

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

- 2 FEB. 1978.



ESPAÑA

CONCEDIDA

(19) ES	(11) NUMERO 438093	(10) A I
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION 22 FEB. 1977	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
P-188 979	22 Abril 1976	Polonia
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07H A61K	---
(64) TITULO DE LA INVENCION		
"Método de preparar derivados N-glicosílicos de macróluros de polieno y sus sales"		
(71) SOLICITANTE (S)		
POLITECHNIKA GDANSKA e INSTYTUT PRZEMYSŁU FARMACEUTYCZNEGO		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
ul. Majakowskiego 11/12, Gdańsk, Polonia y ul. Rydygiera 8, Warszawa, Polonia, respectivamente		
(72) INVENTOR (ES)		
Leonard Falkowski, Zuzanna Kowszyk-Gindifer, Zofia Płóciennik, Jan Zieliński, Halina Dahlig, Jerzy Golik, Ewa Jakobs, Paweł Kołodziejczyk, Elżbieta Bylec, Danuta Roślik-Kamińska, Władysław Wagner, Jan Pawlak y Edward Borowski		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
M. Curell Suñol		

OZ-2/P-2490
EX-PO

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

por VEINTE años

solicitada en España a favor de POLITECHNIKA GDAŃSKA e
INSTYTUT PRZEMYSŁU FARMACEUTYCZNEGO, ambas de nacionalidad
polaca, domiciliadas respectivamente en ul. Majakowskiego
11/12, Gdańsk, Polonia y ul. Rydygiera 8, Warszawa, Polonia,
por "Método de preparar derivados N-glicosílicos de macrolu
ros de polieno y sus sales", con prioridad de la solicitud
polaca P-188 979 de fecha 22 Abril 1976. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un método de
preparación de derivados N-glicosílicos de macroluros de po
lieno y sus sales, particularmente sal N-metilglucamínica.-

5. Un objetivo de la presente invención es un método
de preparar derivados N-glicosílicos de macroluros de polie
no y sus sales, particularmente nuevas sales N-metilglucamí
nicas. - - - - -

Los métodos conocidos de preparación de derivados

N-glicosílicos de macroluros de polieno y sus sales comprenden tratar macroluros de polieno que contienen un grupo amino con mono- u oligosacáridos aldosa o cetosa en un medio disolvente orgánico o en una mezcla de disolventes. El derivado así obtenido, junto con el azúcar no reaccionado, se precipita del medio de reacción con éter etílico, se lava con éter etílico, se seca bajo presión reducida, luego se separa del azúcar y finalmente se transforma en sal. Sin embargo, el método anteriormente descrito requiere la utilización de disolventes caros y combustibles así como una serie de operaciones adicionales para la separación del producto respecto al exceso de azúcar no reaccionado. - - - - -

5.

10.

Además de estas desventajas, las sales obtenidas de esta manera, si bien solubles en agua, no formaban disoluciones límpidas, lo que limitaba su uso. - - - - -

15.

El método para producir derivados N-glicosílicos de macroluro de polieno y particularmente sales N-metilglucamínicas que comprende tratar macroluros de polieno que contienen un grupo amino en un disolvente orgánico o en una mezcla de disolventes con mono- u oligosacárido aldosa o cetosa, según la presente invención, consiste en la precipitación de derivados N-glicosílicos con agua o con disolución acuosa de una sal inorgánica, preferentemente sulfato amónico, la purificación por cristalización a partir de alcohol superior, preferentemente n-butanol, la conversión en sal,

20.

25.

preferentemente en sal N-metilglucamínica, y la cristalización a partir de alcohol superior, preferentemente n-butanol. - - - - -

5. La ventaja de la presente invención reside en la posibilidad de obtener nuevas sales N-metilglucamínicas de derivados N-glicosílicos de macroluros de polieno. Estas sales, así como los macroluros de polieno, sus derivados N-glicosílicos y sus sales ya conocidas, presentan actividad antifúngica. - - - - -

10. Las nuevas sales presentan el mismo espectro antifúngico que los antibióticos de origen o sus complejos, por ejemplo la denominada fungizona, el complejo soluble en agua de anfotericina B con desoxicolato sódico, la única forma soluble en agua de este antibiótico utilizada en quimioterapia. Sin embargo, algunas de las nuevas sales, por ejemplo la sal N-metilglucamínica del derivado N-glicosílico de polifungina, al contrario de la fungizona, presentan actividad contra la *Trichomonas vaginalis*. La polifungina inhibe el crecimiento de la *Trichomonas vaginalis* a una concentración de 837,7 mcg/ml, mientras que la concentración inhibidora de la sal N-metilglucamínica del derivado N-glicosílico de la polifungina es de 268,4 mcg/ml. - - - - -

