

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	10 A1
21	7482	
22	FECHA DE PRESENTACION	
	18 JUL 1979	

PATENTE DE INVENCION

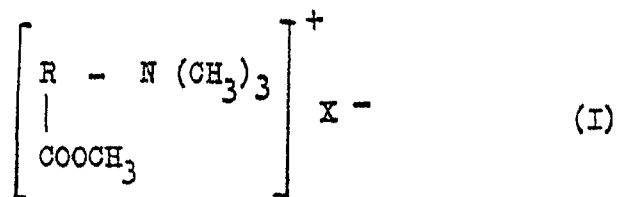
Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente solicitud y en el contenido de la memoria adjunta.

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P-208519	19 de julio de 1.978	Polonia
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K31/785	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
64 TITULO DE LA INVENCION Procedimiento para preparar antibióticos macrólidos de polienos.		
71 SOLICITANTE (S) POLITECHNIKA GDANSKA.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Gdańsk-Wrzeszcz, ul.Majakowskiego 11/12, Polonia.		
72 INVENTOR (ES) Leonard Falkowski		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.		

Los antibióticos macrólidos de polienos se aplican normalmente en la terapia de infecciones fungales en el hombre y animales y también en la prevención o eliminación de contaminaciones fungales de varios materiales.

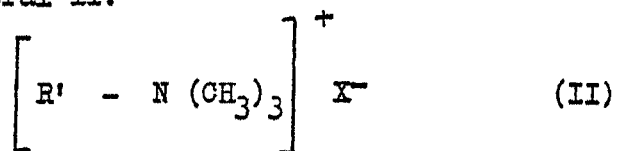
5 Ya se conocen varios derivados de macrólidos de polienos que exhiben ciertas propiedades mas deseables que los antibióticos principales. Así, se conoce el complejo de anfotericina B con deoxicolato sódico, los derivados N-acilo de macrólidos de polienos (patente USA 3.244.570 (1966)); los
10 hidrocloruros de ésteres metílicos de macrólidos de polienos (Mechlinski W., Schaffner C.P.; J.Antibiot. 25, 256 (1964)), el producto de condensación de formaldehido con candidin (France Per., Rhone-Poulenc 41.272) o productos de reacción
15 de macrólidos de polienos con polisacaridos oxigenados tras el tratamiento con peryodato (patente belga 620.619) y los derivados N-glicosilo de macrólidos de polienos (patente belga 787.531). Sin embargo, los derivados antes descritos exhiben otras ciertas propiedades indeseables, tal como: los macrólidos de N-acil polieno exhiben una actividad antifungal significativamente mas baja y las sales de ésteres metílicos de
20 estos antibióticos son bastante inestables.

Recientemente, han sido indicados los derivados de N,N,N-trimetilo de anfotericina B, nistatina y micoheptina
25 (Offenkungsschrift alemana 2.706.156). No obstante, su estructura no ha sido evidenciada. Las sustancias reivindicadas no son solubles en agua, lo cual hace imposible su aplicación directa en soluciones. Las sales inorgánicas de derivados de trimetilamonio de macrólidos de polienos, en particular las sales inorgánicas de ésteres metílicos de estos derivados, se
30 caracterizan por la fórmula general I:



en la que R representa el residuo de macrólido de polieno que está combinado con un grupo carboxílico metilado y está unido al grupo amino, mientras que X⁻ significa un anión de la sal, del tipo metilsulfato, sulfato, cloruro, fosfato, acetato, o por la fórmula general II:

5



en la que R' significa el residuo del macrólido de polieno unido al grupo amino y X⁻ se define como anteriormente.

