina dosificado en una cantidad de 8 a 16 mg/kg en peso, se obtiene la esterilización completa de los riñones de los ratones. - - - - -

10. Utilizando polifungina insoluble no se han obteni-

406311

11 AGO



do los mismos resultados. - - - - -

5. La ventaja de los derivados sucríficos de los macrólidos poliénicos formados por combinaciones de dichos antibióticos con mono- u oligosacáridos y sus derivados, consiste en la dispersión fácil en el agua y, en el caso de los macrólidos poliénicos y de sus derivados que presentan un grupo ácido, en la susceptibilidad de formar, en un medio próximo a un medio neutro, sales permanentes con cationes que se disuelven muy bien en el agua. - - - - -

10. Diversos derivados de diferentes macrólidos poliénicos y de diferentes azúcares, así como sus sales diversas con cationes solubles en agua, forman soluciones que se componen de coloides de diferentes contenidos con alto grado de dispersión y solución molecular. Entre estas sustancias, muchas de ellas, tales como la sal de sodio glucósica o maltósica derivada de la nistatina, forman soluciones moleculares desprovistas de coloides. Tales derivados solubles y permanentes de azúcares de macrólidos poliénicos y sus sales presentan una gran actividad biológica. Su espectro biológico es idéntico al de los antibióticos primarios. Además, estos compuestos comparados con el fungizón no provocan la lisis de eritrocitos. - - - - -

25. La reacción de los macrólidos poliénicos que contienen un grupo amina con azúcares se efectúa en condiciones suaves, incluso sin utilización de catalizadores, cuyo empleo acelera únicamente la reacción; en cambio, debido a la faci-



40631111

lidad de reaccionar de los azúcares con los grupos aminos de macrólidos poliénicos, es inútil hacer reaccionar previamente los azúcares. - - - - -

5. El procedimiento de obtención de derivados sucrícos de macrólidos poliénicos y su modo de depuración se ilustran en los ejemplos siguientes. - - - - -

E j e m p l o I

10. Se disuelven 3,0 g de nistatina ($E_{1cm}^{1\%} = 560$ para 304 nm), 3,0 g de glucosa y 0,5 g de imidazol en 50 ml de dimetilformamida y el conjunto permanece en un acumulador de calor a la temperatura de 36°C durante un tiempo de dos días. Al cabo de este período, ha reaccionado prácticamente la totalidad del antibiótico. Se hace precipitar el derivado obtenido y la glucosa que no ha reaccionado por medio de éter etílico, se lava con este solvente y se seca al vacío. Se obtienen 6,1 g de derivado bruto bajo forma de una sal de imidazol con $E_{1cm}^{1\%} = 260$ para nm. - - - - -

E j e m p l o II

20. Se disuelven 3,0 g de nistatina ($E_{1cm}^{1\%} = 560$ para 304 nm) y 3,0 g de glucosa en 50 ml de dimetilformamida y se deja el conjunto a la temperatura de 36°C durante dos días. El modo operatorio siguiente es el mismo que en el ejemplo I. Se obtienen 5,6 g de derivado bruto glucósico con $E_{1cm}^{1\%} = 280$ para 304 nm. - - - - -

406311

41



E j e m p l o III

5. Se disuelven 10,0 g de polifungina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 825$ para 304 nm) en 50 ml de dimetilformamida, se añaden 3,0 g de glucosa y 0,1 g de ácido ascórbico y el conjunto permanece durante dos días a la temperatura de 36°C en un acumulador de calor. La operación siguiente es como la que se ha indicado en el ejemplo I. Se obtienen 12,9 g de derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 570$ para 304 nm. - - - - -

E j e m p l o IV

10. Se disuelven 0,5 g de nistatina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 640$ para 304 nm) y 0,5 g de maltosa en 20 ml de dimetilformamida y se deja a la temperatura de 36°C durante dos días. El modo operatorio ulterior es como el descrito en el ejemplo I. Se obtienen 0,9 g de derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 310$ para 304 nm. - - - -