20. Adicionalmente, estas sales, por ejemplo la sal N-metilglucamínica del derivado N-glicosílico de anfotericina B, presentan mejores propiedades antifúngicas que la fun

gizona contra muchos microorganismos, por ejemplo *Torula* sp., *Geotrichum candidum* y *Cryptococcus neoformans*. Las actividades in vitro de las sales N-metilglucamínicas del derivado N-glicosílico de anfotericina B y fungizona contra algunos hongos se comparan en la tabla 1. - - - - -

Tabla 1

Hongos	Concentración activa mínima CE ₁₀ (en mcg/ml)	
	Sal N-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de anfotericina B	Fungizona
<i>Torula</i> sp.	1,66	2,39
<i>Geotrichum candidum</i>	1,07	1,48
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,25	1,48

Existe una sensibilidad diferente de las diferentes cepas, por ejemplo *Candida* sp., a la sal N-metilglucamínica del derivado N-glicosílico de anfotericina B y fungizona. Estadísticamente, la cantidad de cepas insensibles a la fungizona es mucho mayor que la cantidad de las cepas insensibles a la sal N-metilglucamínica. Esto es especialmente cierto en el caso de las cepas *Candida albicans* ZM, HM, y 1/75, de las cepas *Candida tropicalis* JD y 20/75 y de las cepas *Candida krusei* TS y 16/75, que son insensibles a la fungizona pero sensibles a la sal N-metilglucamínica del derivado N-glicosílico de la anfotericina B. - - - - -

El índice de actividad relativa que representa la actividad del antibiótico en la quimioterapia experimental de los ratones infectados con *Candida albicans* es más ventajoso para las sales N-metilglucamínicas de los derivados N-glicosílicos de macróluros de polieno que para la fungizona (tabla 2). - - - - -

Tabla 2

Antibiótico	Índice de actividad relativa en infección de ratones con <i>Candida albicans</i>
Fungizona	1
sal N-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de:	
- anfotericina B	2,35
- polifungina	5,08
- nistatina	2,41

En la administración intravenosa de sales N-metilglucamínicas de derivados N-glicosílicos de macróluros de polieno y en la fungizona comparativa con respecto a las ratas el efecto es mucho más ventajoso para la sal, debido a que puede demostrarse su presencia más prolongada en el suero que en el caso de la fungizona (tabla 3). - - - - -

Tabla 3

Antibiótico	Tiempo de presencia de un antibiótico en el suero después de la administración de dosis 1/5 DL ₅₀ (en minutos)
Fungizona	5
Sal N-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de: - anfotericina B - polifungina - nistatina	15 60 30

Los datos que representan la toxicidad selectiva son también más ventajosos para sal N-metilglucamínica de los derivados N-glicosílicos de los macroluros de polieno que para la fungizona. En la tabla 4 se comparan los índices de toxicidad selectiva EK_{50}/DK_{50} y EH_{50}/DK_{50} , que ilustran la relación de la concentración mínima de antibiótico que provoca el 50% de efluencia de iones potasio a partir de los eritrocitos de la sangre humana (EK_{50}) y la concentración mínima de antibiótico que provoca la hemólisis del 50% de los eritrocitos (EH_{50}) respecto a la concentración mínima de antibiótico que provoca la efluencia del 50% de los iones potasio a partir de las células *Saccharomyces cerevisiae* (DK_{50}). - - - - -

Tabla 4

Antibiótico	Índice de toxicidad selectiva	
	EK ₅₀ /DK ₅₀	EH ₅₀ /DK ₅₀
Fungizona	1,09	1,4 - 2,9
Sal N-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de:		
- anfotericina B	1,37	24
- polifungina	11,4	31
- nistatina	17,3	45

Con la administración intravenosa en el ratón la toxicidad aguda DL₅₀ de las sales N-metilglucamínicas de los derivados N-glicosílicos de los macróluros de polieno es inferior que la de la fungizona (tabla 5). - - - - -