El método de preparación de sustancias antibióticas que comprenden sales inorgánicas de derivados de trimetilamnio de macrólidos de polienos, particularmente las sales inorgánicas de ésteres metílicos de estos derivados, que se caracterizan por la fórmula general I en donde R representa el residuo de macrólido de polieno que está combinado con un grupo carboxílico metilado y está unido al grupo amino, mientras X⁻ es un anión de una sal, tal como metilsulfato, sulfato, cloruro, fosfato, acetato, o por la fórmula general II en donde R' representa el residuo de macrólido de polieno unido al grupo amino y X⁻ se define como anteriormente, de acuerdo con esta invención, depende del tratamiento de un macrólido de polieno en un disolvente orgánico o en una mezcla de disolventes, con sulfato de dimetilo en presencia de un agente neutralizante, a temperatura ambiente, con agitación continua hasta el término de la reacción. El producto en bruto se precipita tras la adición de éter etílico, disuelto en butanol, se lava el disol

10

15

20

vente orgánico con agua y se concentra bajo presión reducida.

Trás la adición de éter etílico se precipita el producto de fórmula general I que representa al metilsulfato del éster metílico del macrólido de N,N,N-trimetilpolieno o el de fórmula general II que representa al metilsulfato del macrólido de polieno.

Como macrólidos de polienos se aplicaron: nistatina, polifungina, anfotericina B, candicidina, pimaricina, tricomicina, levorina, rimocidina, candidina, aureofacina, perimicina y micoheptina.

Como disolventes orgánicos se aplicaron: dimetilacetamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y alcoholes alifáticos C₁₋₅.

Como agente neutralizante se aplicó bicarbonato sódico.

En los macrólidos de polieno que contienen un grupo amino aromático, éste grupo está sustituido con uno o dos grupos metilo. Dichos antibióticos están representados por levorina, candicidina, tricomicina, aureofacina y perimicina.

Se ha probado que las condiciones de alquilación de esta invención son suficientemente suaves para evitar la degradación de los antibióticos. El tratamiento del macrólido de polieno con sulfato de dimetilo en las condiciones conocidas en la literatura, causarían la abertura del anillo macrólido, eliminación de la mitad azúcar y degradación del cromóforo de polieno, resultando en la pérdida de actividad biológica.

En la tabla 1 se ofrecen las actividades antimicrobiales y hemolíticas in vitro de los macrólidos de polieno DMS y de los antibióticos principales, comparativamente.

TABLA 1

Actividades antifungales y hemolíticas de los macrólidos de polieno y de sus derivados DMS.

<u>Antibiótico</u>	<u>IC₅₀ (mcg/ml)</u>	<u>EH₅₀ (mcg/ml)</u>
Pimaricina	1	100
DMS-piramicina	1,7	400
Polifungina	0,08	20
DMS-polifungina	0,15	120
Nistatina	0,1	50
DMS-nistatina	0,25	100
Rimocidina	1,5	30
DMS-rimocidina	2,5	50
Anfotericina B	0,03	5
DMS-anfotericina B	0,08	5
Micoheptina	0,05	15
DMS-micoheptina	0,2	65
Candidina	0,054	20
DMS-candidina	0,15	70
Canducidina	0,005	2,5
DMS-canducidina	0,005	15
Aureofacina	0,005	0,35
DMS-aureofacina	0,003	15

Tabla 1 (continuación)

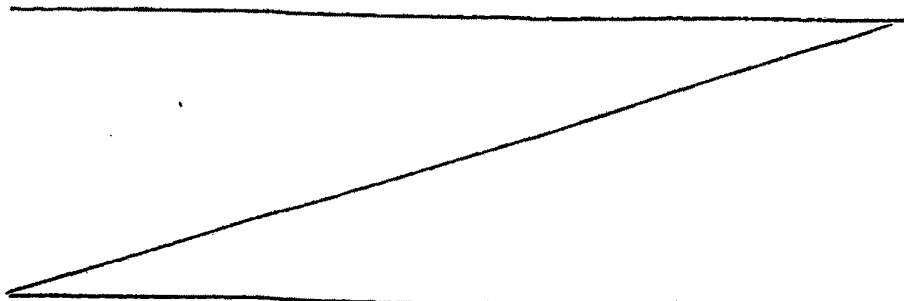
<u>Antibiótico</u>	<u>IC₅₀</u> <u>(mcg/ml)</u>	<u>EH₅₀</u> <u>(mcg/ml)</u>
Levorina	0,007	2,5
DMS-levorina	0,009	20
Tricomocina	0,005	3
DMS-tricomocina	0,01	10
Perimocina	0,002	5
DMS-perimocina	0,003	12

en donde:

DMS significa la sal del éster de N,N,N-trimetilo del antibiótico o la sal del antibiótico N,N,N-trimetílico.