15. E j e m p l o V

- Se prepara una suspensión de 1,0 g de anfotericina B ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1420$ para 382 nm) y 0,3 g de glucosa en 20 ml de dimetilformamida y se deja durante 48 horas a la temperatura de 36°C. El modo operatorio ulterior es igual que el del ejemplo I.
20. Se obtienen 1,3 g de derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1050$ para 382 nm. - - - - -

E j e m p l o VI

Se deja durante dos días 1,0 g de anfotericina B ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1420$)

406311

1.1 AL



para 382 nm) y 0,6 g de maltosa en 20 ml de dimetilformamida a la temperatura de 36°C. Lo demás es según el ejemplo I. Se obtienen 1,5 g de derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 960$ para 382 nm.

E j e m p l o VII

5. Se disuelve 1,0 g de candicidina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 430$ para 378 nm) y 1,0 g de glucosa así como 0,05 g de imidazol en 50 ml de piridina y se deja el conjunto a la temperatura ambiente en la obscuridad durante 7 días. Las otras operaciones son como en el ejemplo I. Se obtienen 2,1 g de derivado bruto bajo forma de una sal de base orgánica con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 200$ para 378 nm. - -
- 10.

E j e m p l o VIII

- Se disuelven 0,5 g de candicidina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 750$ para 378 nm) y 0,3 g de maltosa en 10 ml de dimetilformamida y se deja durante dos días a la temperatura de 36°C. El tratamiento posterior es idéntico al del ejemplo I. Se obtienen así 0,7 g de un derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 410$ para 378 nm. - - - - -
- 15.

E j e m p l o IX

- Se disuelven 0,5 g de pimaricina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 800$ para 304 nm), 0,5 g de d-ribosa y 0,5 g de imidazol en 100 ml de metanol y se deja esta mezcla durante 24 horas a la temperatura de 36°C. Luego se destila el metanol al vacío hasta un volumen de 10 ml y se hace precipitar el derivado bruto que se lava con éter etílico. Se obtiene 1 g de sustancia bruta con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 340$ para 304 nm, bajo forma de una sal de imidazol. -
- 20.

406311



E j e m p l o X

- Se disuelve 1,0 g de pimaricina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 800$ para 304 nm) y 0,6 g de maltosa en 20 ml de dimetilformamida y se deja durante dos días a la temperatura de 36°C. Luego se procede como en el ejemplo I. Se obtienen 1,4 g de derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 530$ para 304 nm. - - - - -
- 5.

E j e m p l o XI

- Se disuelven 0,5 g de polifungina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 700$ para 304 nm), 0,5 g de maltosa y 0,1 g de imidazol en 20 ml de dimetilformamida y el conjunto permanece a la temperatura de 36°C durante 48 h. Se procede, luego, como en el ejemplo I. Se obtienen 1,1 g de derivado bruto bajo forma de una sal de imidazol con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 318$ para 304 nm. - - - - -
- 10.

E j e m p l o XII

- Se disuelven 0,5 g de tricomicina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$ para 378 nm) y 0,15 g de glucosa en 8,0 ml de dimetilformamida y se deja durante 48 horas a la temperatura de 36°C. Se procede luego de la misma manera que en el ejemplo I. Se obtienen 0,55 g de derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 360$ para 378 nm. - - - - -
- 15.