Tabla 5

Antibiótico	DL ₅₀ para el ratón en mg/kg de peso corporal, administrado intravenosamente
Fungizona	7,4 - 9,3
Sal N-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de:	
- anfotericina B	12,1 - 14,3
- polifungina	13,8 - 16,4
- nistatina	19

- Las sales sódicas, tris e imidazólicas del derivado glicosílico de macroluros de polieno se describen en la patente británica 1 387 187. Las sales tris e imidazólicas no se usan como agentes terapéuticos debido a sus características, mientras que la aplicación de sales sódicas de derivados N-glicosílicos de macroluros de polieno en forma de disoluciones inyectables es difícil si se tienen en cuenta los altos valores de pH de estas disoluciones. Además las sales sódicas de los derivados N-glicosílicos de los macroluros de polieno en disoluciones acuosas a tan altos valores de pH son lábiles y la actividad biológica de las preparaciones farmacéuticas apropiadas, en comparación con la actividad de la sustancia de partida es reducida. En el espectro de IR se observó la importante degradación del anillo de lactona. A diferencia de las sales sódicas de derivados N-glicosílicos de macroluros de polieno, las sales N-metilglucamínicas son más solubles en agua y sus disoluciones en agua son estables y presentan menor valor de pH (tabla 6).
- 5.
- 10.
- 15.

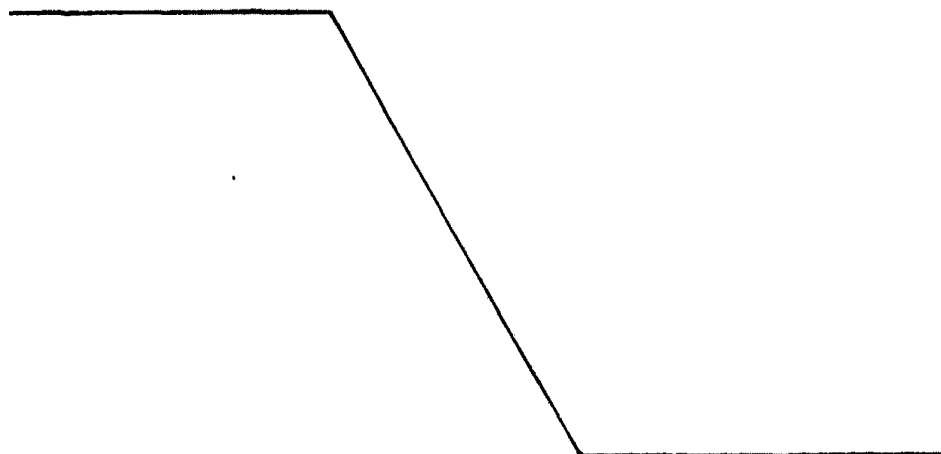


Tabla 6

	Sal sódica de derivado N-glicosílico de polifungina	Sal N-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de polifungina
pH de disolución al 1% de agua	9,9	8,9
Espectro de IR	sin absorción presente a 1704 cm ⁻¹ en polifungina	sin diferencia en la comparación con el patrón
Actividad biológica en u/mg	1860	2365
Solubilidad en agua	4 - 10%	15%

- Las sales N-metilglucamínicas de derivados N-glicosílicos de macroluros de polieno pueden utilizarse en el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales y sistémicas, provocadas por hongos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Torulopsis* y otros, en formas farmacéuticas bien conocidas tales como aerosoles, disoluciones para la infusión, tabletas vaginales, compresas, gotas y disoluciones para la administración parenteral.
- 5.

Ejemplo I.

10. Se suspendieron 1 g de anfotericina B y 0,3 g de glucosa anhidra en 15 ml de dimetilformamida y se dejaron reposar a una temperatura de 32°C durante 16 horas. Se añadieron a esta disolución 200 ml de agua destilada, se centri

- fugó el precipitado, se lavó dos veces con 50 ml de benceno y una vez con 50 ml de hexano, se secó bajo presión reducida y se extrajo a una temperatura de 50°C con 100 ml de metanol durante 15 minutos. El precipitado insoluble se centrifugó y se extrajo de nuevo con el mismo volumen de metanol. Se dejaron reposar durante la noche disoluciones combinadas a una temperatura de -5°C. El precipitado se separó por centrifugación, se lavó dos veces con 50 ml de benceno y una vez con 50 ml de hexano y se secó bajo presión reducida. Se obtuvo 0,65 g de derivado N-glicosílico cristalino de anfotericina B, de $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1450$ a 381 nm, $CI_{50} = 0,04$ mcg/ml. Antibiótico original: $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1580$ a 381 nm, y $CI_{50} = 0,03$ mcg/ml. - - - - -
- 5.
- 10.