5 IC₅₀ representa la concentración de la sustancia que causa el 50% de inhibición del crecimiento de células de *Saccaromyces cerevisiae* en medio líquido standard, determinada espectrofotométricamente a $\lambda = 600$ nm después de 24 horas de incubación a 28°C.

10 EH₅₀ representa la concentración de la sustancia que causa en condiciones 50% de hemoglobina, determinada espectrofotométricamente a $\lambda = 550$ nm.



La estructura de los derivados obtenidos ha sido documentada por medio de métodos espectroscópicos. Se ofrecen ejemplos del procedimiento aplicado para la identificación del derivado de candicidina, designado adicionalmente como candicidina DMS, obtenido tras el tratamiento del antibiótico con sulfato de dimetilo en las condiciones propuestas de alquilación. La hidrólisis ácida de candicidina proporciona la mitad azucar micosamina, mientras que la candicidina DMS proporciona N,N,N-trimetilmicosamina. La estructura de dicha sustancia se derivó del espectro de masa de desorción de campo (los iones base y simultáneamente los iones moleculares en m/e 206), así como del espectro de resonancia magnética protónica (señal en $\delta = 3,68$ característica de los grupos metilo unidos al átomo de nitrógeno de intensidad tres veces mayor que la señal en $\delta = 1,68$ característica de los protones del grupo metilo C-6 del aminoazúcar).

La presencia del enlace éster en la molécula del derivado viene indicada por la banda de absorción intensiva en $\lambda = 1730 \text{ cm}^{-1}$ en el espectro IR y ausencia coincidente de la absorción en $\lambda = 1590 \text{ cm}^{-1}$ característica del antibiótico principal. La absorción electrónica de candicidina y de su derivado DMS difieren ligeramente en las intensidades de máximos de absorción, mientras su situación y estructura de oscilación son idénticas. Esto proporciona la evidencia de que la estructura del cromóforo de polieno permanece sin cambios en el procedimiento de alquilación. El espectro RMN de per-O-trimetilsilil-DMS-candicidina exhibe bandas en $\delta = 3,65$ y $3,03$ características de los protones metoxi y N-metilo respectivamente. El tratamiento de soluciones acuosas alcalinas de candicidina libera p-aminoacetofenona, mientras DMS-candicidina N-dimetil, N-metil-

sustituida y no sustituida, libera p-aminoacetofenona en una relación molar de 3:5:2.

La ventaja de los derivados descritos en esta invención es su perfecta solubilidad en agua junto con una alta actividad antifungal y mejorada toxicidad selectiva, en comparación con los antibióticos de origen.

En los siguientes ejemplos se presentan las sales inorgánicas de derivados de trimetilamonio de macrólidos de polienos, particularmente los ésteres metílicos de sales inorgánicas de derivados de trimetilamonio de estos antibióticos, así como el método para su preparación.

EJEMPLO 1

Se disuelven 2 g de polifungina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 800$, a 304 nm) en 10 ml de dimetilformamida y se añaden en porciones 10 ml de metanol, 2 g de bicarbonato sódico y 1 ml de sulfato de dimetilo y la mezcla de reacción se agita durante 10 horas a 25°C. El bicarbonato sódico sin disolver se centrifuga, el metanol se evapora bajo presión reducida y el derivado se precipita con éter etílico. El producto se disuelve en 50 ml de butanol saturado con agua, se lava dos veces la capa de butanol con 20 ml de agua y se concentra bajo presión reducida a un volumen de 15 ml. La precipitación con éter etílico, seguido por lavado dos veces con éter etílico y hexano, proporciona 1,6 g de la sal de éster metílico de N,N,N-trimetilpolifungina que exhibe $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 700$, a 304 nm. El rendimiento conseguido es del 80% del teórico.