20. E j e m p l o XIII

Se disuelven 1,0 g de tricomicina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$ para 378 nm) y 0,6 g de maltosa en 20 ml de dimetilsulfóxido y se deja el conjunto durante 48 horas a la temperatura de 36°C. Se proce

406311

41 AG



de luego de la misma manera. Se obtienen así 1,4 g de un derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 320$ para 378 nm. - - - - -

E j e m p l o XIV

- Se disuelven 0,5 g de pimaricina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 800$ para 304 nm),
5. 0,5 g de fructosa y 0,1 g de imidazol en 20 ml de una mezcla constituida por una proporción de dimetilformamida y de metanol igual a 2:1 y se deja durante 48 horas a la temperatura de 36°C. Se procede luego de la misma manera que en el ejemplo I. Se obtiene 1,0 g de un derivado bruto bajo forma de
10. una sal de imidazol con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 370$ para 304 nm. - - - - -

E j e m p l o XV

- Se disuelven 0,1 g de leuvorina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 800$ para 378 nm) y 0,1 g de glucosa en 2,0 ml de dimetilformamida y, durante 48 horas, se deja a la temperatura de 36°C. Se procede luego de
15. la misma manera que en el ejemplo I. Se obtienen 0,2 g de un derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 370$ para 378 nm. - - - - -

E j e m p l o XVI

- Se disuelven 0,5 g de leuvorina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 800$ para 378 nm) y 0,3 g de maltosa en 20 ml de una mezcla con una relación de
20. 2:1 de dimetilformamida y de piridina y se deja durante 48 horas a la temperatura de 36°C. Luego se procede de la misma manera que en el ejemplo I. Se obtienen 0,7 g de un derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 520$ para 378 nm. - - - - -

406311

41 AGC



E j e m p l o XVII

Se disuelve 1,0 g de rimocidina ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$ para 304 nm), 1,0 g de glucosa y 0,2 g de imidazol en 15 ml de dimetilformamida, y se deja durante 48 horas a la temperatura de 36°C.

- 5. Luego se actúa de la misma forma que en el ejemplo I. Se obtienen así 2,0 g de un derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 230$ para 304 nm. - - - - -

E j e m p l o XVIII

- 10. Se disuelve 1,0 g de derivado glucósico bruto de candicidina bajo forma de sal de imidazol, obtenida según el ejemplo VII, en 20 ml de agua, y después de acidulación con ácido acético se hace precipitar con 20 ml de butanol. Después de solidificación de la capa se separa la capa de agua y el residuo de la capa de butanol que contiene el derivado de antibiótico
- 15. se lava varias veces con butanol concentrado y acidulado con ácido acético y agua, por porciones de 10 ml, hasta la separación completa del imidazol. Se concentra el residuo de la solución derivado butanólico glucósico de candicidina, liberado de la sal de imidazol, al vacío hasta la evacuación completa azeotrópica del agua. Se precipita del resto de la solución el derivado de éter etílico, se lava el depósito con este solvente y se seca al vacío. Se obtienen 0,5 g de producto sin imidazol con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 300$. De la misma forma se libera el derivado de azúcar de las sales de imidazol que quedan en
- 25. los macrólidos poliénicos. - - - - -

406311

11 AGO.



E j e m p l o XIX

Se disuelven 10 g del producto bruto obtenido por reacción de la nistatina con la glucosa (ejemplo II) en 100 ml de mezcla de acetato de etilo, de butanol, de metanol y de agua, según la relación 20:10:5:35. - - - - -

- 5. Se filtra la solución por medio de una capa de celitas y se carga en cinco elementos de un aparato de separación a contracorriente, se efectúan 100 transposiciones de la fase superior e, inversamente, 50 transposiciones de las fases superiores e inferiores. La posición de la substancia
- 10. antibiótica es determinada por medida de la absorción de la luz para 304 nm, después de dilución de las muestras tomadas en la fase superior con la ayuda de metanol. Se aíslan elementos correspondientes a las posiciones del diagrama de separación a contracorriente del antibiótico, una substancia
- 15. purificada por destilación de los solventes con una adición de butanol en pequeña cantidad al vacío y se precipita residuo con éter etílico. Se lava el depósito con éter etílico y se seca al vacío. Se obtienen 1,5 g de preparación con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 720$ por nm. - - - - -

20. E j e m p l o XX

Se disuelven 200 mg de derivado glucósico de candidina obtenido según el ejemplo XVIII en 2,0 ml de una mezcla de cloroformo, de metanol y de agua, según una relación de 10:5:1 y se efectúa la separación en una columna llena de 7,0 g de