Ejemplo II.

15. Se disolvieron 10 g de polifungina y 2,4 g de glucosa en 50 ml de dimetilformamida y se dejaron reposar a una temperatura de 32°C durante 16 horas. El derivado se precipitó con 1 l de disolución acuosa de cloruro sódico 0,1 N, se centrifugó y se lavó con 100 ml de agua. El producto se extrajo ocho veces, cada vez con 100 ml de metanol. Se añadieron 100 ml de N-butanol a los extractos combinados y la mezcla se evaporó bajo presión reducida hasta un volumen de 50 ml y se dejó reposar para la cristalización a la temperatura de -5°C. El precipitado se centrifugó y se lavó dos veces con acetona y hexano y entonces se secó. Se
- 20.
- 25.

obtuvieron 7,2 g de derivado N-glicosílico de polifungina de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 710$ a 304 nm, $CI_{50} = 0,25$ mcg/ml. - - - - -

Ejemplo III.

- Se suspendieron 5 g de candicidina y 1,5 g de glu
5. cosa en 25 ml de dimetilformamida y se dejaron reposar a una temperatura de 37°C durante 20 horas. El derivado se precipitó con 200 ml de disolución acuosa de sulfato amónico al 5% y se lavó dos veces con 20 ml de agua. El derivado N-glicosílico de candicidina obtenido en la reacción se ex-
10. trajo con 200 ml de metanol a una temperatura de 36°C y entonces con 200 ml de mezcla de metanol-n-butanol. Se evaporaron el metanol y el agua con butanol y entonces el derivado se cristalizó a partir de n-butanol. Se obtuvieron 1,14 g de derivado N-glicosílico de candicidina de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 210$
15. a 378 nm a partir de la fracción metánolica y 1,96 g de derivado de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 270$ a 378 nm a partir de la fracción metanólica-butanólica. CI_{50} del derivado N-glicosílico de candicidina = 0,004 mcg/ml. Antibiótico original: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 210$ a 378 nm, $CI_{50} = 0,0025$ mcg/ml. - - - - -

20.

Ejemplo IV.

Se realizó la reacción de condensación de 5 g de aureofacina de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 410$ a 378 nm y 1,5 g de glucosa, como se ha descrito en el ejemplo III. Se obtuvieron 2,93 g de derivado N-glicosílico de aureofacina de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 290$ a 378 nm

a partir de la fracción metanólica y 1,82 g de derivado de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 320$ y 378 nm a partir de la fracción metanólica-n-butánolica. CI_{50} de derivado N-glicosílico de aureofacina = 0,008 mcg/ml. CI_{50} de antibiótico original = 0,006 mcg/ml.-

5.

Ejemplo V.

Se condensaron 3 g de aureofacina y 0,9 g de glucosa en 35 ml de dimetilformamida. El residuo insoluble se centrifugó y el derivado se precipitó con 200 ml de disolución acuosa de sulfato amónico al 10%. El precipitado se filtró sobre cellite, se lavó con 200 ml de agua y 200 ml de acetona y el derivado se extrajo con una mezcla de cloroformo-metanol-agua (10:10:1). Se evaporaron cloroformo, metanol y agua como mezcla aceotrópica con n-butanol y el residuo se dejó cristalizar en n-butanol durante la noche a una temperatura de -5°C . Se obtuvieron 1,85 g de derivado N-glicosílico de aureofacina de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 320$ a 378 nm y $CI_{50} = 0,008$ mcg/ml. CI_{50} del antibiótico original = 0,006 mcg/ml.

10.

15.

Ejemplo VI.

Se suspendieron 1 g de anfotericina B y 0,3 g de glucosa en 15 ml de dimetilformamida y se dejaron reposar a una temperatura de 37°C durante 20 horas. Se precipitó derivado N-glicosílico con 300 ml de disolución acuosa de sulfato amónico al 5% y se lavó con 50 ml de agua. El precipitado se suspendió en 50 ml de metanol y 40 ml de n-butanol,

20.