EJEMPLO 2

Se disuelven 2 g de nistatina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 860$, a 304 nm) en 50 ml de metanol, se añaden 2 g de bicarbonato sódico y se instilan en porciones 2 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de

reacción se agita 4 horas a 25°C y se procesa como se ha descrito en el ejemplo 1. La sal de éster metílico de N,N,N-trimetilnistatina se obtiene en un rendimiento de 1,3 g (75% del teórico), exhibiendo el producto $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 760$ a 304 nm.

EJEMPLO 3

5 Se disuelve 1 g de anfotericina B ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1420$, a 383 nm) en 20 ml de dimetilformamida-metanol en una relación de 10:1, se añade 1 g de bicarbonato sódico y se instila 1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita 24 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,9
10 g de la sal de éster metílico de N,N,N-trimetilanfotericina B con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 900$, a 382 nm, lo cual constituye un 90% del rendimiento teórico. La sustancia obtenida se purifica por medio de distribución en contracorriente en el sistema disolvente : cloroformo-metanol-agua (2:2:1). Se obtienen 0,3 g de sal de
15 éster metílico de N,N,N-trimetilanfotericina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1.400$ a 382 nm.

EJEMPLO 4

20 Se disuelve 1 g de candidina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 820$, a 383 nm) en 20 ml de dimetilformamida-metanol en una relación de 10:1, se añade 1 g de bicarbonato sódico y se instila 1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita 15 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,5 g de la sal de éster metílico de N,N,N-trimetilcandidina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 550$
a 382 nm, lo cual constituye un 80% del rendimiento teórico.
25 El producto se purifica por medio de cromatografía en columna en gel de sílice inicialmente saturada con agua en el sistema disolvente: cloroformo-metanol-agua (20:10:1). Se obtienen 0,2 g del derivado de candidina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 850$, a 378 nm.

EJEMPLO 5

5 Se disuelve 1 g de tricomicina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 450$, a 378 nm) en 20 ml de dimetilformamida-metanol en una relación 10:1, se añade 1 g de bicarbonato sódico y se instila 1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita 15 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,6 de DMS-tricomicina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 560$, a 378 nm.

EJEMPLO 6

10 Se disuelve 1 g de pimaricina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 960$, a 304 nm) en 20 ml de metanol, se añade 1 g de bicarbonato sódico y se instila 1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita 15 horas a 25°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,85 g de la sal de éster metílico de N,N,N-trimetilamonio con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 700$ a 304 nm, lo cual representa un 80% del rendimiento teórico.

15

EJEMPLO 7

20 Se disuelve 1 g de levorina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 800$, a 378 nm) en 30 ml de dimetilformamida-metanol en una relación de 10:1, se añade 1 g de bicarbonato sódico y se instila 1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,7 g de DMS-levorina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 600$ a 304 nm, lo cual representa un 70% del rendimiento teórico.

20

EJEMPLO 8

25 Se disuelve 1 g de rimocidina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 600$, a 304 nm) en 20 ml de dimetilformamida-metanol en una relación de 10:1, se añade 1 g de bicarbonato sódico y se instila 1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,8 g de

25

la sal de éster metílico de N,N,N,-trimetilrimocidina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 560$ a 304 nm, lo cual representa un 80% del rendimiento teórico.

EJEMPLO 9

5 Se disuelven 0,1 g de perimicina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 650$ a 380 nm) en 2 ml de dimetilacetamida-metanol en una relación de 10:1, se añaden 0,1 g de bicarbonato sódico y se instilan 0,1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita 10 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,05 g de DMS-perimicina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 600$, a 380 nm, lo cual
10 representa un 50% del rendimiento teórico.