406311

11 AGO



Sephadex LH-20, y se determina el diagrama del flujo del antibiótico sobre la base de la medida de la absorción de la luz a 378 nm. El eluido que presenta el antibiótico purificado se somete al aislamiento por evaporación del solvente adic

- 5. cionado con butanol al vacío, luego a la precipitación con éter etílico y al lavado con éter del depósito y finalmente al secado al vacío. Se obtienen así 60 mg de producto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 700$. - - - - -

E j e m p l o XXI

- 10. Se purifican 0,5 g de derivado bruto glucósico de nistatina obtenido según el ejemplo II según el método cromatográfico de partición en una columna cargada de gel de sílice del tipo Kieselgel Merck, con grano inferior a 0,08 mm, empapado de agua en proporción de 1:1. Aplicando una mezcla de cloro-
- 15. formo, de metanol y de agua en proporción de 10:10:3, se determina el diagrama del eluido del antibiótico de la columna por vía de medida de la absorción de la luz a 304 nm. Del eluido se separa la sustancia purificada por evaporación de los solventes adicionados de butanol, al vacío, luego se pre-
- 20. cipita con éter etílico, se lava el depósito con dicho solvente y se seca al vacío. Se obtienen 0,12 g de preparación con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 715$ para 304 nm. - - - - -

E j e m p l o XXII

- 25. Se añaden 0,5 g de derivado purificado glucósico de nistatina obtenido según el ejemplo XIX a 10 ml de agua y mezclando

406311¹ AG



5. vivamente en un baño de hielo, se neutraliza con una cantidad molar 0,1 N de una solución de carbonato ácido de sodio, después de lo cual se efectúa la liofilización de la solución. Se obtienen 0,5 g de sal sódica glucósica de un derivado de nistatina con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 710$ para 304 nm. - - - - -

E j e m p l o XXIII

10. Se dispersan 0,5 g de derivado glucósico de amfotericina B obtenido según el ejemplo V, purificado según el modo descrito en el ejemplo XIX con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1370$ en 10 ml de agua, enfriando luego en un baño de hielo, se mezcla fuertemente neutralizando hasta un pH = 7,2 por medio de una solución 0,1 N acuosa de sosa cáustica. Se liofiliza la solución salada clarificada obtenida. Se obtienen 0,5 g de una sal sódica glucósica de derivado de amfotericina B con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1335$ para

15. 382 nm. - - - - -

E j e m p l o XXIV

20. Se disuelven 1,0 g de pimaricina con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 800$ para 304 nm, y 0,6 g de ramnosa en 100 ml de metanol y se deja durante 48 horas a la temperatura de 36°C. Se destila el metanol hasta un volumen de aproximadamente 10 ml y se aísla el derivado bruto por precipitación y lavado con éter etílico. Se obtienen 1,5 g de derivado con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 550$ para 304 nm. - - - - -

E j e m p l o XXV

Se disuelven 1,0 g de pimaricina con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 800$ para 304 nm,

406311

11 AGO. 1972



y 0,6 g de 6-acetilglucosa en 100 ml de metanol y se deja durante 48 horas a la temperatura de 36°C. Se procede luego según el mismo modo que el del ejemplo XXIV. Se obtienen 1,55 g de derivado bruto con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 540$ para 304 nm. - - - -

5. Ejemplo XXVI

Se realiza una suspensión de 1,5 g de derivado azucarado de antibiótico en 20 ml de agua, y luego se añaden 10 mg de imidazol, se filtra por medio de un Sephadex G-15 y se liofiliza. - - - -

10. Ejemplo XXVII

Se realiza una suspensión de 1 g de derivado azucarado de antibiótico en 20 ml de agua, se añaden 84 mg de carbonato ácido de sodio y se hace pasar por un Sephadex G-15 y luego se liofiliza. - - - -