- después de lo cual se añadió 0,1 mM de carbonato sódico en 10 ml de agua. Se evaporaron metanol y agua como mezcla acoetrópica con n-butanol y el residuo se dejó cristalizar. Se obtuvieron 1,2 g de sal sódica de derivado n-glicosílico de anfotericina B de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1200$ a 380 nm y $CI_{50} = 0,05$ mcg/ml.
- 5.

Ejemplo VII.

- Se suspendieron 1 g de anfotericina B y 0,3 g de glucosa en 15 ml de dimetilformamida y se dejaron reposar durante 20 horas a una temperatura de 37°C. Se precipitó derivado N-glicosílico con 300 ml de disolución acuosa de sulfato amónico al 5%. El precipitado se lavó con 50 ml de agua, se disolvió en 50 ml de metanol y se añadieron 1 mM de tris y 40 ml de n-butanol; entonces el metanol y el agua se destilaron como mezcla acoetrópica con n-butanol y el residuo se dejó reposar para la cristalización. Se obtuvo la sal tris del derivado N-glicosílico de anfotericina B de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1040$ a 380 nm y $CI_{50} = 0,6$ mcg/ml. - - - - -
- 10.
- 15.

Ejemplo VIII.

- Se suspendieron 3 g de polifungina en 15 ml de dimetilformamida, se añadieron 0,9 g de glucosa y se dejaron reposar a una temperatura de 38°C durante 24 horas. El residuo insoluble se centrifugó y precipitó el derivado N-glicosílico del filtrado con 1 l de disolución acuosa de sulfato amónico al 5%. El precipitado se centrifugó y se extrajo
- 20.

- tres veces con 40 ml de metanol a una temperatura de 38°C. Se añadieron a la disolución 3 mM de tris y entonces 40 ml de n-butanol, después de lo cual se evaporaron metanol y agua como mezcla aceotrópica con n-butanol y el residuo se dejó reposar para la cristalización a una temperatura de -5°C. Se obtuvieron 2,85 g de sal tris de este derivado N-glicosílico de polifungina de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 570$ a 340 nm y $CI_{50} = 0,4$ mcg/ml. Antibiótico original: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 660$ a 304 nm, $CI_{50} = 0,15$ mcg/ml. - - - - -

10.

Ejemplo IX.

- Se disolvieron 20 g de polifungina y 6 g de glucosa en 100 ml de dimetilformamida y se dejaron reposar a una temperatura de 36°C durante 18 horas. La disolución resultante se filtró entonces, luego se añadieron al filtrado 400 ml de disolución acuosa de sulfato amónico al 5% y se dejó reposar a una temperatura de +4°C durante 2 horas. El precipitado se filtró y se lavó con agua y luego se extrajo tres veces utilizando 800 ml de metanol para cada porción. Se disolvieron 6 g de N-metilglucamina en 60 ml de agua y se añadieron a los extractos metanólicos. Se añadieron 1000 ml de butanol a esta disolución, después de lo cual la mezcla de reacción se evaporó a una temperatura de 45°C bajo presión reducida para eliminar el metanol y el agua. El residuo se dejó reposar a una temperatura de +4°C para la cristalización. El precipitado se filtró y se lavó con n-bu

- tanol y entonces con éter de petróleo y se secó a temperatura ambiente. Se obtuvieron 16,5 g de la sal N-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de polifungina de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 560$ a 304 nm y $CI_{50} = 0,42$ mcg/ml. Antibiótico original: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 660$ a 304 nm y $CI_{50} = 0,16$ mcg/ml. - - - - -
- 5.

Ejemplo X.

- Se disolvieron 20 g de nistatina y 6 g de glucosa en 100 ml de dimetilformamida. El resto del proceso se realizó como se ha indicado en el ejemplo IX. Se obtuvieron
10. 18 g de sal N-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de nistatina de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 560$ a 304 nm y $CI_{50} = 0,45$ mcg/ml. Antibiótico original: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 790$ a 304 nm, $CI_{50} = 0,18$ mcg/ml.