EJEMPLO 10

15 Se disuelve 1 g de aureofacina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 800$ a 379 nm) en dimetilformamida-metanol en una relación de 10:1, se añade 1 g de bicarbonato sódico y se instila 1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita durante 20 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,7 g de DMS-aureofacina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 760$, a 378 nm, lo cual representa un 65% del rendimiento teórico.

EJEMPLO 11

20 Se disuelven 0,1 g de candicidina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 400$, a 378 nm) en 5 ml de dimetilformamida-metanol, en una relación de 10:1, se añaden 0,1 g de bicarbonato sódico y se instilan 0,1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se
25 obtienen 0,04 g de DMS-candicidina $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 560$, a 378 nm, lo que representa un 45% del rendimiento teórico.

EJEMPLO 12

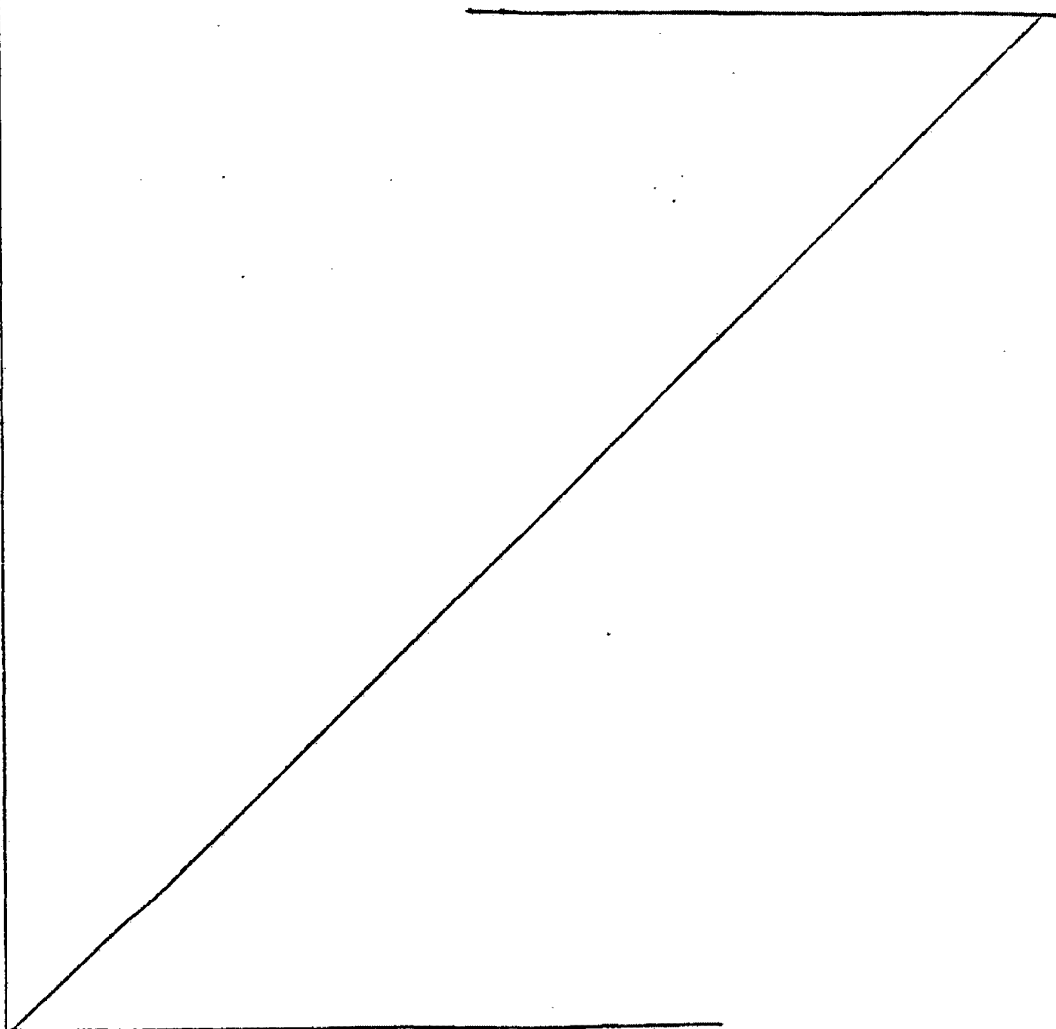
Se disuelve 1 g de miccheptina ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 700$, a 383 nm) en 20 ml de dimetilformamida-metanol en una relación de