15. Ejemplo XXVIII

Se realiza una suspensión de 1 g de derivado azucarado de antibiótico en 20 ml de agua, se añaden 120 mg de 2-amina-2-(hidroximetil)-propan-1,3-diol y se hace pasar por un Sephadex G-15 y se liofiliza. - - - -

20. Ejemplo XXIX

Se realiza una suspensión de 1 g de derivado azucarado de antibiótico en 20 ml de agua, luego se añaden 84 mg de carbona

406311

91 AGO



to ácido de sodio o bien 100 mg de imidazol, luego se destila el agua bajo presión reducida con butanol y se hace precipitar la sal del derivado con un éter seco etílico. - - - -

E j e m p l o XXX

- 5. Se realiza una suspensión de 200 mg de aureofacina con 50 mg de ácido glucurónico en 10 ml de dimetilformamida y se deja durante la noche a la temperatura de 32°C. Se centrifuga la substancia no disuelta y se precipita el antibiótico con el éter seco etílico. Se obtienen 110 mg de derivado glucurónico con $E_{1cm}^{1\%} = 370$ para 380 nm. - - - - -
- 10.

E j e m p l o XXXI

- Se realiza una suspensión de 200 mg de amfotericina B y 50 mg de ácido glucurónico en 10 ml de dimetilformamida y se deja durante la noche a la temperatura de 32°C. El derivado obtenido se precipita con éter seco etílico. Se obtienen 240 mg de derivado glucurónico con $E_{1cm}^{1\%} = 940$ para 382 nm. -
- 15.

E j e m p l o XXXII

- Se realiza una suspensión de 200 mg de polifungina y 50 mg de ácido glucurónico en 10 ml de dimetilformamida y se deja durante la noche a la temperatura de 32°C. Se hace precipitar el derivado creado con el éter seco etílico. Se obtienen 156 mg de derivado glucurónico con $E_{1cm}^{1\%} = 480$ para 304 nm. -
- 20.

406311



E j e m p l o XXXIII

Se disuelven 100 mg de pirimicina con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 710$ para 380 nm en 5 ml de dimetilformamida, luego se añaden 30 mg de ácido D-glucurónico y se deja durante 24 horas a la temperatura de

5. 38°C. Se hace precipitar el derivado bruto con 100 ml de éter seco etílico. Se obtienen así 100 g de substancia con $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 690$ para 380 nm. - - - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - -

10.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Procedimiento de obtención de derivados de anti-
tibióticos, del grupo macrólidos poliénicos, en los cuales
por lo menos un grupo amina de la molécula de macrólido, tal
como por ejemplo la nistatina, la polifungina, la anfoterici-
na B, la candicidina, la pimaricina, la tricomicina, la leu-
vorina, la rimocidina, está combinado con un mono- u oligosa-
cárido de la serie de las aldosas o de las cetosas, tales co-
mo por ejemplo la glucosa, la fructosa, la maltosa, la d-ri-
bosa, la ramnosa o bien con sus derivados, tales como los
ácidos glucurónicos y acetilglucosas, caracterizado porque
se actúa sobre el macrólido poliénico, que contiene por lo
menos un grupo amina, en un medio solvente, tal como por
ejemplo dimetilformamida, metanol, dimetilsulfóxido, piridi-

15.

20.



na, o en una mezcla de dichos solventes, con un mono- u oligosacárido de la serie de las aldosas o cetosas, o bien por medio de sus derivados, capaces de reaccionar con un grupo amina, eventualmente en presencia de un compuesto que forma una sal con una molécula del derivado de macrólido poliéni-
5. co, luego se deja reaccionar el conjunto y finalmente, se se para el producto de la reacción y eventualmente se le hace pasar a sal. - - - - -

2.- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE DERIVADOS DE AN
10. TIBIOTICOS". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de veintiseis hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

BARCELONA, 11 AGO. 1972

M. A. M. CURELL-SUNOL

maf.