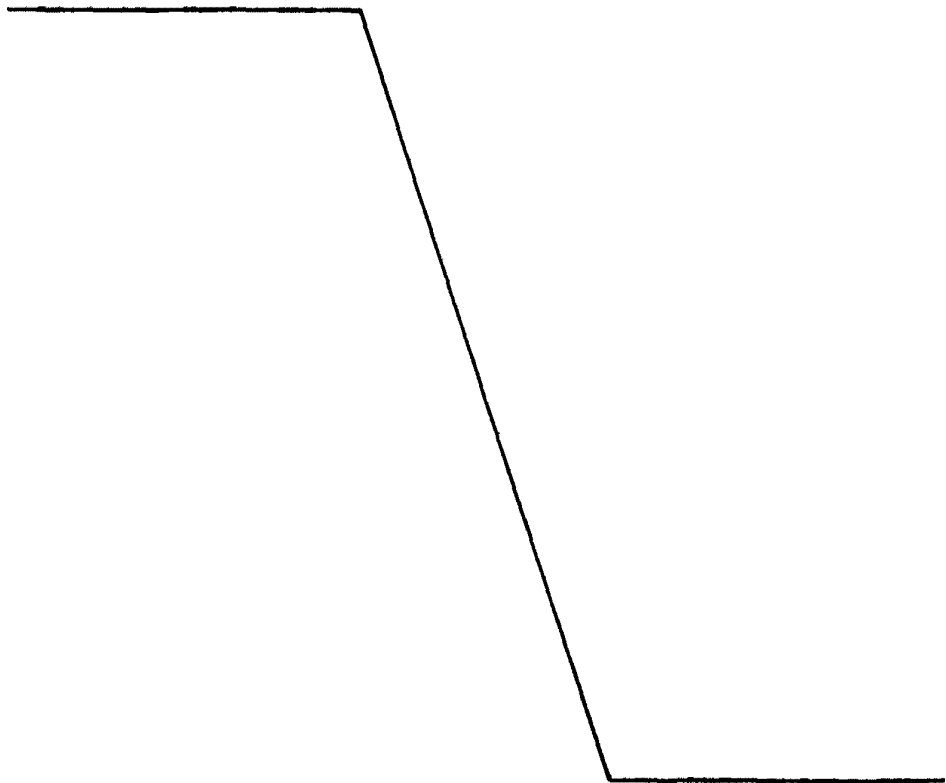
Ejemplo XI.

- Se disolvieron 20 g de anfotericina B y 6 g de glucosa en 200 ml de dimetilformamida y se dejaron reposar a una temperatura de 35°C durante 18 horas. La disolución resultante se filtró, se añadieron al filtrado 500 ml de disolución acuosa de sulfato amónico al 5% y luego la mezcla se dejó reposar a una temperatura de +4°C durante 2 horas.
- 15.
20. El precipitado se filtró y se lavó con agua. Se añadieron 1500 ml de metanol a una temperatura de 50°C y 6 g de sal N-metilglucamínica disueltos en 60 ml de agua al precipitado, mezclándose después durante 30 minutos y entonces se añadió 1 l de n-butanol. La disolución obtenida se evaporó

a una temperatura de 45°C bajo presión reducida hasta que se eliminaron el metanol y el agua. El residuo se dejó reposar a una temperatura de +4°C para la cristalización. El sedimento se filtró, se lavó con n-butanol y entonces con éter de petróleo y se secó a temperatura ambiente. Se obtuvieron 18 g de sal n-metilglucamínica de derivado N-glicosílico de anfotericina B de $E_{1cm}^{1\%} = 1140$ a 380 nm y $CI_{50} = 0,1$ mcg/ml. - - - - -

5.

10. A los efectos consiguientes se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

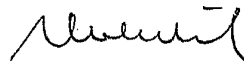
1.- Método de preparar derivados N-glicosílicos de macroluros de polieno y sus sales, particularmente sales N-metilglucamínicas, que comprende tratar un macroluro de polieno que contiene un grupo amino con mono- u oligosacárido aldosa o cetosa, en un medio disolvente orgánico o en una mezcla de disolventes, caracterizado porque el derivado N-glicosílico formado se precipita del medio de reacción por disolución en agua o acuosa de una sal inorgánica, preferentemente sulfato amónico, se purifica por cristalización a partir de alcohol superior, preferentemente n-butanol, se transforma entonces en sal, preferentemente sal N-metilglucamínica, y se cristaliza a partir de alcohol superior, preferentemente n-butanol. - - - - -

15. 2.- "METODO DE PREPARAR DERIVADOS N-GLICOSILICOS DE MACROLUROS DE POLIENO Y SUS SALES". - - - - -

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

MADRIL 2 2 ABR. 1977

P. A. M. CURELL SUÑOL



maf.