5

10:1, se añade 1 g de bicarbonato sódico y se instila 1 ml de sulfato de dimetilo. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas a 20°C y se procesa como en el ejemplo 1. Se obtienen 0,5 g de la sal de éster metílico de N,N,N-trimetilmicoheptina con $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 680$, a 380 nm, lo que representa un 85% del rendimiento teórico.

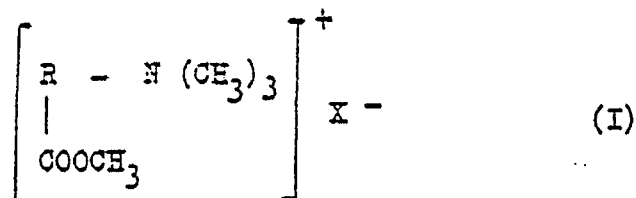
10

Descrita suficientemente la naturaleza del invento así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

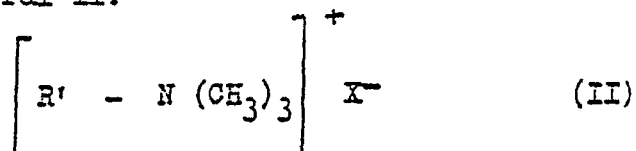


REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para preparar antibióticos macrólidos de polienos, a base de sales inorgánicas de derivados de trimetilamonio de macrólidos de polienos, en particular las sales inorgánicas de ésteres metílicos de dichos derivados, que se definen por la fórmula general I:



en la que R representa el residuo de macrólido de polieno que está combinado con un grupo carboxílico metilado y está unido al grupo amino, mientras que X⁻ significa un anión de la sal, del tipo metilsulfato, sulfato, cloruro, fosfato, acetato, o por la fórmula general II:



en la que R' significa el residuo del macrólido de polieno unido al grupo amino y X⁻ se define como anteriormente; caracterizado porque comprende tratar el macrólido de polieno, en un disolvente orgánico o en una mezcla de disolventes, con sulfato de dimetilo, en presencia de un agente neutralizante, a temperatura ambiente, con agitación continua hasta el término de la reacción; precipitar el producto obtenido tras la adición de éter etílico, disuelto en butanol; lavar el disolvente orgánico con agua; y concentrar bajo presión reducida; y el producto de fórmula general I, representado por el metilsulfa-

to de éster metílico del macrólido de N,N,N-trimetilpolieno, o el producto de fórmula general II, representado por el metil-sulfato del macrólido de N,N,N-trimetilpolieno, se conviertan en otras sales inorgánicas.

5 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los macrólidos de polienos se eligen entre: nistatina, polifungina, anfotericina B, candicidina, pimarcina, levorina, rimocidina, perimicina, aureofacina, candidina.

10 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el disolvente se selecciona entre dimetilformamida, dimetilacetamida, dimetilsulfóxido y alcoholes alifáticos de 1 a 5 átomos de carbono.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente neutralizante es bicarbonato sódico.

15 5.- Procedimiento para preparar antibióticos macrólidos de polienos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de 13 hojas escritas a máquina por una sola cara.

20

Madrid, 18 JUL 1979

Politechnika Gdańska.

J. M. GOMEZ ACEBO Y PUMBO
b. n. Firmado J. Suárez Díaz

